

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**EPIDEMIOLOGÍA DEL HLB BAJO
TRES ESCENARIOS REGIONALES EN
MÉXICO**

JORGE LUIS FLORES SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada: **Epidemiología del HLB bajo tres escenarios regionales en México**, realizada por el alumno: **Jorge Luis Flores Sánchez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y es aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Gustavo Mora-Aguilera

ASESOR



Dr. Emiliano Loeza Kuk

ASESOR



Dr. José Isabel López Arroyo

ASESOR



Dr. José Joaquín Velázquez Monreal

ASESOR



Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa

ASESOR



Dr. Renato Beozzo Bassanezi

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril 2016

EPIDEMIOLOGÍA DEL HUANGLONGBING BAJO TRES ESCENARIOS REGIONALES EN MÉXICO

Jorge Luis Flores Sánchez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016

Resumen

El Huanglongbing de los cítricos (HLB) es una enfermedad presente en muchas regiones cítricas del mundo con una diseminación activa a nuevas áreas productivas. En México *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), agente causal del HLB, está presente desde 2009 en 23 de las 24 entidades federativas cítricas y el vector *Diaphorina citri* (DC) en todo el país. Debido a las diferentes especies cítricas, condiciones climáticas contrastantes y a la diversidad de tecnologías productivas es fundamental parametrizar las epidemias de CLAs en términos de riesgos productivos. Esta investigación estudió el comportamiento epidémico de CLAs en México con un enfoque regional bajo la hipótesis de que la intensidad de esta enfermedad depende de factores asociados al sistema epidemiológico y a la variabilidad regional de los mismos, siendo el tipo de cítrico y el componente tecnológico los más determinantes en la vulnerabilidad cítrica a CLAs. El propósito final fue desarrollar herramientas analíticas que coadyuven al manejo regional del HLB que implementa el sector oficial federal pero que podría ser adoptado por productores. Este estudio se realizó en tres regiones cítricas con distinto nivel de prevalencia de esta enfermedad: Pacífico (*PCO*) en las entidades de Colima y Michoacán con predominancia de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*); Península de Yucatán (*PEN*) en Campeche, Quintana Roo y Yucatán; y Centro-Golfo (*CG*) en Puebla y Veracruz, ambas con predominancia de naranja dulce (*Citrus sinensis*). Ésta última correspondió a una condición asintomática. Adicionalmente, la metodología regional se validó bajo las condiciones cítricas de Paraguay. En total se evaluaron 6, 600 árboles de diferentes especies cítricas en 311 huertos de 38 municipios.

Regionalmente, se realizó un estudio comparativo sobre los factores involucrados en la intensidad epidémica del HLB entre *PCO* y *PEN*, mediante la generación de un índice multivariado (IM) de inductividad a partir de la metodología de componentes principales y factores. Este enfoque consideró la evaluación de 15 variables asociadas al sistema epidemiológico en 197 huertos. Edad de planta, nivel de manejo agronómico de huerto,

concentración de CLas en planta, número de generaciones potenciales de DC y número de brotes, explicaron el 90% de la varianza. La región PCO tuvo mayor inductividad epidémica con $IM=0.008$ que PEN con $IM=0.0005$ ($P<0.0001$), lo que implica mayor riesgo productivo por CLas.

En la región CG, debido a su naturaleza asintomática el estudio se basó en caracterizar la dispersión parcelaria y regional de la bacteria en Puebla y Veracruz, con el fin de definir el riesgo de dispersión. A nivel parcelario CLas mantuvo una dispersión activa en focos de hasta 7x8 árboles ($2,352 \text{ m}^2$) y a nivel regional se dispersó hasta 12 km. La integración de ambos métodos indicó que la dispersión de CLas-asintomático fue de baja intensidad. Esto se corroboró por la baja concentración de CLas en planta y vector con 8,846 y 285 (copias del gen 16S ADNr de CLas), respectivamente, y por la baja población de DC. Comparativamente en PCO y PEN la concentración fue de 8.8 y 8.5, y 0.7 y 0.34 ($\times 1'000,000$ copias del gen 16S ADNr de CLas), respectivamente.

En PCO, región con mayor prevalencia de CLas en México, se determinó la implicación del manejo agronómico y cronicidad de infección en el impacto productivo de esta bacteria en limón mexicano. En Colima y Michoacán, en 2014 y 2015 se seleccionaron 28 huertos de alta tecnificación (AT) consistente en riego por microaspersión, óptimo nivel de nutrición, control de malezas, podas *fitosanitarias*, control de plagas y enfermedades, así como control sistemático de DC; y 28 huertos de baja tecnificación (BT), con riego rodado, bajo nivel de nutrición, ausencia de control de plagas y enfermedades, ausencia de podas de formación y saneamiento, y control irregular de DC. En cada huerto se determinó la cronicidad de infección de CLas, con base en la severidad promedio de síntomas en el dosel por HLB en 100 árboles y cinco variables de producción. Se encontró que la pérdida productiva fue significativamente mayor en Colima que en Michoacán (8 vs 6.3 t/ha) y en huertos con AT se obtuvo una diferencia de hasta 4 t/ha de fruta con respecto a BT (Tukey, $P<0.05$). Para ambas entidades, el nivel de tecnificación de los huertos aportó el 66% de la pérdida productiva mientras que la cronicidad de infección el 16%.

Con la información generada se desarrollaron dos herramientas en ambiente WEB para el manejo del HLB: 1) @RCOs, la cual se basa en un método ponderativo de selección de variables de inductividad epidémica a nivel de municipio, tales como superficie citrícola, susceptibilidad de especies, carga de inóculo, índice de abundancia de DC, y tasas de

dispersión de CLas para determinar el número, tamaño y localización de las Áreas Regionales de Control (ARCOS) de *Diaphorina citri* con simulación Monte Carlo para fines de estimar los ARCOS; y 2) Sistema Regional para el Manejo Integrado del HLB en Colima (SIREMI-HLB), el cual genera una propuesta de manejo agronómico con base en las características productivas del huerto y cronicidad de infección de CLas, indicadas por el usuario.

La metodología multivariada regional se validó en la zona citrícola de Paraguay y complementariamente se evaluó el estatus epidémico del HLB, así como el efecto de la erradicación de plantas enfermas en la dispersión de la bacteria. Para este fin se realizó un IM a partir de la evaluación de siete variables del sistema epidemiológico en 22 huertos y mediante el análisis del patrón espacial de CLas a nivel parcelario. El IM indicó un gradiente de dispersión de la región de Itapúa y Caazapá (IM=0.0003 y 0.0002, respectivamente), hacia la región de Boquerón (IM=0.0002). A nivel parcelario se comprobó que la erradicación tiene un efecto en la reducción de la dispersión del HLB al mantener una incidencia y severidad a nivel dosel promedio del 29.2% (± 19.9) y 12% (± 7.9) a nivel país, respectivamente. El patrón espacial fue agregado y con efecto de borde en la fase inicial de la epidemia.

A pesar de que CLas representa un riesgo para la citricultura mexicana esta investigación documenta la mayor vulnerabilidad regional del PCO y del limón mexicano, con pérdidas de hasta de 82% dependiente del nivel tecnológico, predominantemente definido por nutrición y manejo hídrico. Se demostró por primera vez la ocurrencia de una condición epidémica asintomática en naranja dulce, lo que sugiere una posible adaptabilidad parasítica hacia una condición moderada con un efecto crónico de largo plazo. Adicionalmente, se describió por primera vez el efecto crónico de CLas en términos de concentración bacteriana en planta y la severidad de síntomas y su efecto en la producción. Finalmente, la metodología para el establecimiento de ARCOS desarrollada en la presente investigación constituye un aporte epidemiológico tangible al ser implementada por el sector oficial desde 2013.

Palabras clave: Variabilidad regional, cronicidad de infección, *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

EPIDEMIOLOGY OF HUANGLONGBING UNDER THREE REGIONAL SCENARIOS IN MEXICO

Jorge Luis Flores Sánchez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016

Abstract

The citrus Huanglongbing (HLB) is a disease present in many citrus regions of the world with an active spread to new productive areas. In Mexico, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), the causal agent of HLB is present since 2009 in 23 of the 24 citrus states as well as the vector *Diaphorina citri* (DC) in all country. Due to different citrus species, contrasting climatic conditions and the diversity of production technologies is essential to parameterized CLas epidemics in terms of production risk. This research studied the CLas epidemic behavior in Mexico with a regional approach under the hypothesis that the disease intensity depends on factors associated to the epidemiological system and its regional variability, being the citrus type and production technology the more determinant in the citrus vulnerability to CLas. The ultimate goal was to develop analytical tools that contribute to regional management of HLB currently implemented by the official federal sector but that could be adopted by producers. This study was conducted in three citrus regions with different levels of prevalence of the disease: Pacific (PCO) in the states of Colima and Michoacan with predominance of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*); Peninsula of Yucatan (PEN) in Campeche, Quintana Roo and Yucatan; and Central Gulf (CG) in Puebla and Veracruz; both with predominance of sweet orange (*Citrus sinensis*). The latest corresponded to an asymptomatic condition. In addition, the regional methodology was validated under the citrus conditions of Paraguay. A total of 6,600 trees of different species in 311 citrus orchards of 38 counties were evaluated.

Regionally, a comparative study on the factors involved in the epidemic intensity of HLB between PCO and PEN was conducted using a multivariate index (MI) of epidemic inductivity through Principal Components (CPs) and Factors analyses. This approach considered the evaluation of 15 variables associated with the epidemiological system in 197 orchards. Plant age, level of agronomic management, CLas concentration in the plant, number of potential generations of DC and number of shoots, accounted for 90% of the

explained variance. The PCO region had greater epidemic inductivity with $IM=0.008$ PEN with $IM=0.0005$ ($P < 0.0001$), implying greater productive risk due to CLAs.

In CG region, because of the asymptomatic nature of the study, the focus was to characterize the dispersion at orchard and regional level of asymptomatic-CLAs in Puebla and Veracruz, in order to estimate the dispersion risk. At orchard level, CLAs maintained an active dispersion in foci up to 7x8 trees (2,352 m²) and at regional up to 12 km. The integration of both methods indicated that the dispersion of asymptomatic-CLAs was of low intensity. This was corroborated by the low concentration of CLAs in plant and vector with 8,846 and 285 (16S rDNA gene copies of CLAs), respectively, and a low DC population. Comparatively in PCO and PEN the CLAs concentration was 8.8 and 8.5, and 0.7 and 0.34 ($\times 1'000,000$ of 16S rDNA gene copies of CLAs), respectively.

In PCO, region with the highest CLAs prevalence in Mexico, the implication of agronomic management and chronicity of infection on the productive impact of the bacteria in Mexican lime was studied. In 2014 and 2015, 28 orchards were selected with high regional technology (AT), having microirrigation system, high nutrition level, weed control, plant pruning, pest and disease control, as well as systematic control of DC; and 28 orchards with low technology (BT) with surface irrigation, low nutrition level, lack of pests and diseases control, poor tree canopy structure, sanitation pruning, and irregular control of DC in Colima and Michoacan. In each orchard, chronicity infection of CLAs, based on the average severity of HLB symptoms in the canopy of 100 trees was assessed as well as five production variables. The production loss was significantly higher in Colima than Michoacan (8 vs 6.3 t / ha) and orchards with AT had a difference of up to 4 t/ha fruit with respect to BT (Tukey, $P < 0.05$). For both states, the orchards technology level contributed with 66% of the production loss while 16% related to the chronicity of infection.

Two tools in WEB environment were generated for the management of HLB: 1) @RCOs, which is based in a weighted method of selected epidemic variables at county level such as the quantity of citrus hectares, susceptibility of citrus species, inoculum charge, and potential generation index of DC and dispersion rates of CLAs. This approach allowed the determination of number, size and location of Regional Control Areas (ARCOS) of *Diaphorina citri*; and, 2) A Regional System for HLB Integrated Management in Colima

(SIREMI-HLB), which generates a plan for agronomic management based on the orchard production characteristics, loaded by the user, and the specific regional epidemic intensity. The regional multivariate methodology was validated in the citrus area of Paraguay and also the HLB epidemic status in that country, as well as the effect of eradication of diseased plants in the spread was evaluated. An IM base on the evaluation of seven variables of the epidemiological system conducted in 22 orchards. The spatial pattern of HLB at orchard level was also studied. The IM suggest a dispersal gradient from Itapúa and Caazapá regions (IM = 0.0003 and 0.0002, respectively), to the Boqueron (IM = 0.0002). At orchard level it was found that eradication has an effect in reducing dispersion maintaining HLB incidence and canopy severity to an average of 29.2% (\pm 19.9) and 12% (\pm 7.9) at country level, respectively. The spatial pattern has an edge effect in the initial phase of the HLB epidemics.

Although, CLas represent a risk to the Mexican citrus industry, this research demonstrated the largest regional vulnerability of PCO and of Mexican lime. In this species, losses up to 82% were shown depending on the technological level, predominantly influenced by nutrition and irrigation system. An epidemic regional occurrence of an asymptomatic condition on sweet orange was recorded for the first time, suggesting a possible parasitic adaptability to a moderate condition with a long-term chronic effect. In addition, for the first time it was described the chronic effect of CLas in terms of bacterial concentration and severity on symptoms and its effect on citrus production. Finally, the methodology for ARCOs constitutes a tangible epidemiological contribution being implemented by the official sector since 2013.

Keywords: Regional variability, chronicity of infection, *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada para la manutención y colegiatura durante el periodo del posgrado. Al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT por las becas otorgadas para realizar estancias en el extranjero durante 2013 y 2014.

Al Colegio de Postgraduados por mantenerse como una de las instituciones líderes en ciencias agrícolas y por permitir realizar mis estudios de posgrado.

A las instancias financiadoras de la presente investigación: Proyecto FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591, clave 108591. Proyecto FORDECYT Clave: 2010-01-139259. Proyecto SENASICA-CESAVERP. Proyecto SENASICA-CESAVERMICH.

A los Comités Estatales de Sanidad Vegetal del estado de Michoacán, Puebla, Yucatán, Campeche y Quintana Roo por el apoyo logístico de campo. Al SENASICA y DGSV-CNRF. Al Ing. Pedro Robles García, Ing. Rigoberto González y MC. Abel López Buenfil. Al SENAVER por su apoyo logístico y oportunidad de realizar el estudio en Paraguay.

Al Dr. Gustavo Mora Aguilera por su mentoría y persuasión en la visión científica y profesional y por su apoyo y dirección de esta investigación.

A mis asesores José Isabel López Arroyo, Emiliano Loeza Kuk, Joaquín Velázquez Monreal, Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa y Renato Beozzo Bassanezi, por sus aportaciones y acertadas sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación y mi formación profesional.

Al Dr. Sami Michereff, Francisco Laranjeira y Suely Brito por el apoyo en estancia en Brasil.

A mis compañeros del grupo de investigación LANREF y CIVEFIT por su invaluable apoyo en campo y laboratorio, sin su colaboración no hubiera sido posible.

A Santiago Domínguez Monge, Gerardo Acevedo Sánchez, Ramón Saucedo, Fabiola y otros amigos que estuvieron involucrados durante esta etapa.

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones que trae a mi vida.

A mis padres: Francisca Sánchez Valenzuela y Jorge Flores Grijalva.

A Cindy González por tu permanente apoyo, paciencia y amor incondicional... Pero sobre todo por la inmensa felicidad que has traído y que muy pronto traerás a mi vida.

A mis abuelos Valentina Valenzuela y Víctor Sánchez Armenta, y a toda mi familia Sánchez-Valenzuela.

A mi gran amigo y mi segundo padre Dagoberto Fierro Corrales, por ser un ejemplo de vida, te adelantaste un poco en el camino, pero dejaste un gran legado de lucha, valor, tenacidad y sacrificio que más de uno de los que quedamos quisiéramos tener...

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	vi
LISTA DE CUADROS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xix
CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1. Importancia de la citricultura.....	6
2.2. Antecedentes del Huanglongbing de los Cítricos	8
2.3. Distribución mundial del HLB	10
2.4. Distribución nacional del HLB.....	12
2.5. Impactos económicos del HLB.....	13
2.6. Estrategias de manejo del HLB	15
2.6.1. Siembra de plantíos sanos.....	16
2.6.2. Detección y erradicación oportuna de plantas con HLB	16
2.6.3. Monitoreo del vector	18
2.6.4. Control regional de <i>D. citri</i> mediante productos químicos y agentes de control biológico	19
2.7. Justificación biológica y epidemiología del enfoque regional	21
2.8. Epidemiología del HLB con enfoque clásico parcelario.....	25
2.8.1. Comportamiento temporal parcelario	26
2.8.2. Comportamiento espacial parcelario.....	29
2.9. Epidemiología del HLB con enfoque regional	30
2.9.1. Comportamiento temporal	30
2.9.2. Comportamiento espacial	31
3. LITERATURA CITADA	33
CAPÍTULO II	
EPIDEMIOLOGÍA COMPARATIVA DE LA INTENSIDAD EPIDÉMICA DEL HUANGLONGBING EN DOS ESCENARIOS REGIONALES DE MÉXICO	50
RESUMEN	50
1. INTRODUCCIÓN.....	51
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53

2.1. Selección de sitios de estudio	53
2.2. Método de muestreo	55
2.3. Variables evaluadas.....	56
2.4. Cuantificación de CLas en planta y vector	58
2.5. Análisis de datos	58
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1. Efectos unifactorial del sistema epidemiológico sobre la intensidad epidémica del HLB	61
3.2. Análisis temporal del comportamiento del HLB	64
3.3. Efecto multifactorial del sistema epidemiológico sobre la intensidad epidémica del HLB.....	67
4. CONCLUSIONES	76
5. REFERENCIAS.....	78
CAPÍTULO III	
IMPLICACION DEL MANEJO Y CRONICIDAD DE INFECCIÓN EN EL IMPACTO PRODUCTIVO DE <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> EN LIMÓN MEXICANO	
RESUMEN	86
1. INTRODUCCIÓN	87
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
2.1. Selección de los sitios de estudio.....	90
2.2. Evaluación de variables y cronicidad	91
2.3. Diagnóstico y Cuantificación de CLas	92
2.4. Análisis de datos	92
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93
3.1. Diagnóstico y Cuantificación de CLas	93
3.2. Implicación del manejo en el impacto productivo de CLas	95
3.3. Efecto de CLas en la calidad de fruta	97
3.4. Efecto de la cronicidad regional de CLas	99
4. CONCLUSIONES	105
5. REFERENCIAS.....	106
CAPÍTULO IV	
EPIDEMIOLOGÍA DEL HUANGLONGBING BAJO UNA CONDICIÓN ASINTOMÁTICA EN PUEBLA Y VERACRUZ, MÉXICO.....	
RESUMEN	113
1. INTRODUCCIÓN.....	114
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	116

2.1. Caracterización regional de CLas asintomático en planta y vector	116
2.1.1. Selección de los sitios de estudio.....	116
2.1.2. Sistema de muestreo y colecta de material vegetal e insectos.....	118
2.1.3. Estimación del número de generaciones potenciales (NGP) de <i>D. citri</i>	120
2.1.4. Cuantificación de la carga de inóculo regional de CLas	122
2.1.5. Análisis de datos.....	122
2.2. Caracterización de focos de infección de CLas asintomático.....	123
2.2.1. Selección del sitio de estudio.....	123
2.2.2. Sistema de muestreo y colecta de material vegetal e insectos	124
2.2.3. Diagnóstico molecular de CLas en tejido vegetal.....	125
2.2.4. Análisis de datos.....	125
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	126
3.1. Caracterización regional de CLas-asintomático en planta y vector	126
3.1.1. Análisis en planta	127
3.1.2. Análisis en vector	132
3.1.3. Generaciones Potenciales de <i>D. citri</i>	134
3.2. Caracterización de focos de infección de CLas asintomático.....	135
3.2.1. Análisis temporal	136
3.2.2. Análisis espacial.....	141
4. CONCLUSIONES	143
5. REFERENCIAS.....	144
CAPÍTULO V	
ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO REGIONAL DEL HUANGLONGBING EN PARAGUAY.....	149
RESUMEN	149
1. INTRODUCCIÓN.....	150
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	153
2.1. Fase de gabinete	153
2.2. Fase de campo	153
2.2.1. Muestreo regional.....	153
2.2.2. Muestreo parcelario	155
2.2.2.1. Método restrictivo a foco simple	155
2.2.3. Método en censo.....	156

2.2.4. Método “T”	157
2.3. Variables evaluadas	158
2.4. Análisis de datos	159
2.4.1. Fase preliminar	159
2.4.2. Fase de campo	159
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	162
3.1. Fase de gabinete	162
3.1.1. Análisis temporal.....	162
3.1.2. Análisis espacial.....	163
3.2. Fase de campo	165
3.2.1. Análisis regional.....	165
3.2.2. Análisis parcelario.....	170
4. CONCLUSIONES	175
5. REFERENCIAS	177
CAPÍTULO VI	
ÁREAS REGIONALES DE CONTROL DE <i>Diaphorina citri</i> (ARCOs) PARA EL MANEJO DEL HLB EN MÉXICO.....	
	181
RESUMEN	181
1. INTRODUCCIÓN	182
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	185
2.1. Regionalización del HLB en México.....	185
2.2. Enfoque temporal (<i>ET</i>).....	187
2.2.1. Análisis de datos.....	191
2.2.2. Representación de las estimaciones generadas	193
2.3. Enfoque espacial (<i>EE</i>).....	193
2.3.1. Método ponderativo de variables de inductividad epidémica del HLB.....	193
2.3.2. Potencial de dispersión del HLB	196
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	199
3.1.1. Enfoque temporal (<i>ET</i>).....	199
3.1.2. Enfoque espacial (<i>EE</i>).....	202
3.1.3. Análisis integrativo del <i>ET</i> y <i>EE</i>	206
4. CONCLUSIONES	215
5. REFERENCIAS.....	216

7. CONCLUSIONES GENERALES.....220

ANEXOS.

Anexo 1. Transectos definidos para evaluación de la delimitación del HLB en la región citrícola de San José Acateno, Puebla223

1.1. Transecto 1223

1.2. Transecto 2224

1.3. Transecto 3225

1.4. Transecto 4226

1.5. Transecto 5227

1.6. Transecto 6228

1.7. Transecto 7229

1.8. Georreferencias de sitios preliminares de muestreo.....230

Anexo 2. Mapas geosestadísticos de los focos de infección por fecha de muestreo232

Anexo 3. Protocolos de Laboratorio238

3.1. Protocolo CTAB para extracción de DNA/RNA total de tejido vegetal238

3.2. Protocolo de extracción de ADN de insectos.....239

3.3. Protocolo de PCR Tiempo Real tipo Cuantitativo (CLas)240

Anexo 4. Sistema Regional de Manejo Integrado del HLB (SIREMI-HLB) en Colima244

4.1. INTRODUCCIÓN.....244

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....246

4.2.1. Modelo del SIREMI-HLB246

4.2.2. Gestión de Datos247

4.2.3. Cronicidad de infección regional de CLas247

4.2.4. Extrapolación de la cronicidad regional de CLas.....248

4.2.5. Nivel de tecnificación de huertos.....249

4.2.6. Impactos de CLas en la producción249

4.2.7. Análisis nutrimental250

4.2.8. Algoritmos empleados.....250

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN253

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 2.1. Importancia de la actividad citrícola en México.	7
Cuadro 2.2. Características y procesos biológicos de vectores asociados a CLas, CLam y CLaf.	10
Cuadro 2.3. Pérdidas productivas estimadas con enfoques epidemiológicos, por efecto de la infección de CLas en diferentes especies citrícolas en el mundo.	14
Cuadro 2.4. Características y elementos diferenciales entre el enfoque regional y parcelario.	24
Cuadro 2.5. Epidemias del HLB en el Mundo parametrizadas con la incidencia final a nivel parcelario (Gottwald, 2010). Fuente: Mora-Aguilera <i>et al.</i> , 2014a.	26
Cuadro 2.6. Epidemias del HLB en México en huertos de limón mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i>) en Colima y limón persa (<i>Citrus latifolia</i>) en Nayarit y Yucatán, México.	28

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Escala nominal empleada para la evaluación de cinco variables a nivel de planta, en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante marzo a mayo de 2015.	56
Cuadro 2. Promedio de valores por variable evaluada en 191 huertos de 17 municipios de mayor importancia citrícola de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante febrero a abril de 2015. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$).	61
Cuadro 3. Coeficientes de correlación y niveles de significancia de 15 variables descriptivas estimadas en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante febrero a abril de 2015.	62
Cuadro 4. Modelos de regresión múltiple de la cronicidad del HLB con las variables significativas del sistema epidemiológico, en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante febrero a abril de 2015.	63
Cuadro 5. Parámetros del comportamiento temporal de la incidencia del HLB (porcentaje de municipios con HLB por estado evaluado) y tiempos de evaluación (meses) durante el periodo de 2010 a 2015, ajustados con el modelo Weibull ($1 - \exp^{-t/b}$). Análisis con datos de SENASICA, 2015.	65
Cuadro 6. Índice multivariado obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables del hospedante, patógeno, vector y manejo evaluadas en 191 huertos de los 17 municipios de mayor importancia citrícola de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante febrero a abril de 2015. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$). ...	67

CAPÍTULO III

- Cuadro 1.** Porcentaje de reducción de variables morfológicas y organolépticas de frutos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) en relación a la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en árboles cosechados de huertos con baja tecnificación (BT) de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$). 98
- Cuadro 2.** Cronicidad de CLas y nivel de tecnificación y su asociación con las características de los huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) cosechados para medir el impacto productivo de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente. 100
- Cuadro 3.** Pérdida productiva inducida por CLas, por municipio citrícola y por nivel de tecnificación de los huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*): baja tecnificación (BT) y alta tecnificación (AT), en los estados de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$). 103

CAPÍTULO IV

- Cuadro 1.** Número de árboles positivos a CLas-asintomático y número de plantas muestreadas por fecha de evaluación. 135
- Cuadro 2.** Características y parámetros de comportamiento temporal de CLas-sintomático en huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en Colima y limón persa (*Citrus latifolia*) en Nayarit y Yucatán, México. 139

CAPÍTULO V

- Cuadro 1.** Escala nominal para la evaluación de las variables del sistema epidemiológico en los 22 huertos de estudio en las regiones citrícolas de Paraguay durante noviembre, 2013..... 158
- Cuadro 2.** Matriz multivariada de 22 huertos seleccionados considerando variables de los subsistemas del sistema epidemiológico evaluadas en 20 plantas por huerto. 160
- Cuadro 3.** Características de los siete huertos con presencia del HLB evaluados para determinar el efecto de la erradicación y el tipo de patrón espacial en Paraguay..... 170
- Cuadro 4.** Incidencia temporal restrictiva a un área de 1 ha en dos huertos de San Pedro del Paraná en Itapúa y Buena Vista, Caazapá, Paraguay. 172
- Cuadro 5.** Patrón espacial del HLB determinado mediante los índices de dispersión de Morisita y Lloyd de dos huertos con antecedentes de erradicación en los Departamentos de mayor intensidad epidémica del HLB: Itapúa y Caazapá, Paraguay, con datos de la evaluación realizada en la presente investigación en noviembre, 2013..... 173

CAPÍTULO VI

Cuadro 1. Modelos epidémicos espacio-temporales por región, especie citrícola y escenario epidémico. 187

Cuadro 2. Tasas de dispersión mensual del HLB, por gradiente, en cuatro escenarios epidémicos..... 197

ANEXOS

Anexo 4. Sistema Regional de Manejo Integrado del HLB (SIREMI-HLB) en Colima

Cuadro 1. Parámetros de modelos empleados como algoritmos para realizar las estimaciones en la plataforma ARCOs. 252

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 2.1.** Distribución Mundial de *Candidatus Liberibacter* spp. Fuente: SINAVEF, 2016. 11
- Figura 2.2.** Distribución nacional de *Candidatus Liberibacter asiaticus* a Marzo, 2016. Fuente: SENASICA, 2016. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>..... 12
- Figura 2.3.** Número de árboles detectados positivos a CLas, la bacteria causante del HLB en México, en dos regiones epidémicas más contrastantes de México. Con datos de SENASICA, 2016. Fuente: Mora-Aguilera *et al.*, 2014a. 18
- Figura 2.4.** Efecto de liberaciones de *T. radiata* sobre el número de ninfas de *D. citri*, en Colima. Fuente: Arredondo-Bernal, 2013. 20
- Figura 2.5.** Propuesta de rotación de insecticidas para manejar la resistencia del PAC. Con base en brotación, dinámica poblacional y biología de DC y condiciones ambientales. Fuente: Cortéz *et al.*, 2013. 21
- Figura 2.6.** Epidemias del HLB ajustadas a modelos temporales a tres niveles espaciales: A) regional o estatal, B) subregional o municipal y C) parcelario. Con datos de SENASICA, 2016, Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011; Loeza-Kuk *et al.*, 2010. 30
- Figura 2.7.** Gradientes de dispersión de CLas a partir de focos iniciales en Yucatán y Quintana Roo, con distancias entre 25 y 80 km, en contra y a favor de los vientos, respectivamente. Fuente: Flores-Sánchez *et al.*, 2011. 32

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Gráficos temporales de la incidencia del HLB (porcentaje de municipios con HLB) en A) Colima, B) Michoacán, C) Yucatán, D) Q. Roo y E) Campeche, durante el periodo de 2010 a 2015. Las líneas y modelos representan el ajuste del modelo Weibull $(1 - \exp^{-t/b})^c$, donde b y c son parámetros. Análisis con datos de SENASICA, 2015. 66
- Figura 2.** Regionalización de la intensidad epidémica del HLB con base en un índice multivariado obtenido a partir de cuatro factores principales asociados a ocho variables del hospedante, patógeno, vector y manejo, evaluadas en 35 huertos de Tecmán y Armería, durante febrero a abril de 2015. La escala denota el índice multivariado. El color rojo intenso indica mayor nivel de inductividad e intensidad epidémica. 69
- Figura 3.** Regionalización de la intensidad epidémica del HLB con base en un índice multivariado obtenido a partir de cuatro factores principales asociados a ocho variables del hospedante, patógeno, vector y manejo, evaluadas en 133 huertos de los municipios de mayor importancia citrícola del estado de Michoacán, durante febrero a abril de 2015. La escala denota el índice multivariado. El color rojo intenso indica mayor nivel de inductividad e intensidad epidémica. 70

Figura 4. Regionalización de la intensidad epidémica del HLB con base en un índice multivariado obtenido a partir de cuatro factores principales asociados a ocho variables del hospedante, patógeno, vector y manejo, evaluadas en 30 huertos de los municipios de mayor importancia citrícola de la Península de Yucatán, durante febrero a abril de 2015. La escala denota el índice multivariado. El color rojo intenso indica mayor nivel de inductividad e intensidad epidémica.71

CAPÍTULO III

Figura 1. Relación entre la concentración de CLas (número de copias del gen 16S ADNr de la bacteria x 1'000,000) y la cronicidad de infección de infección de CLas (promedio de la severidad de 100 árboles por huerto) en 56 huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) con BT de las zonas citrícolas de los estados de Colima (A) y Michoacán (B), durante 2014 y 2015. La línea y modelo representan el ajuste por regresión lineal simple.94

Figura 2. A) Relación entre la concentración de CLas (número de copias del gen 16S ADNr de la bacteria x 1'000,000) y la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en 900 árboles cosechados de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) y B) Comparación de medias de la concentración de CLas en Colima (2014) y Michoacán (2015). Las líneas y modelos representan el ajuste por regresión lineal simple. Barras con al menos una letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey, $P<0.05$). Las líneas en las barras representan el error estándar.....95

Figura 3. Promedio porcentual de pérdida productiva por: A) nivel de tecnificación de los 56 huertos y B) cronicidad de infección de CLas (promedio de la severidad de 100 árboles por huerto), en huertos con BT y AT de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) de las zonas citrícolas de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015. Barras con al menos una letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey, $P<0.05$). Las líneas en las barras representan el error estándar. Símbolos diferentes indican diferentes estados y nivel de tecnificación de los huertos. Las líneas representan el ajuste por regresión lineal simple.96

Figura 4. Relación entre la producción (kg) obtenida y la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en árboles de huertos con baja tecnificación (BT) en: Colima (A) y Michoacán (B), durante 2014 y 2015. Símbolos diferentes indican huertos diferentes. Las líneas y modelos representan el ajuste por regresión lineal simple por estado. Datos de huertos con AT no se ajustaron por no mostrar diferencias significativas.97

CAPÍTULO IV

Figura 1. Mapa regional de la zona de muestreo de cítricos en Puebla y Veracruz con polígono citrícolas..... 116

Figura 2. Interface en MS-Excel para determinar número de huertos citrícolas a muestrear por ruta transectual en la región Puebla-Veracruz (Acateno-Papantla, Martínez de la Torre, Tlapacoyan). 117

Figura 3. Interface en MS-Excel de la herramienta Trans-N aleatorio. Ejemplo transecto 2. Notar distancia inicio y distancia entre sitios o parcelas de cítricos a muestrear.	117
Figura 4. Plan de muestreo transectual con sitios o huertos de cítricos tentativos a muestrear y georreferencia para ubicación en campo. Ejemplo del transecto 1.	118
Figura 5. Sistema de muestreo “T” para evaluar efecto de bordo y dispersión interna. Notar que se seleccionan 20 plantas en total, las cuales se intercalan 1 cada 3, según línea de muestreo.	119
Figura 6. Colecta de adultos de <i>D. citri</i> para cuantificación de concentración de CLas.	120
Figura 7. Diagrama de Esquema de método del seno interceptado por dos umbrales	121
Figura 8. Distribución de focos estudiados en el huerto El Ocotillo, San José Acateno, Puebla, primera detección de cítricos infectados con CLas sin presentar síntomas característicos del HLB.	123
Figura 9. Sistema de muestreo a partir del centroide de foco o planta erradicada, en etapas en función de árboles positivos. En la etapa inicial el foco se constituye de 8 plantas vecinas seleccionadas en el sentido de las manecillas del reloj. En las siguientes etapas se incrementa 2 o 3 veces, según positivos.	124
Figura 10. Región en la cual se desarrolló el estudio regional del estatus epidémico de CLas-asintomático. Incluye los municipios citrícolas de San José Acateno y Tenanpulco, Puebla y Martínez de la Torre, Tlapacoyan y Papantla, Veracruz.	126
Figura 11. A) Número de árboles positivos y B) Concentración de CLas (Logaritmo del número de copias del gen 16S ADN _r X 1'000,000), por fecha de muestreo, en la región citrícola de Puebla-Veracruz. Líneas en las barras indican el error estándar.	127
Figura 12. Mapas interpolados del número de árboles asintomáticos positivos a CLas, por fecha de muestreo A) agosto y B) noviembre.	129
Figura 13. Gráficos del número de positivos y distancias entre sitios de muestreo para cada transecto: T1 a T7, a partir de huertos positivos considerados como focos iniciales por mayor concentración de CLas, en la región de Puebla y Veracruz.	130
Figura 14. Concentración de CLas en muestras de insectos de la región citrícola de Puebla-Veracruz. A) Número de muestras positivas y B) Concentración máxima de CLas, por fecha de muestreo. Líneas en las barras indican el error estándar.	132
Figura 15. Comparación de carga de inóculo representado por el logaritmo de la cantidad de CLas presentes en muestras: A). Vegetales y B) Vector, en las regiones de Puebla y Colima. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas por Tukey ($P \leq 0.05$). Líneas en las barras indican el error estándar.	133
Figura 16. Número de Generaciones Potenciales (NGP) de <i>D. citri</i> al año, estimadas en el presente estudio para la región de Puebla y Veracruz con datos climáticos de dos periodos de brotación, y la región de Colima y Michoacán con datos climáticos de todo el año por brotación constante.	134

Figura 17. Número de árboles positivos a CLas por foco (A) y por fecha (B) en el huerto El Ocotillo, San José Acateno, Puebla, primera detección de asintomáticos en la región.	137
Figura 18. Gráficos temporales del número de positivos ajustados con el modelo Weibull para los focos A) 1, B) 2, C) 3, D) 4, E) 5 y F) 6. Las líneas y modelos para los focos 2, 5 y 6 representan el ajuste con el modelo Weibull.	138
Figura 19. Comportamiento temporal del HLB en dos huertos de Tecomán, Colima y su ajuste con el modelo de Weibull. Análisis con datos de Robles-González <i>et al.</i> , 2013.	139
Figura 20. Mapas geoestadísticos del índice de positivos (<i>IndPos</i>) (Umbral de Ct para determinar una muestra positiva (36 Ct) menos el valor del Ct de cada muestra) en el mes de junio (mayor presencia de positivos) por foco del huerto El Ocotillo, San José Acateno, Puebla.	142

CAPÍTULO V

Figura 1. Interfase MS-Excel para el cálculo del número de sitios de muestreo por Departamento con cítricos cultivados en Paraguay, estimados con base en la metodología Reg-N, la cual se basa en un método ponderativo para estimar un factor de riesgo por cada unidad espacial.	155
Figura 2. Evaluación de la putativa zona de dispersión activa mediante un censo restrictivo en foco simple. Fuente: Domínguez-Monge, 2011.	156
Figura 3. Sistema de muestreo “T” para evaluar efecto de bordo. Notar que se seleccionan 20 plantas en total, las cuales se intercalan 1 cada 3, seguir línea de muestreo.	158
Figura 4. Comportamiento temporal del HLB en Paraguay a nivel A): Regional (incidencia del HLB en Departamentos con producción de cítricos) y a nivel subregional (incidencia del HLB en distritos citrícolas) en: B) Itapúa, C) Caazapá, y D) Alto Paraná. Análisis con datos oficiales del SENAVE, 2013a.	163
Figura 5. Ocurrencia y distribución del HLB por fecha de detección durante el periodo de febrero (primera detección) a septiembre 2013. Análisis con datos del SENAVE, 2013a.	164
Figura 6. Promedio de adultos de <i>D. citri</i> capturados en trampas amarillas en huertas de naranja Valencia, mandarina `Ponkan` y Tangor `Murcott` en Taquaritinga, SP, Brasil. Fuente: Beloti <i>et al.</i> 2013.	165
Figura 7. Plagas cuarentenarias de los cítricos: A y B) Cancro cítrico, C y D) Leprosis de los cítricos, E) Pulgón café y F) Mancha negra, presentes en las regiones citrícolas de Paraguay, evaluadas en el muestreo regional del HLB durante noviembre, 2013.	167
Figura 8. Mapa interpolado del índice multivariado estimado con el análisis de componentes principales y factores a partir de variables del sistema epidemiológico.	169

Figura 9. Mapas geoestadísticos de A) incidencia (presencia/ausencia) y B) severidad del HLB en los huertos S. P. Paraná en Itapúa y Buena Vista en Caazapá, Paraguay; evaluado durante noviembre de 2013.....	173
---	-----

CAPÍTULO VI

Figura 1. Distribución actual del HLB en México y regionalización en tres escenarios epidémicos empleados para el estudio de estimación de ARCOs. Fuente: Con edición de imagen SENASICA, 2015.	185
Figura 2. Enfoques epidemiológicos para la estimación de Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs) con base en el tipo de inóculo: A) Enfoque temporal: evalúa el efecto de estrategias preventivas y protectivas a nivel parcela con el fin de reducir la velocidad epidémica y B) Enfoque espacial: emplea riesgo regional con base en método ponderado variables del sistema epidemiológico y tasas de dispersión del HLB. Fuente: Mora-Aguilera <i>et al.</i> , 2014.	186
Figura 3. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario Región Península de Yucatán y Golfo de México aplicado a todas las especies cítricas.	188
Figura 4. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario Región Pacífico. Caso Limón mexicano.....	189
Figura 5. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario Región Pacífico. Caso Limón persa.....	189
Figura 6. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario Región Pacífico. Caso Cítricos dulces.	190
Figura 7. Mapa de selección de estados por escenario epidémico del HLB en México. La figura muestra las tres zonas en las cuales se regionalizó epidemiológicamente.....	190
Figura 8. Aplicación desarrollada en MS-Excel para visualizar las estimaciones de riesgo regional a partir de la selección de multicriterios.....	193
Figura 9. Aplicación Reg-N desarrollada en MS-Excel para la estimación del riesgo regional a partir de variables de inductividad epidémica.	194
Figura 10. Modelo de dinámica poblacional de <i>D. citri</i> generado por Torres-Pacheco <i>et al.</i> , 2013.	195
Figura 11. Modelo epidemiológico general para la estimación de un área regional de control (ARCO) basado en el concepto de gradiente asimétrico de dispersión de CLas por <i>D. citri</i>	197
Figura 12. Aplicación @RCOs desarrollada en MS-Excel para la estimación de hectáreas en riesgo, a partir del riesgo regional y tasa de dispersión del HLB.	198
Figura 13. Porcentaje de hectáreas en riesgo con HLB estimadas mediante modelos temporales para el 2015, por región epidémica en México.	199
Figura 14. Mapa de hectáreas (ha) a establecerse en ARCOs para el manejo regional del HLB a nivel municipio para el 2015, estimadas con el enfoque temporal epidemiológico.	200

Figura 15. Hectáreas cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región <i>GOLFO</i> , la cual incluye los estados de BC (Baja California), GRO (Guerrero), HGO (Hidalgo), MOR (Morelos), NL (Nuevo León), OAX (Oaxaca), PUE (Puebla), QRO (Queretaro), SLP (San Luis Potosí), SON (Sonora), TAB (Tabasco), TAM (Tamaulipas), VER (Veracruz) y ZAC (Zacatecas), estimadas mediante el enfoque temporal epidemiológico.	201
Figura 16. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región <i>PEN</i> , la cual incluye los estados de BCS (Baja California Sur), CAM (Campeche), CHIAPAS (Chiapas), Q. ROO (Quintana Roo) y YUC (Yucatán), estimadas mediante el enfoque temporal epidemiológico.	201
Figura 17. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región <i>PCO</i> , la cual incluye los estados de COL (Colima), JAL (Jalisco), MICH (Michoacán), NAY (Nayarit) y SIN (Sinaloa), estimadas mediante el enfoque temporal epidemiológico.....	202
Figura 18. Hectáreas (ha) (%) a ser establecidas en ARCO para el manejo regional del HLB, estimadas con el método ponderativo de variables de inductividad epidémica y potencial de dispersión del HLB.	203
Figura 19. Mapa de hectáreas (ha) potenciales a ser establecidas en ARCO para el manejo regional del HLB, estimadas con el método ponderativo de variables de inductividad epidémica y potencial de dispersión del HLB.	203
Figura 20. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región <i>GOLFO</i> , la cual incluye los estados de BC (Baja California), GRO (Guerrero), HGO (Hidalgo), MOR (Morelos), NL (Nuevo León), OAX (Oaxaca), PUE (Puebla), QRO (Queretaro), SLP (San Luis Potosí), SON (Sonora), TAB (Tabasco), TAM (Tamaulipas), VER (Veracruz) y ZAC (Zacatecas), estimadas mediante el enfoque espacial epidemiológico.	204
Figura 21. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región <i>PEN</i> , la cual incluye los estados de BCS (Baja California Sur), CAM (Campeche), CHIAPAS (Chiapas), Q.ROO (Quintana Roo) y YUC (Yucatán), estimadas mediante el enfoque espacial epidemiológico.	205
Figura 22. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región <i>PCO</i> , la cual incluye los estados de COL (Colima), JAL (Jalisco), MICH (Michoacán), NAY (Nayarit) y SIN (Sinaloa), estimadas mediante el enfoque temporal epidemiológico.....	205
Figura 23. Gráficos comparativos de las hectáreas estimadas con el enfoque temporal (<i>ET</i>) y con el enfoque espacial (<i>EE</i>), considerando todos los estados cítricos.....	207
Figura 24. Gráficos comparativos de las hectáreas estimadas con el enfoque temporal (<i>ET</i>) y con el enfoque espacial (<i>EE</i>), sin datos de Veracruz, SLP y Tabasco.	208
Figura 25. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB en la región <i>GOLFO</i> , estimadas mediante las metodologías: A) modelos temporales y B) método ponderativo.	210

Figura 26. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB en la región PEN, estimadas mediante las metodologías: A) modelos temporales y B) método ponderativo.	211
Figura 27. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB en la región PCO, estimadas mediante las metodologías: A) modelos temporales y B) método ponderativo.	212
Figura 28. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB en la región PCO, estimadas mediante las metodologías: A) modelos temporales y B) método ponderativo.	213

ANEXOS.

Anexo 4. Sistema Regional de Manejo Integrado del HLB (SIREMI-HLB) en Colima

Figura 1. Modelo General del SIREMI-HLB.	246
Figura 2. Escala de severidad de HLB en árboles de limón mexicano empleada para determinar cronicidad y seleccionar árboles para estimar el impacto productivo inducido por CLas.	247
Figura 3. Mapa de la cronicidad regional de infección de CLas integrado por: A) Malla de cuadrantes de 1x1 km y B) Mapa interpolado de la cronicidad de infección de CLas en 32 huertos de Tecomán y Armería, Colima.	248
Figura 4. Esquema de gestión y análisis de datos y salidas del modelo interactivo para el manejo del HLB.	251
Figura 5. Vista pública de plataforma SIREMI-HLB (http://infit.org.mx/SIREMI-HLB/). Menú amigable para uso de productores.	253
Figura 6. Registro de usuario a nivel privado en la plataforma SIREMI-HLB, dirigido principalmente a productores.	254
Figura 7. Vista principal del área privada, la cual tiene un menú amigable con el productor con componentes como: cadena productiva, Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs), datos de DC, datos de clima y un área de correo electrónico.	255
Figura 8. Vistas de la encuesta sobre el nivel de tecnificación clasificada por: datos generales, riego, nutrición, manejo fitosanitario y manejo de HLB.	256
Figura 9. Vista de: A) la ubicación del huerto registrado por el productor en el mapa del estado de Colima, B) el nivel de cronicidad de infección de CLas, el cual se asocia por cercanía a los huertos evaluados en el estudio <i>in situ</i> de la cronicidad regional; y C) el nivel de tecnificación del huerto.	257

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

México ocupa el cuarto lugar en producción mundial de cítricos con 559,874 hectáreas y una producción de 7'556,797 toneladas con un valor estimado de 13'661,775 millones de pesos (FAOSTAT, 2015; SIAP, 2016). Los principales estados productores son Veracruz, Michoacán, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León, Puebla, Oaxaca y Colima (SIAP, 2016). Sin embargo, existen diversos problemas agronómicos, tecnológicos y fitosanitarios que ponen en riesgo la producción citrícola y la rentabilidad de esta actividad económica. Entre los fitosanitarios resalta el Huanglongbing de los cítricos (HLB), la cual es una enfermedad pandémica de alta importancia socio-económico actual que afecta a estos frutales.

En México, el HLB se detectó por primera vez en Julio de 2009 en Tizimín, Yucatán y se asocia a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), la cual se transmite por el vector *Diaphorina citri* (DC). El gobierno federal emprendió estrategias preventivas de comunicación y evaluación de riesgo (Salcedo *et al.*, 2010), así como un extensivo sistema de monitoreo y detección de CLas en planta y vector (SENASICA, 2010). Actualmente, en coadyuvancia con organismos auxiliares y otras dependencias estatales se impulsó un programa de manejo regional de DC (ARCOs). Con base en este sistema oficial se tiene estimado que el HLB se encuentra presente en 19 de los 24 estados citrícolas del país (SENASICA, 2016). El comportamiento epidémico del HLB permitió definir dos escenarios epidémicos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a): 1) Región del Pacífico, con mayor intensidad epidémica y con prevalencia en huertos comerciales de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) y limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka); esta región se integra por los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (SIAP, 2016), y 2) Península de Yucatán, con menor intensidad epidémica y con baja a moderada prevalencia en traspatios y con naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), como la especie de mayor riesgo; esta región se integra por los estados de Quintana Roo, Campeche, y Yucatán (SIAP, 2016). Sin embargo, esta aseveración se basa únicamente en los reportes de plantas e insectos con CLas por parte del sector oficial de Sanidad Vegetal de México (SENASICA, 2016) y requiere de una parametrización formal biológica y epidemiológica.

El estudio de las condiciones inductivas para el desarrollo epidémico del HLB requiere un enfoque regional, el cual permita el entendimiento holístico de los factores involucrados en complemento de las detecciones oficiales para la inmediata aplicación de un manejo regional. Éste enfoque regional en estudios fitosanitarios es un desafío y una oportunidad de desarrollo que provee una visión de sustentabilidad productiva, ya que integra la sanidad de los cultivos como el eje central de la problemática, por lo que permite entender con mayor claridad a las poblaciones de patógenos y organismos plaga y su interacción con los cultivos (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b). Un ejemplo de la importancia de una visión regional es el efecto del cambio climático en la sanidad de cultivos, el cual sería complicado entender y explicar con estudios en una dimensión espacial local o parcelaria (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014d; Parnell *et al.*, 2012).

En el control de plagas insectiles, Hendrichs *et al.* (2007) acuñaron el concepto de manejo integrado de plagas en áreas amplias (enfoque regional) e indicaron que este enfoque es mejor que el manejo integrado de plagas a nivel parcelario, debido principalmente, a que reduce las poblaciones de insectos plagas durante mayor tiempo, reduce el uso de insecticidas por lo que tiene un menor efecto ambiental y también reduce los costos de aplicación. Hendrichs *et al.* (2007) señalaron que el enfoque parcelario es altamente reactivo y se basa en el control de la plaga cuando los niveles de la misma tienen implicación económica, mientras que el enfoque regional o de áreas amplias es preventivo y sustentable al cubrir una mayor área y tener un efecto duradero en la reducción de las poblaciones de la plaga. Por su parte, Mora-Aguilera *et al.* (2014a) propusieron un modelo conceptual que integra principios biológicos con niveles de integración espacial para aplicar distintas estrategias de control y manejo en relación a la estabilidad del sistema agroecológico.

Las experiencias en Brasil, EUA, China, África y México, indican que el enfoque de control regional de DC representa la estrategia de mayor eficiencia en el manejo del HLB, ya que reduce la dispersión del inóculo secundario y minimiza los costos de aplicación, en complemento a la erradicación de fuentes de inóculo primario y al uso de material vegetal certificado (Bassanezi *et al.*, 2013; Bové, 2006); sin embargo, la eliminación de árboles enfermos es una opción inviable en regiones cítrícolas con un escenario endémico del HLB (Belasque *et al.*, 2009; Fritz, 2011), es decir regiones con una distribución homogénea y

crónica de la enfermedad. La eliminación de árboles enfermos implica un sistema de vigilancia, monitoreo y un manejo efectivo de focos de infección (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c).

La importancia de lo anterior radica en que el HLB carece de un método de control directo y el hecho que CLas afecte a todas las especies de cítricos reduce las posibilidades de mejoramiento de variedades resistentes (Xu *et al.*, 2013); a pesar de esto, existen estudios sobre materiales que presentan tolerancia o que prolongan la vida productiva de huertas cítricas (Stuchi *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2013) y sobre agentes inductores de resistencia sistémica adquirida que reducen la dispersión y contagio entre plantas (Bagio *et al.*, 2014). Sin embargo, requieren más trabajo y su liberación como estrategia es aún incierta.

Por lo anterior, se requiere una estrategia de manejo integrado del cultivo, la cual se base en la nutrición (Hernández-Chan *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2014; Gottwald *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011), manejo hídrico y del suelo (Campos-Herrera *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013), altas densidades de plantación (Stuchi y Girardi, 2010; Skaria y Hanagriff, 2008; Medina-Urrutia *et al.*, 2004), programas de renovación frecuente de plantaciones y de ciclo corto (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012), y el control regional del vector DC mediante productos químicos y biológicos (Bassanezi *et al.*, 2013; Stansly *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2011; Sandoval-Reyes *et al.*, 2013; López-Arroyo *et al.*, 2012; Mora-Aguilera *et al.*, 2014a).

La importancia de CLas se demostró con estudios epidemiológicos de impactos productivos encontrándose pérdidas en rendimiento del 40 al 100% para naranja dulce (Bassanezi *et al.*, 2009, 2011), del 17% en limón persa (Flores-Sánchez *et al.*, 2015), y del 62% en limón mexicano (Robles-González *et al.*, 2013). Sin embargo, esos estudios no incluyeron al manejo agronómico, cronicidad de infección y regionalidad, por lo que la información que generaron se considera es restrictiva en un enfoque integral del problema. Otras investigaciones consideraron indicadores de costo-beneficio del manejo del HLB y concluyeron que la ganancia neta sería igual que la obtenida bajo un escenario de cero manejo de esta enfermedad, por el costo de insumos y su aplicación (Lopez and Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012); no obstante su análisis careció de un enfoque de campo con la evaluación de prácticas agronómicas empleadas para el manejo del HLB. Estudios del impacto potencial de CLas en México y otras países se realizaron con criterios

principalmente socio-económicos (Singerman and Useche, 2015; Lopez and Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012) y eventualmente con criterios epidemiológicos (Salcedo *et al.*, 2010) permitiendo determinar, en este caso, mediante modelos de simulación los impactos a distintos escenarios de tiempo según la región y tipo de criterio.

En cuanto a la cronicidad de infección, es un concepto que se usa con frecuencia en humanos y hace referencia a una enfermedad sistémica con un establecimiento permanente, a la cual se le da seguimiento temporal para evaluar el comportamiento patogénico del agente infeccioso y control de la misma, con el fin de mantener la calidad de vida de los pacientes, en este grupo de enfermedades se encuentran la hepatitis, diabetes, cáncer y problemas cardiovasculares (Ali *et al.*, 2010; Osougwu *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2014). En el caso de enfermedades de plantas el concepto de cronicidad no se ha aplicado probablemente porque la fenología de los cultivos, biología de los agentes infecciosos y prácticas agronómicas condicionan y limitan el seguimiento temporal por varios años de algunos de estos problemas fitopatológicos.

En este sentido, se puede definir que cronicidad es la asociación permanente y sistémica de un agente infeccioso con el hospedante causando una degeneración de la esperanza de vida del huésped en función de medidas de mitigación adoptadas. Por su naturaleza se aplicaría a cultivos perenes como los frutales y árboles forestales.

En el caso de los cítricos es fundamental la aplicación de este concepto dado que la condición sistémica de varios agentes infecciosos como virus, viroides y fitoplasmas ha propiciado mecanismos de adaptación entre los cuales se puede citar la protección cruzada (Souza *et al.*, 2002; Van Vuuren *et al.*, 1993), efectos de supresión inter-específica (Van Vuuren *et al.*, 2000) o la selección natural de cepas moderadas (Rivas-Valencia *et al.*, 2010).

En el contexto de CLas, debido a su naturaleza sistémica y a la ausencia de germoplasma resistente, es de esperarse un proceso adaptativo infeccioso al hospedante que debe estudiarse desde una perspectiva epidemiológica con fines de manejo de la enfermedad. Entender el efecto de CLas en los niveles de pérdidas permitiría estimar tiempos de vida útil de las plantas, p.e. umbral de rentabilidad; así como la comprensión de los efectos fisiológicos permitiría generar esquemas de mitigación integrales que incluyan el uso de

altas densidades de plantación para compensar impacto productivo, manejo nutrimental y manejo hídrico.

En este contexto, este estudio se planteó con un enfoque regional bajo distintos escenarios epidémicos con el propósito de coadyuvar al entendimiento del HLB con fines de manejo.

Específicamente se propusieron los siguientes objetivos:

- Determinar y sustentar las bases biológicas y epidemiológicas del comportamiento regional de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en México, mediante métodos multifactoriales para generar herramientas que coadyuven al manejo del HLB bajo modelos operativos coordinados por el sector oficial y extensivos al sector de producción primario.
- Estimar el impacto productivo de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en relación al manejo agronómico y a la cronicidad de infección, en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) del Pacífico, con el fin de identificar prácticas tecnológicas de mitigación que propicien la sustentabilidad de la producción citrícola.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de la citricultura

La citricultura es para muchos países una actividad agrícola altamente rentable. Más de 107 millones de toneladas se producen al año. Entre los principales países productores se encuentran Brasil, EUA, China, México y España, los cuales conforman una superficie citrícola de más de 3.5 millones de hectáreas (FAOSTAT, 2015). Las principales especies cultivadas en diversos climas tropicales y subtropicales del mundo son naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L) Osbeck), limón mexicano (*C. aurantifolia* (L) Swingle), limón persa (*C. latifolia*, Tanaka) mandarina (*C. reticulata* (L)) y pomelo (*C. paradisi* (Macf.)) (Orozco-Santos *et al.*, 2014; Ramírez *et al.*, 2000).

México, ocupa el cuarto lugar en producción mundial de cítricos con 559,874 hectáreas y una producción de 7'556,797 toneladas, con un valor estimado de 13'661,775 millones de pesos (FAOSTAT, 2015; SIAP, 2016). Los principales estados productores son Veracruz, Michoacán, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León, Puebla, Oaxaca y Colima (SIAP, 2016) (Cuadro 2.1). De la superficie establecida, el 68.5% corresponde a naranja, 20.5% a limón mexicano, 5.2% a limón persa y el resto a toronjas, mandarinas y tangerinas (SIAP, 2016). La mayor rentabilidad bruta la representa el limón mexicano y limón persa a pesar de su menor superficie.

La citricultura genera aproximadamente 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos, por lo que es una actividad agrícola de gran importancia para la economía del país y para las miles de familias beneficiadas (Dirección General de Fomento a la Agricultura, 2007; Trujillo *et al.*, 2008).

Cuadro 2.1. Importancia de la actividad citrícola en México.

Estado	Región Geográfica	Superficie (ha)	Producción (to)	Valor de Producción (Miles de pesos)	Número de productores
Veracruz	C-G	240,034	3,370,999	5,075,027	1,335
Michoacán	PCO	48,364	572,167	2,001,628	2,115
Tamaulipas	C-G	41,375	970,267	1,235,376	426
San Luis Potosí	C-G	40,759	437,398	541,704	296
Nuevo León	C-G	31,324	357,526	517,284	82
Puebla	C-G	30,277	303,820	349,961	531
Oaxaca	PCO	25,407	252,256	581,026	401
Colima	PCO	19,922	274,968	950,335	1,474
Yucatán	PEN	18,655	276,497	639,064	11,429
Tabasco	PEN	15,529	166,399	391,516	431
Guerrero	PCO	7,424	78,799	203,022	1,330
Sonora	Norte	7,296	144,019	257,042	222
Jalisco	PCO	6,264	78,906	264,540	594
Hidalgo	C-G	5,691	54,031	51,250	401
Campeche	PEN	4,920	48,875	154,941	428
Chiapas	PEN	4,700	21,545	44,029	632
Baja California Sur	Norte	2,861	59,352	143,067	159
Q. Roo	PEN	2,770	35,884	123,499	671
Sinaloa	Norte	2,456	17,150	30,621	178
Nayarit	PCO	2,439	17,974	43,616	512
Morelos	C-G	542	8,995	33,173	310
Baja California	Norte	394	4,861	16,295	140
Querétaro	C-G	260	2,550	5,797	146
Zacatecas	C-G	205	1,549	7,951	50
Total	4	559,873	7'556,798	13'661,775	24,293

C-G: Centro-Golfo, PCO: Pacífico, PEN: Península de Yucatán. Fuente: SIAP, 2016.

No obstante, la citricultura es afectada por problemas fitosanitarios, de comercialización, productividad, entre otros. En cuanto a problemas fitosanitarios, los cítricos son atacados por plagas y enfermedades de importancia económica y cuarentenaria como: el Virus Tristeza de los Cítricos (CTV) y su vector el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*) (Hernández-Nava, 2013; Patiño-Arellano, 2012; Loeza-Kuk *et al.*, 2008), el virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) y sus vectores, ácaros pertenecientes al género *Brevipalpus* (Sánchez-Velázquez *et al.*, 2015; Childers *et al.*, 2001), y el Huanglongbing de los cítricos (HLB) y sus vectores *Diaphorina citri* y *Trioza erytrae*, siendo ésta última, la enfermedad que actualmente se considera la más importante en las regiones cítricas del mundo debido a su actual proceso de dispersión y establecimiento generando condición epidémica de intensidad variable (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a, 2014c, 2014d; Bové, 2006; Da Graca, 1991; Aubert *et al.*, 1984; Gottwald *et al.*, 2006; 1989; Garnier *et al.*, 2000).

2.2. Antecedentes del Huanglongbing de los Cítricos

El Huanglongbing (HLB) hace referencia a la inducción de brotes amarillos, también se le conoce como dragón amarillo o enverdecimiento de los cítricos, ya que describe los síntomas observados: brotes de un color amarillo brillante, que normalmente se producen en un sector de un árbol infectado (FUNDECITRUS, 2007; Brlansky *et al.*, 2009). Sin embargo, los síntomas son variables y amarillamiento puede presentarse según el tiempo de infección, y tipo y combinación de injerto-portainjerto (Esquivel-Chávez, 2012; Esquivel-Chávez, 2016). El primer reporte de esta enfermedad se realizó a finales del siglo XIX por citricultores del sur de China y se caracterizó por provocar la muerte de árboles en un lapso de 1 a 2 años y permaneció sin definirse el agente causal (Zhao, 1981).

Esta enfermedad es considerada una de las más importantes amenazas en cuanto a sustentabilidad y comercialización de la producción cítrica mundial. Cuando se establece el agente causal infecta los cítricos de casi todos los cultivares, causando grandes pérdidas al acortar el periodo de vida de los árboles afectados (Chen *et al.*, 2009). En México, las pérdidas estimadas son mayores en limón mexicano con valores en el rango del 13 al 70% dependiendo del nivel tecnológico (Robles-González *et al.*, 2013; LANREF, 2016). En limón persa se estimó un impacto en la producción del 17% (Flores-Sánchez *et al.*, 2015).

En naranja dulce las pérdidas en el país carecen de cuantificación debido a procesos epidémicos de baja intensidad contrastando con otros países (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b) Hasta la fecha se conocen tres especies patogénicas, *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf), *Ca. Liberibacter asiaticus* (CLas) y *Ca. Liberibacter americanus* (CLam) (Bove, 2006). Los vectores son dos especies de la familia Liviidae (Hemiptera): *Trioza erythrae* (TE) que dispersa la especie africana y *Diaphorina citri* (DC) para las especies asiática y americana (Cuadro 2.2) (Hall *et al.*, 2013; Garnier *et al.*, 2000; Texeira *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2007). También es transmitido por material vegetal de propagación (yemas infectadas). No se transmite por semilla ya que se produce el aborto del embrión (Bove, 2006). En el continente americano CLas y CLam coexistieron en San Pablo, Brasil (Texeira *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2009). Actualmente, las evidencias indican que CLas desplazó a CLam por su habilidad adaptativa al rango climático y transmisibilidad, a pesar de que CLam es más agresivo (Lopes *et al.*, 2009).

Cuadro 2.2. Características y procesos biológicos de vectores asociados a CLas, CLam y CLaf.

Características/	<i>D. citri</i>	<i>T. erythrae</i>	Citas
Procesos biológicos			
Longevidad del insecto (días)	47	43	Garnier <i>et al.</i> , 2000; Hall <i>et al.</i> , 2013.
Temperatura del insecto (°C)	25-28	20-24	Garnier <i>et al.</i> , 2000; Hall <i>et al.</i> , 2013.
Bacteria asociada	CLas y CLam	Claf	Garnier <i>et al.</i> , 2000; Texeira <i>et al.</i> , 2005.
Adquisición (min)	15-30 (mayor en ninfas)	15-30	Inoue <i>et al.</i> , 2009; Pelz-Stelinski <i>et al.</i> , 2010.
Latencia (días)	1-25	S/I ^a	Roistacher, 1991.
Retención/ Eficiencia de transmisión	Toda la vida	Toda la vida	Inoue <i>et al.</i> , 2009; Pelz-Stelinski <i>et al.</i> , 2010.
Inoculación (hrs)	0.25-7	S/I	Buitendag and von Broembsen, 1993.
Tipo de transmisión	Persistente	Persistente	Inoue <i>et al.</i> , 2009.
Multiplicación en Vector	+	+	Hall <i>et al.</i> , 2013; Grafton-Cardwell <i>et al.</i> , 2013.
Transmisión transovárica	+	+	Pelz-Stelinski <i>et al.</i> , 2010; Grafton-Cardwell <i>et al.</i> , 2013.
Localización de la bacteria	Glándulas salivales	S/I	Ammar <i>et al.</i> , 2011.

^aS/I: Sin información.

2.3. Distribución mundial del HLB

Esta enfermedad fue reportada por primera vez en el continente asiático, al sur de China a finales del siglo XIX (Zhao, 1981), de ahí se deriva la nomenclatura de ‘*Ca. L. asiaticus*’ (CLas). Posteriormente se extendió por algunos países del Sureste Asiático, Subcontinente Indio, Medio Oriente y algunos países de África (Figura 2.1) (SENASA, 2016; OIRSA, 2008). En el año 1920, se detectó una nueva especie de *Candidatus* en Sudáfrica (Van Der Merwe and Andersen, 1937), la cual fue nombrada *Ca. L. africanus* (CLaf).

En marzo de 2004 y agosto de 2005, los síntomas de la enfermedad fueron reconocidos, respectivamente, en el Estado de São Paulo, Brasil, y en Florida, E. U. A., dos de las más grandes regiones productoras de cítricos en el mundo (Bové, 2006). En Florida se reportó a CLas, mientras que en Brasil en adición a la especie asiática, se encontró una nueva especie llamada *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (Teixeira *et al.*, 2005), la cual se encuentra restringida a una región de San Pablo y actualmente su incidencia es inferior al 3% (Colleta-Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005).

La especie asiática se ha dispersado por el continente Americano. En la región del Caribe y Centroamérica se detectó por primera vez en Cuba en el año 2006. A su vez en 2008, fue reportada en República Dominicana y al siguiente año otros países de Centroamérica como México, Belice, Honduras y Jamaica reportaron la presencia de la enfermedad. Durante el 2010, se sumaron Nicaragua y Guatemala. Mientras que en febrero de 2011 se reportó en Costa Rica (Da Graça, 2008; García, 2009; INTA, 2011;; NAPPO, 2012; SENA VE, 2013; Santivañez *et al.*, 2014). En enero de 2013 se detecta *Candidatus liberibacter* spp. en Paraguay (SENA VE, 2013). Mientras que en julio de 2014 esta bacteria es reportada en Corrientes, Argentina (Moyano y Leone, 2014; CABI, 2015). En este último lugar se reporta como erradicada.

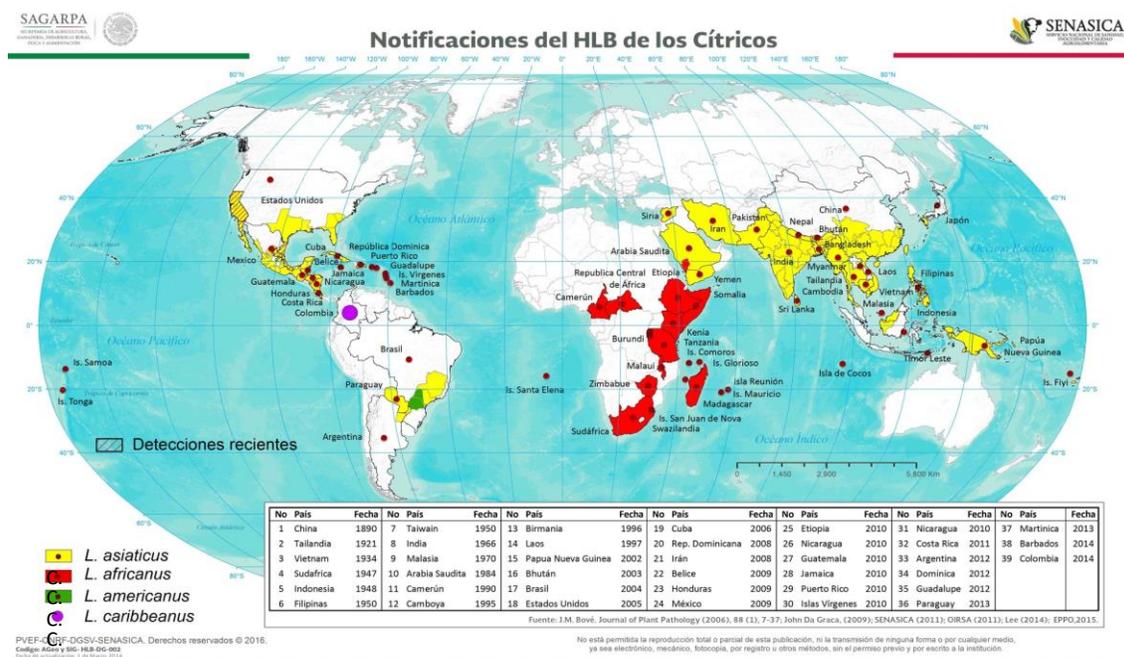


Figura 2.1. Distribución Mundial de *Candidatus Liberibacter* spp. Fuente: SINAVEF, 2016.

2.4. Distribución nacional del HLB

La detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) en México se realizó a través de “la campaña nacional contra el Huanglongbing de los cítricos” (SENASICA, 2010) iniciada como una medida preventiva en 2008 en 23 estados citrícolas del país. Derivado de estas acciones, en julio de 2009, se detectó por primera vez al HLB en cítricos de traspatio del municipio de Tizimín, Yucatán. Actualmente se tiene presencia de CLAs en 364 municipios (247 con detecciones en material vegetal y 117 en DC) de los 24 estados citrícolas del país se mantienen sin detecciones de CLAs los estados de Baja California, Nuevo León, San Luis Potosí y Sonora (Figura 2.2) (SENASICA, 2016). Un aspecto a resaltar fue que la estrategia de detección en México a diferencia de otros países como E.U.A. y Brasil enfatizó al vector DC con el fin de anticipar el establecimiento de CLAs mediante la prevención o interrupción de procesos de infección y dispersión (SENASICA, 2012). Esto implicó la adaptación de protocolos de la NAPPO con un enfoque molecular de detección de CLAs en planta y vector (Alanis *et al.*, 2015; Comunicación personal DGSV). Esta estrategia ha permitido activar protocolos de actuación sin la ocurrencia visual de síntomas en planta.

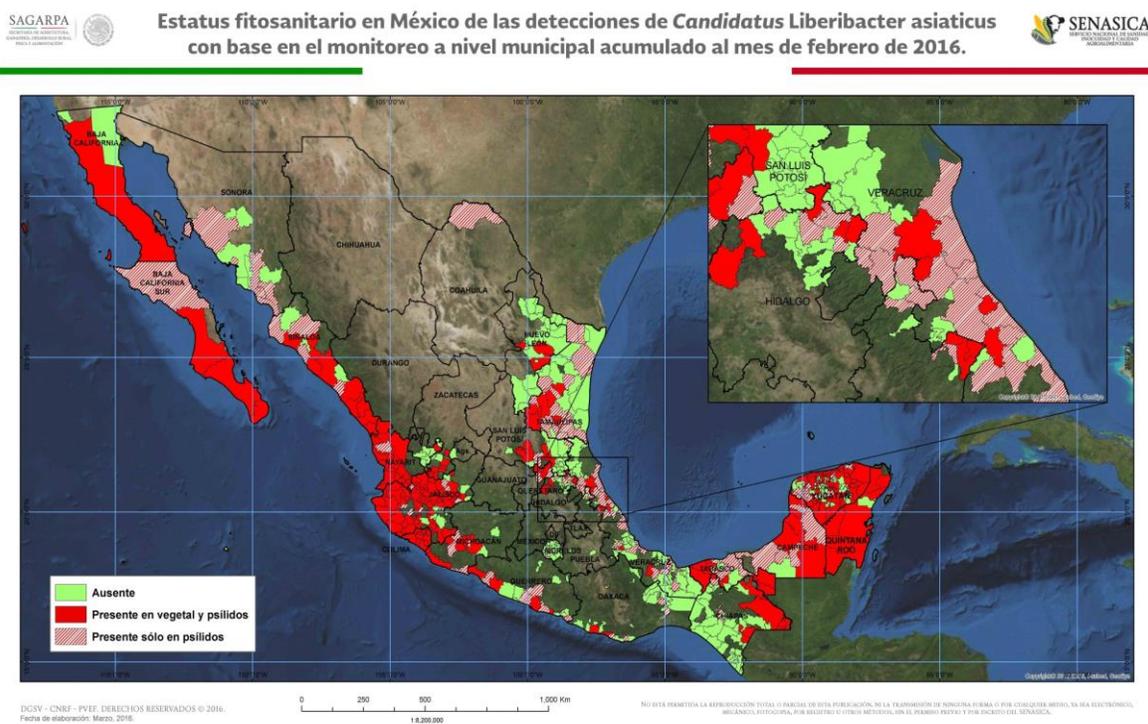


Figura 2.2. Distribución nacional de *Candidatus Liberibacter asiaticus* a Marzo, 2016. Fuente: SENASICA, 2016. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>

2.5. Impactos económicos del HLB

Debido a la falta de métodos de control o manejo eficientes contra CLas y a la relación severidad de daño, pérdidas productivas y a la rapidez con la que se dispersa el vector del agente causal, se estima que ha destruido globalmente a más de 60 millones de árboles (Das *et al.*, 2007). Se tienen informes de que en Sudáfrica se han tenido daños que alcanzan hasta el 100% de pérdidas de la cosecha (Aleman *et al.*, 2007).

En Tailandia, los árboles infectados mueren y disminuyen su producción después de 5 a 6 años de ser plantados y después de 10 años las pérdidas sobrepasan los \$8,000 dólares/ha (Roistacher, 1996).

En Bali, cuatro millones de árboles fueron erradicados durante el periodo de 1986 a 1988 y reemplazados con mandarinas en 1991. Sin embargo, para 1993, 40% de estos árboles fueron infectados y en 1996 más del 90% mostraron síntomas de HLB, por lo que fueron nuevamente erradicados (Aubert, 1993).

Brasil es uno de los países donde esta enfermedad ha causado las pérdidas más grandes, ya que se han eliminado más de 38.8 millones de árboles con síntomas de la enfermedad hasta 2014 (FUNDECITRUS, 2015). Por otro lado, los costos que genera las aplicaciones contra el vector superan los 279 dólares/ha (Ayres y Yamamoto, 2007; Brlansky *et al.*, 2009). En San Pablo, Brasil la intensidad de uso de insecticidas ha alcanzado esquemas similares a cultivos de ciclo corto con aplicaciones semanales a quincenales (FUNDECITRUS, 2015). Un modelo difícil de sustentar por productores o empresas pequeñas. Por otro lado, es conveniente indicar que el abandono de plantaciones o cambio del uso de suelo por otros cultivos se ha dado antes de que el huerto cítrícola perdiera su rentabilidad. Esto ocurrió en Colima, México y San Pablo, Brasil por lo que el impacto real o directo de CLas pudo ser menor a lo reportado.

Recientes estudios cuantitativos del efecto de *C. L. spp.* reportan pérdidas productivas de 40 a 100% para naranja dulce (Bassanezi *et al.*, 2009; Bassanezi *et al.*, 2011), 18% en limón persa (Flores-Sánchez *et al.*, 2015) y de 60 a 80% en limón mexicano (Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez, *et al.*, 2014) (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Pérdidas productivas estimadas con enfoques epidemiológicos, por efecto de la infección de CLas en diferentes especies citrícolas en el mundo.

Escenario	Especie	Estudio	Pérdidas	Referencia
Brasil	Naranja dulce	Parcelario	42-100%	Bassanezi <i>et al.</i> , 2009, 2011
México-Colima	Limón mexicano	Parcelario	62%	Robles-González <i>et al.</i> , 2013
México-Yucatán	Limón persa	Parcelario	8-17.3%	Flores-Sánchez <i>et al.</i> , 2015
México-Colima	Limón mexicano	Regional	58-70%	Flores-Sánchez <i>et al.</i> , 2014
México-Michoacán	Limón mexicano	Regional	13-60%	LANREF, 2015-NP ^a
México	<i>Citrus</i> spp.	Nacional	Año1=8% 3=23% 5=36%	Salcedo <i>et al.</i> , 2010
México	<i>Citrus</i> spp.	Nacional	Año1=15% 3=23% 5=28%	IICA, 2015-NP

^aNP=Datos no publicados.

Otras investigaciones consideraron el costo-beneficio del manejo del HLB y concluyeron que la ganancia neta sería igual que la obtenida bajo un escenario de ausencia de manejo de esta enfermedad (Lopez and Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012); no obstante su análisis careció de un enfoque de campo con la evaluación de prácticas agronómicas empleadas para el manejo del HLB.

Adicionalmente, en Florida estimaron el impacto de CLas en la producción de naranja dulce mediante una encuesta a productores, en la cual encontraron que el impacto depende de la infección regional de la bacteria, la región sur-oeste presentó una incidencia del 77% y un impacto productivo del 33%, en la región central-suroeste la incidencia fue del 74% y el impacto fue de 37%, y en la región central la incidencia fue del 83% y el impacto de CLas del 45% (Singerman y Useche, 2015).

2.6. Estrategias de manejo del HLB

Inicialmente se intentó el control directo de las bacterias asociadas a esta enfermedad, como el uso de bactericidas (Zhang *et al.*, 2011, 2009; Tsiantos *et al.*, 2003; Aubert and Bové, 1980), termoterapia, la cual se basa en el uso de temperaturas elevadas (45°C) en condiciones controladas (Fan *et al.*, 2016; Hoffman *et al.*, 2013). Posteriormente, se evaluó el uso de repelentes biológicos de los vectores como estrategia preventiva de la dispersión de CLas (Gottwald *et al.*, 2014a; Sandoval-Reyes *et al.*, 2013; Ichinose *et al.*, 2012), sin embargo, los resultados obtenidos se evaluaron bajo condiciones controladas o a nivel parcelario e indican una baja eficiencia, por lo que no se recomiendan como medida de control directo de la bacteria. Estos estudios requieren un enfoque amplio en combinación con otras estrategias, p.e. la evaluación a nivel regional y con variables fisiológicas, nutrimentales y de manejo como indicadores de su eficiencia.

Actualmente, existen estudios sobre el desarrollo de materiales que presentan tolerancia o que prolongan la vida productiva de huertas cítricas (Stuchi *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2013) y sobre agentes inductores de resistencia sistémica adquirida que reducen la dispersión y contagio entre plantas (Bagio *et al.*, 2014). No obstante, estos estudios requieren más trabajo y su liberación como estrategia es aún incierta.

Por lo anterior, las estrategias vigentes para el manejo de la enfermedad son: la eliminación de árboles enfermos, uso de plantas sanas y control regional del vector con insecticidas químicos y biológicos y uso de enemigos naturales (Bassanezi *et al.*, 2013; Da Graca y Kortszen, 2004; Aubert *et al.*, 1996). A esta estrategia se le conoce como el tripié de manejo del HLB, y es San Pablo, Brasil posiblemente el único país que pudo aplicar con éxito esta estrategia. La experiencia de México sugiere que es necesario un tetrapié, el cual incluya en adición a la eliminación de árboles enfermos, uso de plantas sanas y control regional del vector, el manejo integrado del cultivo, el cual debe tener como base la nutrición (Bassanezi *et al.*, 2014; Gottwald *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011), manejo hídrico y del suelo (Campos-Herrera *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013), altas densidades de plantación (Stuchi y Girardi, 2010; Skaria y Hanagriff, 2008; Medina-Urrutia *et al.*, 2004), programas de renovación frecuente de plantaciones y de ciclo corto (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012), y el control regional de DC mediante productos

químicos y biológicos (Bassanezi *et al.*, 2013; Stansly *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2011; Sandoval-Reyes *et al.*, 2013; López-Arroyo *et al.*, 2012).

En cuanto al tripié de manejo del HLB a continuación se discuten sus componentes y su viabilidad de uso en regiones citrícolas con un sistema productivo de baja escala y de pequeños productores:

2.6.1. Siembra de plantíos sanos

El uso de material vegetal certificado es la estrategia más complicada debido a la problemática social que esto implica, ya que requiere medios voluntarios, normativos y legislativos. Con el fin de apoyar a esta estrategia la OIRSA desarrolló, para sus países miembros, los lineamientos de armonización normativa regional de certificación fitosanitaria de material propagativo de cítricos, documento normativo en el cual se establecen los procedimientos y requisitos fitosanitarios para la regulación de material de propagación de cítricos (OIRSA, 2013). Sin embargo, su adaptación, aceptación y utilización requiere canales de vinculación entre sectores oficiales como: organismos auxiliares de sanidad vegetal hasta sectores productivos como: productores y viveristas.

2.6.2. Detección y erradicación oportuna de plantas con HLB

Con respecto a la erradicación, San Pablo, Brasil mantuvo esta estrategia con éxito durante 10 años en combinación con el uso de plantas sanas y control químico del vector (Bassanezi, 2010). Sin embargo, estudios recientes sugieren que la erradicación se redujo un 51%, ya que de 35 millones de plantas enfermas con HLB se erradicaron 3.6 millones en 2015 (FUNDECITRUS, 2015), por lo que se espera que los efectos de este hecho impactarán la producción en mediano plazo en esta región. Este cambio en la estrategia de San Pablo ha inducido un incremento de la incidencia de la enfermedad del 42% de 2012 a 2015 (FUNDECITRUS, 2015).

Por otra parte, México uno de los países que más recursos destina al control de plagas y enfermedades de cultivos de importancia económica. En el patosistema CLas-Cítricos-*D. citri* destinó un presupuesto anual para el monitoreo e inspección (búsqueda de plantas sintomáticas HLB) y su confirmación por PCR, en los 24 estados citrícolas durante el 2008 al 2012 (SENASICA, 2012).

Sin embargo, la excelente estrategia de detección no se acompañó en todas las entidades con una estrategia de erradicación, la cual también tiene implicaciones similares a la de uso de material vegetal certificado como lo son legislativas, normativas y voluntarias por medio del convencimiento. Algunos estados citrícolas implementaron un programa de erradicación, similar al de Brasil (Belasque *et al.*, 2009), en el cual la mayoría de las plantas sintomáticas a HLB fueron eliminadas incluyendo árboles de traspatio (región Península de Yucatán). En otros estados en donde la detección fue inoportuna por la multiplicidad de focos, alta velocidad de dispersión y alta compactación del área citrícola (p.e. región Pacífico), la estrategia de erradicación fue inviable, puesto que el umbral económico para esta estrategia se había superado y se deseaba mantener la cadena productiva limón mexicano. Con base en esto datos es que actualmente se reconocen dos escenarios epidémicos contrastantes del HLB en México (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a) (Figura 2.3). Actualmente, la región del Pacífico basa el manejo del HLB en programas nutrimentales, altas densidades de siembra (para compensar producción), control regional de *D. citri* mediante ingredientes químicos y biológicos (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012). La producción de plantas bajo condiciones controladas no es mandatorio y no se garantiza en el 100% de los viveros regionales. Adicionalmente, los esfuerzos del país se concentran en la implementación de las Áreas Regionales de Control de *D. citri* (ARCOs) desde 2013 (SENASICA, 2012), el cual fue discutido e implementado con soporte técnico-científico y esquemas operativos estatales, siendo el único modelo en el continente con estas características (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a).

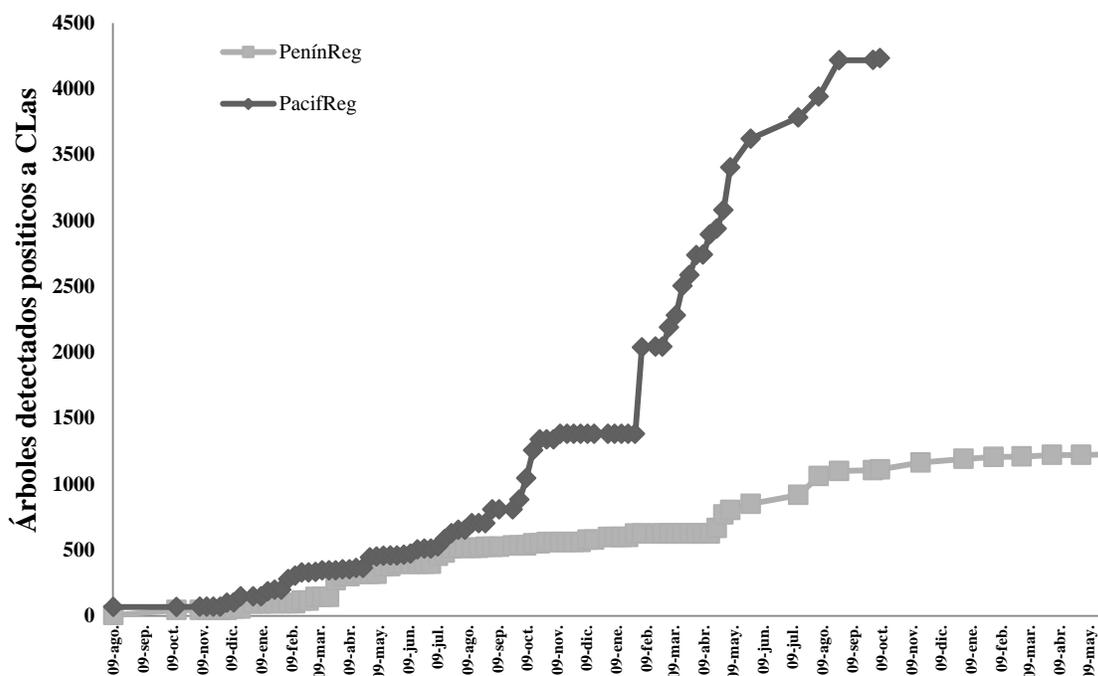


Figura 2.3. Número de árboles detectados positivos a CLas, la bacteria causante del HLB en México, en dos regiones epidémicas más contrastantes de México. Con datos de SENASICA, 2016. Fuente: Mora-Aguilera *et al.*, 2014a.

2.6.3. Monitoreo del vector

Esta actividad representa la base del éxito del control de DC, esto se debe a que el monitoreo tiene los siguientes principios biológicos (López-Arroyo *et al.*, 2012; Lozano-Contreras y Jasso-Argumedo, 2012; Hall *et al.*, 2013; Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Torres-Pacheco *et al.*, 2013):

1. Determinar dinámicas poblacionales de DC.
2. Determina épocas de aplicación para el control regional y local.
3. Evaluación del impacto de aplicaciones regionales de control químico y biológico
4. Evitar aplicaciones innecesarias y con productos evaluados regionalmente en su capacidad biológica.
5. Identificar focos de infestación.
6. El monitoreo se efectúa en ARCOs establecidas con modelos epidemiológicos.

Es decir el monitoreo es la herramienta que proporciona la información necesaria para realizar el control de DC de manera sustentable.

2.6.4. Control regional de *D. citri* mediante productos químicos y agentes de control biológico

Las recientes experiencias empíricas y eventualmente sustentadas experimentalmente en Brasil y posteriormente extendidas a EUA, Belice y México indican que la estrategia que presenta mayor eficiencia en el control del HLB es el enfoque regional debido a la alta movilidad del vector (Bassanezi *et al.*, 2013). Este enfoque fue validado experimentalmente por FUNDECITRUS y aplicado comercialmente por empresas, principalmente de San Pablo, Brasil. Sin embargo, la producción extensiva de Brasil ha favorecido esta estrategia por rapidez en la toma de decisiones y la amplia cobertura asociada a pocos productores (Bassanezi *et al.*, 2013). Su adecuación a otras condiciones ha implicado la cuidadosa definición de criterios para el establecimiento de áreas de manejo regional optimizando los recursos humanos y económicos para el caso donde se han diseñado estrategias con apoyo oficial como en México (Mora-Aguilera *et al.*, 2013a; Robles, 2012).

En México, la estrategia de control regional se conoce como ARCOs, en la cual el control del vector se realiza principalmente mediante productos químicos y en menor medida con control biológico mediante parasitoides, depredadores y entomopatógenos (Arredondo-Bernal, 2013; Pacheco *et al.*, 2012).

Existen varias líneas de investigación de control biológico con resultados promisorios cuya aplicación podría incluir áreas rurales y urbanas de traspatio y zonas cítricas específicas con bajo uso tecnológico (Orduño-Cruz *et al.*, 2015a, 2015b; Cortez-Madrigal *et al.*, 2014; Arredondo-Bernal, 2013; López-Arroyo y Rocha-Peña, 2012). En algunas regiones se realiza mediante la liberación de *Tamarixia radiata* y a la fecha se cuenta con dos laboratorios oficiales de reproducción masiva que permiten la liberación coordinada en los diferentes estados cítricos del país (Arredondo-Bernal, 2013) (Figura 2.4). Un componente fundamental para el control de DC en zonas urbanas aledañas o inmersas en las ARCOs, así como en las huertas abandonadas que forman parte de las ARCOs, es la producción y liberación de *Tamarixia radiata*, parasitoide específico de DC. Asimismo, en las huertas comerciales de las ARCOs que reúnen las condiciones de temperatura y humedad relativa, se realizan aplicaciones regionales totales de hongos entomopatógenos; tanto la cepa como la dosis a utilizar en cada ARCO, deriva de trabajos de investigación

realizados por el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (Arredondo-Bernal, 2013).

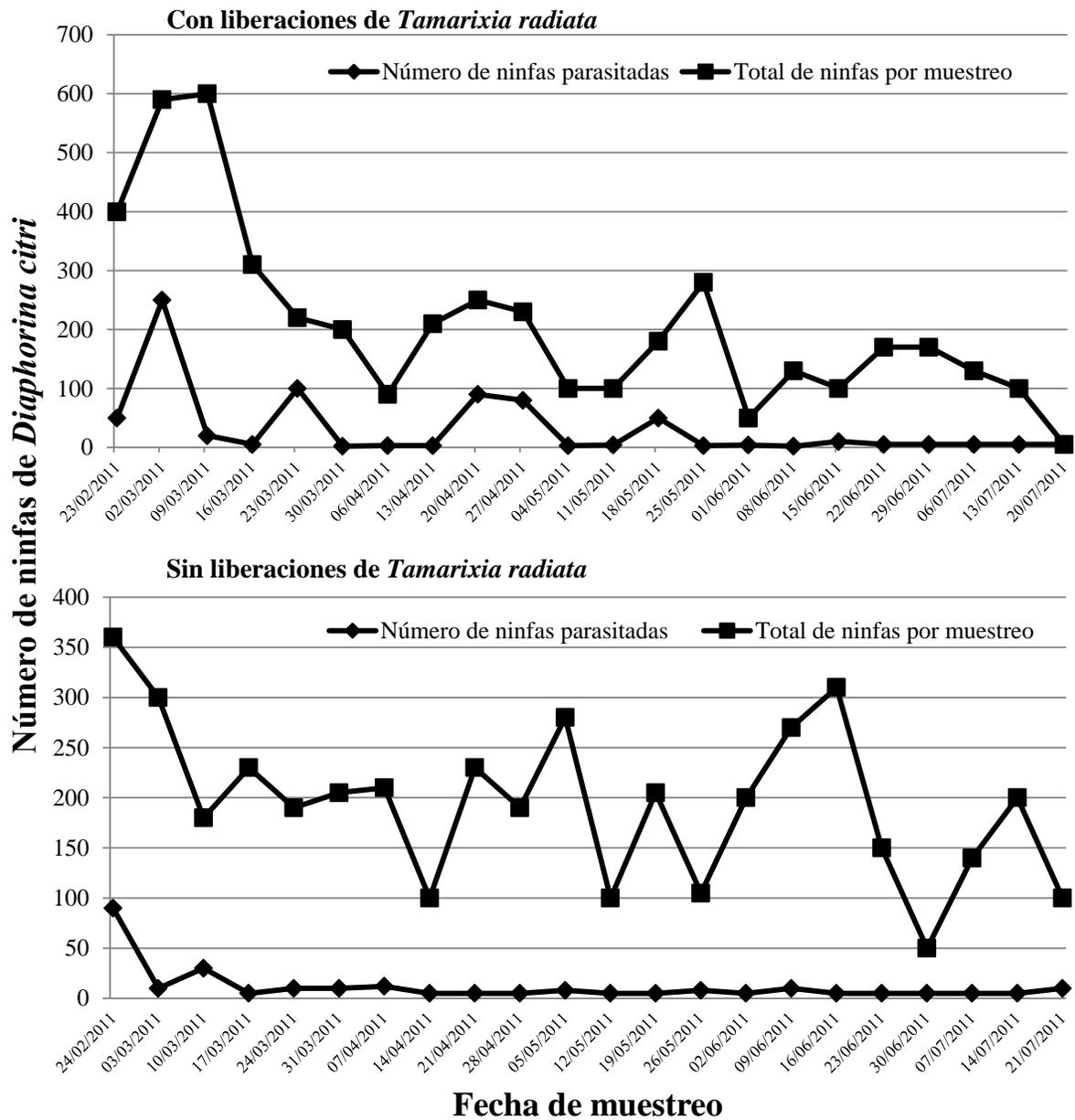


Figura 2.4. Efecto de liberaciones de *T. radiata* sobre el número de ninfas de *D. citri*, en Colima. Fuente: Arredondo-Bernal, 2013.

En el caso del control químico, los productos aprobados por el SENASICA fueron propuestas y validados por el INIFAP mediante una evaluación de insecticidas convencionales y alternativos recomendados para el control del PAC en cuanto a

efectividad e inducción de resistencia (IRAC, 2012), a partir del cual, se generó un programa sustentable de manejo de la resistencia a insecticidas con base en la fenología de las especies cítricas, principalmente brotación, dinámica poblacional y biología de DC y condiciones ambientales, para su recomendación y uso a nivel nacional (Cortéz *et al.*, 2013) (Figura 2.5).

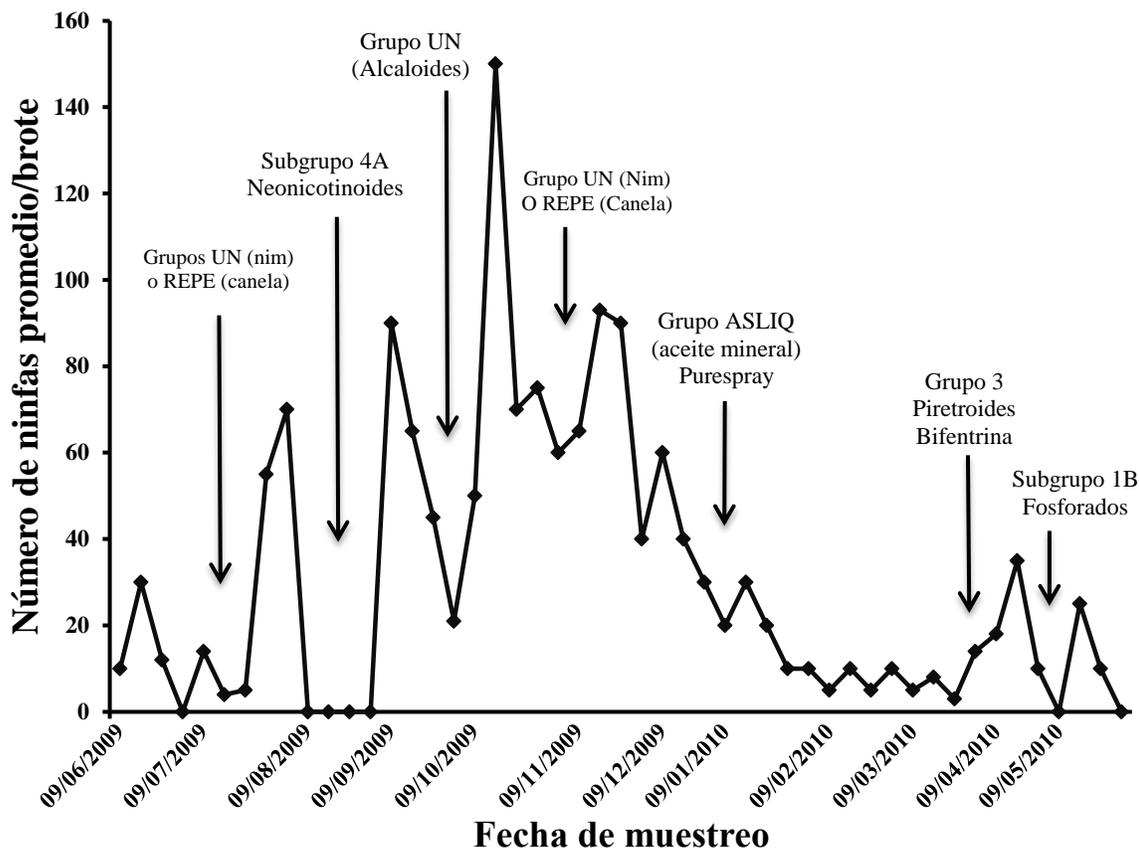


Figura 2.5. Propuesta de rotación de insecticidas para manejar la resistencia del PAC. Con base en brotación, dinámica poblacional y biología de DC y condiciones ambientales. Fuente: Cortéz *et al.*, 2013.

2.7. Justificación biológica y epidemiología del enfoque regional

El concepto de regionalidad en estudios fitosanitarios es un desafío y una oportunidad de desarrollo que provee una visión de sustentabilidad productiva. Adicionalmente, si el cultivo y su productividad es el eje central de integración fitosanitaria y tecnológica, es posible desarrollar modelos racionales productivos y sustentables (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b). Un ejemplo de la importancia de una visión regional es el estudio del cambio climático en la sanidad de cultivos, el cual es imposible entender y explicar con

estudios en una dimensión espacial local o parcelaria (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014b; Parnell *et al.*, 2012).

En el control de plagas insectiles, Hendrichs *et al.*, (2007) acuñaron el concepto de *manejo integrado de plagas en áreas amplias* (enfoque regional) e indicaron que este enfoque es mejor que el manejo integrado de plagas a nivel parcelario, debido principalmente, a que reduce las poblaciones de insectos plagas durante mayor tiempo, reduce el uso de insecticidas por lo que tiene un menor efecto ambiental y también reduce los costos de aplicación. Hendrichs *et al.* (2007) señalaron que el enfoque parcelario es altamente reactivo y se basa en el control de la plaga cuando los niveles de la misma tienen implicación económica, mientras que el enfoque regional o de áreas amplias es preventivo y sustentable al cubrir una mayor área y tener un efecto duradero en la reducción de las poblaciones de la plaga.

Esta visión reactiva también se utiliza en áreas como la Epidemiología, ya que el enfoque clásico de esta disciplina se basa en el principio de infección, el cual tiene como consecuencia el estudio de la población de plantas enfermas (Vanderplank, 1963; Zadoks and Schein, 1979), es decir, la epidemiología se estudia a partir de focos de infección y bajo un escenario del principio de protección. Sin embargo, tal como el control de plagas lo señala esta visión reactiva es restrictiva, insustentable y requiere la aplicación de una estrategia preventiva, la cual explique holísticamente los factores regionales involucrados en una epidemia. Por lo tanto, un estudio epidemiológico con enfoque regional requiere la integración de los subsistemas del sistema epidemiológico, mediante la evaluación de variables del hospedante, patógeno, vector, clima, manejo, y suelo (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a; Flores-Sánchez *et al.*, 2012).

Aunque el concepto regional es intuitivo (Hendrichs *et al.*, 2007; Bové, 2012) se requiere un planteamiento conceptual a diferentes niveles de integración biológica, espacial, metodológica y operacional. Un modelo de estas características fue propuesto por Mora-Aguilera (Mora-Aguilera, 2003. Notas de curso de Epidemiología Agrícola) y empleado como base racional para estudios epidemiológicos regionales en cocotero (Góngora *et al.*, 2004), cítricos (Domínguez-Monge, 2011), nopal (Alonso-Barrera *et al.*, 2014), fresa (Ceja-Torrez *et al.*, 2014) y recientemente en café (Mora-Aguilera *et al.*, 2014e, 2014f, 2014g; Coria-Contreras *et al.*, 2014a, 2014b) y agave (LANREF, 2016. Comunicación personal).

La regionalidad en epidemiología es por lo tanto reciente y su análisis e incorporación a esta disciplina está en desarrollo (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014b).

Por lo anterior, la epidemiología regional se refiere al estudio de procesos epidemiológicos en un área constituida por un conjunto de unidades de producción que mantienen relaciones productivas, económicas y ambientales (Cuadro 2.4) (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b). Sin embargo, con este nuevo enfoque existen implicaciones estadísticas fundamentales a resolver como (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b):

- a) Debido al principio de contagio los datos regionales tienen una dependencia espacial o correlación de valores de acuerdo con las distancias de dispersión. Por lo anterior, la adopción de la distribución aleatoria, base de muchos procesos estadísticos es inadecuada.
- b) El énfasis de los métodos cuantitativos es explotar la variabilidad regional maximizando la heterogeneidad del sistema epidemiológico, con el propósito de entender los factores involucrados en las diferencias regionales del problema. A diferencia de la visión parcelaria, en la cual se busca reducir la variabilidad con el propósito de evidenciar el efecto de uno o pocos factores.

Cuadro 2.4. Características y elementos diferenciales entre el enfoque regional y parcelario.

Elementos	Regional	Parcelario
Objetivo	Determinar el efecto de n factores involucrados y sus relaciones con el problema fitosanitario.	Determinar el efecto de uno o pocos factores en el problema fitosanitario.
Unidad de Estudio	Conjunto de unidades productivas.	Una unidad productiva individual.
Principios de Manejo	Preventivo en ausencia de la enfermedad y protectivo.	Protectivo y en presencia de la enfermedad.
Eje integrador/ Base biológica	Hospedante y la población sana.	Patógeno-Plaga y la población de plantas enfermas o con daño.
Base estadística	Maximizar la variabilidad mediante la evaluación de factores heterogéneos del sistema epidemiológico.	Reducir la variabilidad mediante el control de los factores del sistema epidemiológico.
Métodos Epidemiológicos	Multivariados.	Univariados.
Interpretación/ Representatividad	Amplia/ Los resultados explican el problema a nivel regional.	Restringida/Los resultados explican el problema únicamente para las condiciones parcelarias de estudio.
Costos	Mayor.	Menor.
Recurso humano	Requiere entrenamiento sobre el nuevo paradigma regional.	No requiere entrenamiento puesto que aplica el enfoque convencional.

2.8. Epidemiología del HLB con enfoque clásico parcelario

Existen pocos estudios epidemiológicos cuantitativos sobre el HLB, y éstos se basan en modelos descriptivos o inferenciales del comportamiento de esta enfermedad a nivel parcelario. Lo anterior, se ha justificado en lo complicado de localizar los sitios de estudio donde se encuentra la enfermedad, y donde las epidemias se pueden seguir a través de varios años para entender plenamente su potencial epidémico Gottwald *et al.* (1989). Esto es válido si se desea estudios epidémicos con el enfoque clásico, p.e. estudios temporales y sus resultantes: las curvas epidémicas (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014b). Pero no es válido para una epidemiología en su concepción más amplia donde la prevención (exclusión y erradicación) y protección son el objetivo. El sistema epidemiológico opera aún sin la presencia del patógeno y eso debe ser motivo de estudio, para patógenos ausentes o de baja prevalencia. En estos casos se enfatiza el estudio de procesos espaciales con atención al establecimiento y dispersión (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c). El enfoque clásico propuesto por Gottwald *et al.* (1989) es muy tardío para prevenir impactos productivos y ambientales. Actualmente están documentados los efectos devastadores de HLB en el rendimiento de los cítricos y las graves pérdidas de calidad (Gottwald *et al.*, 1989; Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2009, 2011; Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2015). No es necesario esperar a tener estos efectos para estudiar la prevención y manejo de riesgos (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014b). En segundo lugar, el retraso en el tiempo entre la transmisión del patógeno a través de vectores y el inicio de los síntomas visuales pueden ser muy variables, desde unos meses a uno o más años (Gottwald *et al.*, 1989). Nuevamente, esta idea refleja el enfoque clásico de evaluar el daño no la condición sana bajo un análisis de riesgo.

Adicionalmente, Bassanezi (2010) menciona que otras razones de la dificultad del estudio epidemiológico del HLB podrían ser: 1) que la enfermedad causa rápidamente severas pérdidas en la calidad y cantidad de la producción; 2) el potencial de dispersión por la movilidad del vector a largas distancias; 3) el largo periodo de incubación de la bacteria, pero no de latencia, lo que permite la dispersión de este patógeno antes de ser detectado por sintomatología en campo, por lo que para cada árbol sintomático podría haber 13 árboles infectados pero asintomáticos. Todo esto es evidencia que los enfoques clásicos parcelarios no son adecuados para una epidemiología de gran escala espacial y temporal.

2.8.1. Comportamiento temporal parcelario

Gottwald (2010) menciona que el incremento en la tasa del progreso de la enfermedad es influenciada por: a) reservas de inóculo primario con plantas infectadas, b) poblaciones locales del vector y c) edad de las plantaciones y d) numerosos factores ambientales.

En San Pablo, Brasil, la incidencia del HLB puede ser mayor que 50% en tres años, si el huerto se encuentra cerca de plantaciones infectadas, y si no se acompaña de un efectivo control de árboles sintomáticos y del vector (Bassanezi, 2010). Adicionalmente, la edad de plantas también predispone la epidemia del HLB; de acuerdo con estudios realizados por Bassanezi, (2010), la evolución del HLB en huertas jóvenes está en función del control de la enfermedad y de la proximidad con fuentes externas de inóculo. En huertos cercanos a parcelas infectadas, sin un manejo eficiente de la enfermedad (erradicación), ni del vector, la incidencia puede superar el 50% en tres años.

A nivel mundial, se reporta un impacto epidémico alto del HLB (Cuadro 2.5), en Brasil la incidencia del HLB varió de 0.4 a 40% en 36 meses (Bassanezi, 2010); en Florida de 0.2 a 39% en 10 meses y hasta 100% en China, región de origen de esta enfermedad (Gottwald, 2010).

Cuadro 2.5. Epidemias del HLB en el Mundo parametrizadas con la incidencia final a nivel parcelario (Gottwald, 2010). Fuente: Mora-Aguilera *et al.*, 2014a.

Localización	Duración de epidemia (Años)	Incidencia final de árboles sintomáticos (%)
Sud África	5.0	98
Isla Reunión	7.0	96
China (Guangxi)	13.0	> 98
China (Guangxi)	9.0	100
Indonesia (Bali)	1.8	76
Vietnam	3.0	96.30
Brasil (Sao Paulo) (34 huertos)	3.0	26-37
Florida (8 huertos)	3-4	>36
México (Colima)	0.8-1	90

En México, el HLB se detectó en julio 2009, y desde esa fecha se dispersó a la mayoría de los estados citrícolas del país; actualmente se pueden definir dos escenarios epidémicos principales: 1) región del Pacífico con mayor intensidad y prevalencia en huertos comerciales y de la especie limón mexicano, en donde la erradicación de plantas no fue posible debido a que el umbral económico y umbral de establecimiento del patógeno se superó rápidamente y 2) región Península de Yucatán con menor intensidad y prevalencia en traspatio, principalmente en naranja dulce, en donde la baja carga de inóculo de CLas podría asociarse a la reducción de inóculo primario o erradicación de plantas enfermas (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a).

En estas regiones existen estudios a nivel de huerto, en los cuales el progreso temporal del HLB indica que el escenario de México en limón mexicano y limón persa (Cuadro 2.6) es de mayor intensidad al reportado para naranja dulce en San Pablo, Brasil, Florida, E. U. A. y China, debido probablemente a la vulnerabilidad de las limas ácidas por periodos de brotación constante durante todo el año (Robles-González *et al.*, 2014; Stuchi and Girardi, 2010; Davis and Albrigo, 1994). Sin embargo, es necesario considerar la dimensión poblacional para la estimación de tasas epidémicas dado que los valores usados para ajuste de los modelos, p.e. la incidencia es una variable denso dependiente. El efecto de la población es evidenciado en las epidemias de México, en las cuales la tasa de infección ($1/b$) depende del tamaño de muestra (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6. Epidemias del HLB en México en huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en Colima y limón persa (*Citrus latifolia*) en Nayarit y Yucatán, México.

Estado	Municipio	Huerto	Especie	N (ha)	Tiempo (meses)	1/b ^a	C ^b	r ^{2c}	Yf ^d (%)	Cita
Colima	Tecomán	Col1	L. mex	40	10	0.17	2.36	0.97	46	°Robles-González <i>et al.</i> , 2013
Colima	Tecomán	Col2	L. mex	10	7	0.002	0.66	0.78	3	
Nayarit	Xalisco	Nay 1	L. persa	0.1	6	0.13	1.4	0.91	44	Márquez <i>et al.</i> , 2011
Nayarit	Xalisco	Nay 2	L. persa	0.1	6	0.19	1.62	0.99	65	
Nayarit	Xalisco	Nay 3	L. persa	0.1	6	0.32	2.17	0.94	70	
Nayarit	Ahuacatlán	Alto	L. persa	0.3	6	0.02	0.83	0.88	18	°Esquivel-Chávez, 2011
Nayarit	Ahuacatlán	Mod	L. persa	0.3	6	0.01	4.36	0.99	85	
Nayarit	Ahuacatlán	Bajo	L. persa	0.3	6	0.001	0.53	0.91	34	
Yucatán	Tizimín	Moct	L. persa	0.3	8	0.04	2.2	0.95	44	°Loeza-Kuk <i>et al.</i> , 2010
Yucatán	Tizimín	SRosa	L. persa	0.1	8	0.02	1.3	0.91	19	

Ajustes con el modelo de Weibull: ^aParámetro de tasa en su forma inversa; ^bParámetro de forma de la curva; ^cCoefficiente de determinación del modelo. ^dYf: Incidencia final al momento de la caracterización epidémica estimado en fase asintótica. ^eFuente de datos para análisis propio.

En estos estudios la tasas de infección (1/b) más altas se presentaron en los huertos de Xalisco, Nayarit con un rango de 0.13 a 0.32, en los cuales se observó la menor población de plantas (0.1 ha) y con forma irregular. En Colima el huerto Col1, en el cual se realizó la primera detección del HLB en dicho estado, presentó una tasa de 0.17 en 40 ha, lo cual coincide con el estatus actual de mayor intensidad epidémica de CLas en esta entidad. En el caso de Col2 tuvo una tasa de 0.002; sin embargo, se trata de un huerto dentro de las instalaciones del INIFAP, por lo que posiblemente las condiciones de manejo agronómico, control del vector influyeron en menor dispersión de CLas. Las menores tasas se observaron en Nayarit y Yucatán, las cuales oscilaron entre 0.001 a 0.04, en ambos escenarios para limón persa.

2.8.2. Comportamiento espacial parcelario

En China, Filipinas e Isla Reunión, se observó y demostró que el progreso espacial de las epidemias del HLB se produce en agregados de árboles enfermos y con una marcada direccionalidad (Gottwald *et al.*, 1989; Gottwald *et al.*, 1990).

El efecto de borde es una característica de la distribución espacial parcelaria de esta enfermedad y se reporta especialmente en huertos con gran superficie (Bassanezit *et al.*, 2005; Gottwald *et al.*, 2014). En plantaciones pequeñas p.e. menores a 5 ha el efecto de bordo e interno se presenta concurrentemente (Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011). Esta dispersión se asocia a un proceso de dispersión primaria, donde el contagio ocurre con vectores infectivos provenientes de huertos infectados. Adicionalmente, se reporta un gradiente de distribución de los árboles sintomáticos entre los primeros 30 a 40 m desde el borde de las plantaciones (Gottwald *et al.*, 2014a), el cual se asocia a la dispersión local que ocurre dentro del huerto o en agregados de árboles enfermos, favorecido por inóculo secundario que es dispersado por la movilidad en saltos que realiza *Diaphorina citri* (Bassanezit *et al.*, 2005; Gottwald *et al.*, 2014a).

Por otro lado, se observó que las infecciones de CLas tienden a acumularse, con mayor incidencia, en las áreas abiertas de las grandes plantaciones como: carreteras, canales, estanques, contenedores, casas y almacenes para equipos de campo (Gottwald *et al.*, 2014a), posiblemente por ser áreas de exposición a los vientos.

Se demostró cierta evidencia de agrupación entre árboles enfermos adyacentes, sin embargo, ésta no fue particularmente fuerte. Se encontraron grupos definidos de árboles infectados con CLas asociados con grupos secundarios, a una distancia entre 25 y 50 m, lo que sugiere que a nivel parcelario, el movimiento del vector, parece ocurrir tanto de en árboles vecinos, así como hasta una distancia de 25 a 50 m, este último indica nuevos focos de infección en la parcela, producto del inóculo secundario generado en las plantas infectadas inicialmente (Gottwald *et al.*, 1989; Gottwald *et al.*, 1990; Bassanezi *et al.*, 2005; Irey *et al.*, 2006).

Lopes *et al.* (2007) mencionó que en Sao Paulo, Brasil las causas del progreso espacial irregular del HLB pueden deberse a otros factores como variaciones climatológicas (en particular la temperatura) favoreciendo de forma diferenciada tanto a la multiplicación del insecto vector como la multiplicación del patógeno en tejidos de plantas hospederas.

2.9. Epidemiología del HLB con enfoque regional

2.9.1. Comportamiento temporal

Los modelos temporales, aunque son racionalmente intuitivos para realizar estimaciones a n -escenarios de tiempo, (p.e. años después del ingreso de una plaga), su empleo a una escala regional en el caso del HLB es reciente. Este tipo de modelos se han aplicado para estimar los efectos del HLB a nivel parcelario, incorporando con ello la “gradualidad” de la infección. A partir de estos modelos se han inferido estimaciones regionales (Lopez and Durborow, 2014; Neves 2013; Miranda *et al.*, 2012). Sin embargo, este enfoque parcelario no incluye procesos de dispersión a nivel regional y no pueden extrapolarse. Una tasa epidémica parcelaria no es representativa o extrapolable a una tasa regional, debido a que el fenómeno de contagio en poblaciones extensivas y con cierto grado de discontinuidad espacial opera a una menor velocidad.

Por lo anterior, Mora-Aguilera *et al.* (2013) propusieron un modelo integrativo del comportamiento temporal de esta enfermedad a tres niveles espaciales: parcela (proporción de plantas enfermas), subregión (hectáreas enfermas del total del municipio) y región (municipios con HLB del total del estado) (Figura 2.6), bajo la premisa de que la dispersión y el incremento de la incidencia del HLB es gradual, no lineal, y con una tasa (positiva o negativa) dependiente de factores climáticos, varietales, manejo productivo y biológicos (asociados al vector y a la bacteria).

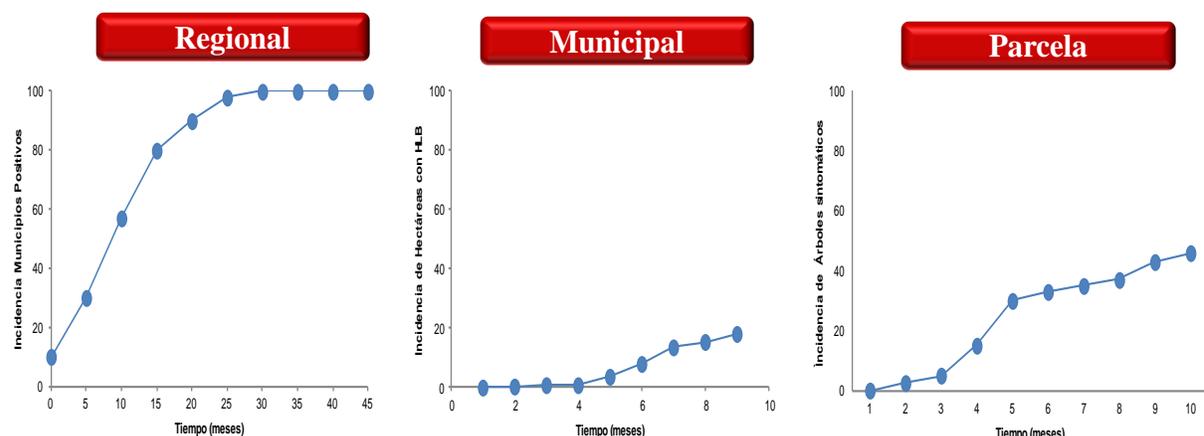


Figura 2.6. Epidemias del HLB ajustadas a modelos temporales a tres niveles espaciales: A) regional o estatal, B) subregional o municipal y C) parcelario. Con datos de SENASICA, 2016, Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011; Loeza-Kuk *et al.*, 2010.

Este modelo integrativo fue posible por el uso del model Weibull, el cual tiene como característica que es flexible, es decir, permite el ajuste de una familia de curvas como las observadas en HLB (Figura 2.6). Su aplicación y validación se realizó para estimaciones de pérdidas a nivel nacional en escenarios de 1, 3 y 5 años (Salcedo *et al.*, 2010). En otros estudios de impactos de CLas se han asumido modelos parcelarios (Miranda *et al.*, 2012) o se han asumido arbitrariamente por niveles de incidencia (Petri y Nicolás, 2015).

2.9.2. Comportamiento espacial

La espacialidad es un componente epidemiológico obligado para estimaciones de riesgos regionales, debido a la “gradualidad” del fenómeno de contagio fuertemente influenciado por la heterogeneidad de las tecnologías productivas, en adición a factores abióticos (Mora-Aguilera *et al.*, 2013a; 2013b; 2013c).

En Florida, empleando los datos de Irey (2009) e integrándolos en un enfoque metodológico de gradientes, sugieren que la distancia de dispersión del HLB, a partir de focos iniciales, fue de 150 a 280 km en 28 meses. En São Paulo, Brasil, la distancia máxima de dispersión varió entre 180 y 210 km en 72 meses (Bassanezi *et al.*, 2005). En ambos casos, solo se reporta la distancia final de dispersión con base en detecciones oficiales por las dependencias gubernamentales de sanidad vegetal de ambos países.

Gottwald *et al.* (2010) reportaron una amplia gama de distancias de dispersión espacial hasta de 3.5 km, con una distancia promedio de 1.5 km; sin embargo, esta información se obtuvo a partir de un estudio llevado a cabo en una superficie de 729 ha, es decir una superficie amplia pero restrictivo para un enfoque regional. Tampoco se empleó un enfoque de gradientes.

En México, un estudio epidemiológico diseñado para estimar los gradientes de dispersión de CLas se realizó en la Península de Yucatán a partir de focos de infección iniciales de CLas se determinó que las distancias de dispersión dependieron del factor viento, ya que en dirección a favor de los vientos dominantes, la distancia máxima de dispersión del HLB fue de 80 km, mientras que en contra del viento la distancia fue a 25 km (Figura 2.7) (Flores-Sánchez *et al.*, 2011).

Adicionalmente, en Colima se reportó un escenario de alta intensidad epidémica similar a Brasil, debido a que la dispersión del HLB alcanzó el límite territorial de 90 km en solo

cinco meses, posterior a su detección (Robles-González *et al.*, 2013). Debido a que un gradiente es función de los componentes del sistema epidemiológico, este tipo de estudios son necesarios a nivel de cada escenario regional a partir de los primeros focos o detección de la infección primaria, Su utilidad fundamental es en el establecimiento de criterios de muestreo con fines de exclusión y erradicación (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b, 2014c).

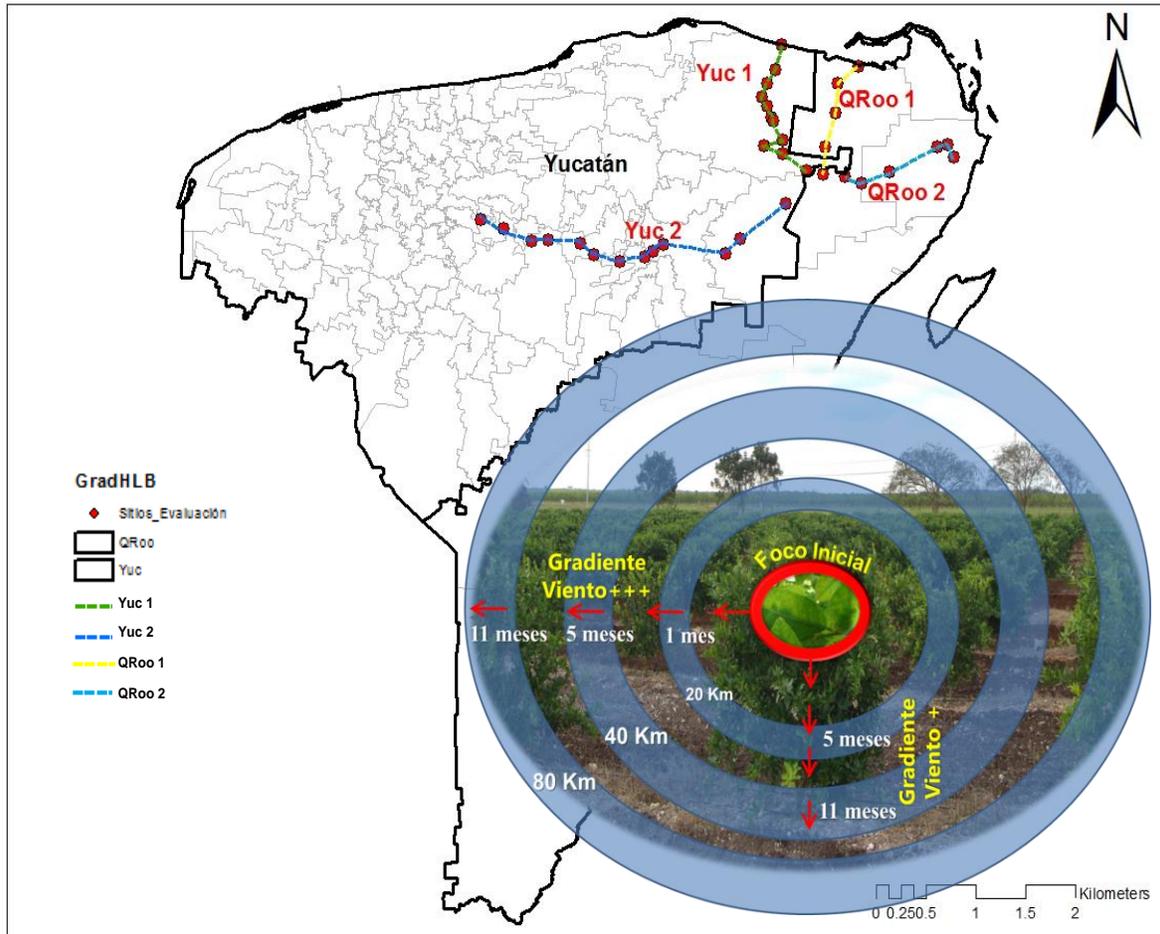


Figura 2.7. Gradientes de dispersión de CLAs a partir de focos iniciales en Yucatán y Quintana Roo, con distancias entre 25 y 80 km, en contra y a favor de los vientos, respectivamente. Fuente: Flores-Sánchez *et al.*, 2011.

3. LITERATURA CITADA

1. Ahmad, K., Sijam, K., Hashim, H., Rosli, Z., and Abdu, A. 2011. Field assessment of calcium, copper and zinc ions on plant recovery and disease severity following infection of Huanglongbing (HLB) disease. *African Journal of Microbiology Research* 5(28): 4967-4979.
2. Alanis-Martínez, E. I., Cora-Valencia, E., López-Arroyo, J. I. y López-Buenfil, A. 2015. Identificación del número variable de secuencias repetidas en TANDEM (VNTRs) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: (Suplemento) S197.
3. Alemán, J., H. Baños, y J. Ravelo. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Protección Vegetal* 22: 154-165.
4. Ali, M. K., Narayan, V. K. M. and Tandom, N. 2010. Diabetes & coronary heart disease: Current perspectives. *Indian Journal of Medical Research* 132: 584-597.
5. Alonso-Barrera, B., Mora-Aguilera, G., Valdovinos-Ponce, G., Ochoa-Martínez, D. L., Rodríguez-Leyva, E., Tlapal-Bolaños, B. y De la Torre-Almaraz, R. 2015. Asociación de un *Potexvirus* como agente causal de manchas cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 75-86.
6. Arredondo-Bernal, H. 2013. Control Biológico: Componente de las Áreas Regionales de Control del PAC. *In: Memorias de la Reunión Nacional de Sanidad Vegetal. México, D.F. 16-19 Abril. SENASICA México.*
7. Aubert, B. and Bové, J. M. 1980. Effect of penicillin or tetracycline injections of citrus trees affected by conditions in Reunion Island. Pp: 103-108 *In: 8th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. B. Calavan, S. M. Garnsey, and L. W. Timmer, eds. IOCV, Riverside, CA.*
8. Aubert, B., Sabine, A., Geslin, P. and Picardi, L. 1984. Epidemiology of the greening disease in Reunion Island before and after the biological control of the African and Asian citrus psyllas. *Proc. Intern. Soc. Citricult.* 1: 440-442.
9. Aubert, B. 1993. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. 134-142 pp. *In: Proceedings of the 4th Congress of the International Society of Citrus Nurserymen, South Africa.*

10. Aubert, B., Grisoni, M., Villemin, M. and Rossolin, G.1996. A case study of huanglongbing (greening) in Reunion. 276-278 pp. *In:Proceedings of the 13th Conference of International Organization of Citrus Virologist IOCV, Riverside.*
11. Ayres, J. A. and Yamamoto, P. T. 2007. Survey of HLB (Greening) and control strategies in Brazil. FUNDECITRUS. Citrus Expo 2007-Florida.
12. Bagio, T. Z., Barreto, T. P., Canteri, M. G., Leite-Junior, R. P. 2014. Resistência sistêmica adquirida em citros para controle de Huanglongbing. *In: 47° Congresso Brasileiro de Fitopatología. 6_2. Del 17 al 22 de Agosto. Londrina, Paraná. Brasil.*
13. Bassanezi, R. B., Busato, L. A., Bergamin Filho, A., Amorim, L., and Gottwald, T. R. 2005. Preliminary spatial pattern analysis of huanglongbing in São Paulo, Brazil. *In: Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA: IOCV, 341–55.*
14. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H. and Stuchi, E. S. 2009. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 125: 565-572.
15. Bassanezi, R. 2010. Epidemiología del HLB y sus implicaciones para el manejo de la enfermedad (presentación). Taller de enfermedades de alto impacto-cuarentenadas en el cultivo de los cítricos. III Simposio Internacional de Fruticultura tropical y subtropical. La Habana, Cuba. 26 al 30 de octubre de 2010.
16. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Godoy, G. M. C., Filho, A. B., Amorin, L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in Sao Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130(4): 577-586.
17. Bassanezi, R. B., Montesino. L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto. P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., Bergamin, Filho. A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796.
18. Bassanezi, R. B., Montesino. L. H., Matos, D., Quaggio, J. A., Boaretto, R. M., and Bové, J. M. 2014. Three years of nutritional management on Huanglongbing epidemics and crop loss in sweet orange grove. *In: 47° Congresso Brasileiro de Fitopatología. 494_1. Del 17 al 22 de Agosto de 2014. Londrina, Paraná. Brasil.*

19. Belasque, J. J., Filho, B. A., Bassanezi, B. R., Barbosa, J. C., Fernandes G. N., Yamamoto, T. P., Lopes, A. S., Machado, M. A., Pereira Leite, J. R., Ayres, J. A., and Massari, C. A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*. 34(3): 137-145.
20. Bové, M. J. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
21. Brlansky, H. R., Dewdney, M. M., Rogers E.M. and Chung, R. K. 2009. Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. USA. SP-43. PP-225.
22. Buitendag, C. H., von Broembsen, L. A. 1993. Living with citrus greening in South Africa. *Citrus J.* 3: 29–32.
23. CABI. 2015. Global Module. Crop Protection Compendium CAB International. UK.
24. Cabrera-Hidalgo, A., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Rebollar-Alviter, A. y Marbán-Mendoza, N. 2014. Ocurrencia de *Nacobus aberrans* en Cultivos Hortícolas del Noroeste de Michoacán, México. *Nematropica* 44: 107-117.
25. Campos-Herrera, R., El-Borai, F. E., Ebert, T. E., Schumann, A., and Duncan, L. D. 2014. Management to control citrus greening alters the soil food web and severity of a pest–disease complex. *Biological Control* 76: 41-51.
26. Ceja-Torres, L. F., Mora-Aguilera, G. and Mora-Aguilera, A. 2014. Agronomical management influence on the spatiotemporal progress of strawberry dry wilt in Michoacan, Mexico. *African Journal of Agricultural Research* 9: 513-520.
27. Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, H., and Civerolo, E. 2009. A Phytoplasma Related to “*Candidatus Phytoplasma asteri*” detected in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopatology* 99: 236-242.
28. Childers, C. C., Kitajima, E. W., Welbourn, W. C., Rivera, C. y Ochoa, R. 2001. Brevipalpus como vectores de la leprosis de los cítricos. *Manejo Integrado de Plagas* 60: 61-65.

29. Colleta-Filho, H. D., Tagon, M. L. P. N., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu Júnior, J., Machado, M. A. 2004. First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease* 88: 1382.
30. Coria-Contreras, J., Mora-Aguilera, G., Martínez-Bolaños, M., Guzmán-Deheza, A., Acevedo-Sánchez, G. y Flores-Sánchez, J. L. 2014. Epidemiología de la roya del café (*Hemileia vastatrix*) en Soconusco, Chiapas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32 (Suplemento): 43.
31. Coria-Contreras, J., Mora-Aguilera, G., Martínez-Bolaños, M., Guzman-Deheza, A., Acevedo-Sánchez, G. y Flores-Sánchez, J. L. 2014. Fluctuación estacional de uredosporas de *Hemileia vastatrix* en el Soconusco, Chiapas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32 (Suplemento): 42.
32. Cortez-Madrigal, H., Sánchez-Saavedra, J. M., Díaz-Godínez, G. and Mora-Aguilera, G. 2014. Enzymatic Activity and Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi from Central and Southeastern Mexico to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Southwestern Entomologist* 39(3): 491-502.
33. Cortez, M. E., Loera, G. J., Hernández, F. L., Barrera, G. J., Fontes, P. A., Díaz, Z. U., Jasso, A. J., Reyes, R. M., Manzanilla, R. M. y López, A. J. 2013. Manual para el Uso de Insecticidas Convencionales y Alternativos en el Manejo de *Diaphorina citri* Kuwayama en Cítricos, en México. Folleto Técnico No. 36. INIFAP. 65 p.
34. Da Graca, J. V. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathology* 29: 109-136.
35. Da Graca, J. V. and Korsten, L. 2004. Citrus Huanglongbing: Review, Present status and Future Strategies. *Diseases of fruit and Vegetables* 1: 229-245.
36. Da Graça, J.V. 2008. Biology, History and World Status of Huanglongbing. *Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido asiático de los cítricos*. Hermosillo, Son.
37. Das, A. K., Rao, C. N. and Singh, S. 2007. Presence of citrus greening (Huanglongbing) disease and its psyllid vector in the North-Eastern region of India confirmed by PCR technique. *Current Science* 92: 1759-1763.
38. Davies, F. S. and Albrigo, L. G. 1994. Citrus. Wallingford: CAB International. 254p.

39. Dirección General de Fomento a la Agricultura. 2007. Presencia del Huanglongbing en Florida, EE.UU. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Circular No. 15220, septiembre 2005.
40. Domínguez-Monge, S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 63 p.
41. Esquivel-Chávez, F. 2011. Análisis Histológico y Epidemiológico de limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 56 p.
42. Fan, G. C., Xia, Y. L., Lin, X., Hu, H., Wang, X., Ruan, C., Lu, L. and Liu, B. 2016. Evaluation of thermotherapy against Huanglongbing (citrus greening) in the greenhouse. *Journal of Integrative Agriculture* 15: 111-119.
43. FAO. 2015. Producción Mundial de cítricos 2013. (FAOSTAT). Consultado el 20 de Marzo 2016. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#anchor>.
44. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., López-Arroyo, J. I. y Robles-García, P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.
45. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., Velázquez-Monreal, J. J. y Manzanilla-Ramírez, M. A. 2014. Impacto productivo y fisiológico inducido por *Candidatus liberibacter asiaticus* en limón mexicano a cuatro años de ingreso en Colima. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: (Suplemento) S54.
46. Flores-Sánchez, J., Mora-Aguilera, G., Velázquez-Monreal, J. J., López-Arroyo, J. I., Loeza-Kuk, E., Hernández, R., Domínguez-Monge, S. y Acevedo-Sánchez, G. 2012. Caracterización epidemiológica del HLB en Colima con énfasis en el subsistema manejo. *In* Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. p: 61-62. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.
47. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., Rivas-Valencia, P., Ruiz-García, N., López-Arroyo, J. I., Hernández-Chan, E., Novelo-Cocon, A., López-Sánchez, P., y Sánchez-Rebolledo, F.

2011. Gradientes de Dispersión del HLB a partir de Focos Iniciales de Infección en la Península de Yucatán. *In: Memoria del 2do. Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México.* 5 y 6 de Diciembre. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. pp: 83-87.
48. Flores-Sánchez, J. L. 2011. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing de los cítricos (HLB), en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México. 68 p.
49. Fritz M. R. 2011. Defining the economic “tipping point” in the management of citrus greening: Follow the standard protocol or shift to an enhanced foliar nutritional program. *In: 18th International Farm Management Congress.* P:159-165 Methven, Canterbury, New Zealand.
50. FUNDECITRUS. 2007. Manual Técnico de Greening. Folleto Técnico. Brasil. 12 pp.
51. García, D. C. 2009. Distribución del Huanglongbing (HLB – Greening) en el mundo. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria-Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SENASA-SINAVIMO).
52. Garnier, M., Jagoueix, E., Cronje, R. P., Le Roux, F. G., and Bové, J. 2000. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of '*Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis*.' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2119-2125.
53. Góngora, C. C., Escamilla, B. J., Pérez, H. O. y Mora, A. G. 2004. Gradientes de diseminación del amarillamiento letal en cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Sisal Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 370-376.
54. Gottwald, T. R., Aubert, B. and Zhao, X. Z. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglungbin) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79:687-693.
55. Gottwald, T. R., Gonzales, G. I. and Mercado, B. G. 1990. Greening, stubborn, and other diseases. 414-420 pp. *In: Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologist.* IOCV, Riverside.

56. Gottwald, T. R., Garnsey, S. M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M. and Borbon, J. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. *Fruits*. 52:397-404.
57. Gottwald, T. R., Da Graça, J. V. and Bassanezi, R. B. 2007. Citrus huanglongbing: The pathogen, its epidemiology, and impact. *Plant Healthy Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
58. Gottwald, T. R. 2010. Current Epidemiological understanding of citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48:119-139.
59. Gottwald, T. R., Graham, J. H., Irey, M. S., McCollum, T. G., and Wood, B. W. 2012. Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection* 36: 73-82.
60. Gottwald, T., Luo, W., Riley, T. and Parnell, S. 2014a. Edge effect and Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology* 1: 126-127.
61. Gottwald, T. R., Hall, D. G., Kriss, A. B., Salinas, E. J., Parker, P. E., Beattie, G. A.C. and Nguyen, M. C. 2014b. Orchard and nursery dynamics of the effect of interplanting citrus with guava for huanglongbing, vector, and disease management. *Crop Protection* 64:93-103.
62. Grafton-Cardwell, E. E., Stelinski, L. L., Stansly, P. A. 2013. Biology and management of Asian Citrus Psyllid, Vector of Huanglongbing Pathogens. *Annual Review Entomology*. 58: 413-432.
63. Hall, D. G., Richardson, M. L., Ammar, E. D., and Halbert, S. E. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol. Exp. App.* 146: 207-223.
64. Hendrichs, J., Kenmore, P., Robinson, A. S. and Vreysen, M. J. B. 2007. Area-wide integrate pest management (AW-IPM): Principles, Practice and Prospects. Pp: 3-33 *In* Vreysen, M. J. B., Robinson, A. S. and Hendrichs, J. (eds.). *Area-wide control of insects pest*. Springer. Vienna, Austria.
65. Hernández-Chan, E. C., Mora-Aguilera, G., Cano-Medrano, R., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J. I., Velázquez-Monreal, J. J., Flores-Sánchez, J. L. y Domínguez-Monge, S. 2014. Efecto Fisiológico y Nutritional del HLB en limón mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: (Suplemento) S97.

66. Hernández-Nava, G. A. 2013. Prevalencia de *Toxoptera citricida* y tasa de adquisición del Citrus tristeza virus en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 83 p.
67. Hoffman M T, Doud M S, Williams L, Zhang M Q, Ding F, Stover E, Duan Y P. 2013. Heat treatment eliminates '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology* 103: 15–22.
68. Ichinose, K., Hoa, N. V., Bang, D. V., Tuan, D. H. and Dien, L. Q., 2012. Limited efficacy of guava interplanting on citrus greening disease: effectiveness of protection against disease invasion breaks down after one year. *Crop Protection* 34: 119-126.
69. Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyara, S. 2009. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Ann. Appl. Biol.* 155: 29–36.
70. INTA. 2011. Programa Nacional de Prevención de Huanglongbing (HLB). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Arg. consultado en línea en octubre de 2014 en: <http://ria.inta.gov.ar/?p=677>
71. IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). 2012. IRAC MoA Classification Scheme. IRAC International MoA Working Group. IRAC executive. Version 7.2 23 p.
72. Irey, M. 2009. Current situation, regulation and management of HLB in Florida, USA as well as containment measures for the rest of the country. Taller Internacional de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. Villahermosa, Tabasco. México. 1p.
73. Irey, S. M., Gast, T. and Snively, J. 2008. Grove management at southern gardens citrus in the Presence of Huanglongbing. 5 pp. *In: memorias del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los Cítricos Candidatus Liberibacter spp) y el psílido asiático de los cítricos (Diaphorina citri)*. 7-9 de Mayo, 2008. Hermosillo, Sonora, México.
74. Irey, M. S., Gast, T. and Gottwald, T. R. 2006. Comparison of visual assessment and polymerase chain reaction assay testing to estimate the incidence of the Huanglongbing pathogen in commercial Florida citrus. *Proceedings of Florida State Horticultural Society* 119: 89-93.

75. Kwon, Y. C., Ray, R. B. and Ray, R. 2014. Hepatitis C virus infection: establishment of chronicity and liver disease progression. *Experimental and Clinical Sciences* 13: 977-996.
76. Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LANREF). 2016. Análisis regional del estatus epidémico e impacto productivo de CLAs en cítricos agrios del estado de Michoacán. Informe final. 53 p.
77. Loeza-Kuk, E., Jasso-Argumedo, J., Lozano-Contreras, M., Hernandez-Chan, E. 2010. Dispersión *Candidatus Liberibacter* spp. en huertas citrícolas de Yucatán, México. Pp: 125-134 *In: 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 8 y 9 de diciembre. Monterrey, N. L.*
78. Loeza-Kuk, E., Ochoa-Martínez, D. L., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Gutiérrez-Espinosa, M. A., de Jesús Junior, G. C., Villegas-Monter, A., Arno-Wulff, N. and Perez-Molphe-Balch, E. 2008. Detection of citrus sudden death-associated virus and haplotypes of *Citrus tristeza virus* in *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola* and implication on citrus sudden death in Brazil. *Agociencia* 42: 669-678.
79. Lopes, A. S., Frare, F. G., Bertolini E., Cambra, M., Fernandes, G. N., Ayres, J. A., Marin, R. D. and Bové, M. J. 2009. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: *Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. *Plant Disease* 93: 257-267.
80. Lopes, S. A., Frare, G. F., Wulf, N. A. and Fernandes, N. G. 2007. Epidemia del Huanglongbing (greening) no Estado de Sao Paulo: provavel influencia da temperatura e das diferencas em transmissibilidade dos patógenos na distribucao geográfica da doenca. *FUNDECITRUS*. 69-76 pp.
81. López-Arroyo, J. I., Díaz-Martínez, S., Torres-Acosta, R. I., Reyes-Rosas, M. A. y Loera-Gallardo, J. 2012. Nuevos registros de depredadores del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama, en el Noreste de México. En *Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. p: 287. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.*

82. López-Arroyo, J. I. y Rocha-Peña, M. (Eds.) 2012. 3° Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Memorias. 10-12 diciembre, Veracruz Ver.
83. Lopez, J. A. and Durborow, S. L. 2014. Huanglongbing and the California citrus industry: a cost comparison of do nothing vs do something management practices. The Texas Journal of Agriculture and Natural Resources 27: 51-68.
84. Lozano-Contreras, M. G. y Jasso-Argumedo, J. 2012. Identificación de enemigos naturales de *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) en el estado de Yucatán, México. Fitosanidad 16: 5-11.
85. Manzanilla-Ramírez, M. A., Robles-Gonzalez, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Orozco-Santos, M. y Carrillo-Medrano, S. H. 2012. Experiencias y perspectivas del Huanglongbing en Limón Mexicano. Pp: 406-414 In Memorias del 3° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing.. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.
86. Márquez, P. F., Márquez, G. J., Rodríguez, M. M. L., Esquivel, C. F., Mora, A. G. y Acevedo, S. G. 2011. Análisis espacial y temporal del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en el municipio de Xalisco, Nayarit. (poster) In: 2do. Taller Internacional de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. 1519 de agosto. Manzanillo, Col.
87. Miranda, S. H. G., Adami, A. C. O. and Bassanezi, R. B. 2012. Economic impacts of Huanlongbing disease in São Paulo State. Poster prepared for presentation at the International Association of Agricultural Economists (IAAE) Triennial Conference, Foz do Iguaçu, Brazil, August 18-24. Revisado en web el 10 de diciembre de 2015.
http://iaae.confex.com/data/abstract/iaae/iaae28/Paper_17434_abstract_11032_0.pdf
88. Medina-Urrutia, V. M., Becerra-Rodríguez, S. y Ordaz-Ordaz, E. 2004. Crecimiento y rendimiento del limón mexicano en altas densidades de plantación en el trópico. Revista Chapingo Serie Horticultura 10: 43-49.
89. Meyer, M. J., Hoy, A. M. and Singh, R. 2007. Low incidence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations between Nov 2005 and Jan 2006: relevance to management of citrus greening disease in Florida. Florida Entomologist 90: 395-397.

90. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Flores-Sánchez, J., González-Gomez, R. and Robles-García, P. 2013. Applied epidemiology to plant disease risk analyses. Pp: 27-29 *In Proceedings IV Brazilian Workshop of Plant Disease Epidemiology*. Curitiba. Brasil. Dec. 2-4.
91. Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., Gutiérrez-Espinosa, A. y Loeza-Kuk, E. 2014a. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108-119.
92. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Flores-Sánchez, J., Hernández, R., González- Gómez R. and Robles-García P. 2014b. Regional Epidemiology: A new frontier and challenge in plant pathology. *In: 47° Congreso Brasileiro de Fitopatología*. 6 pp. Del 17 al 22 de Agosto. Londrina, Paraná. Brasil.
93. Mora-Aguilera, G., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., Oropeza-Salin, C., González-Gómez, R., and Robles-García, P. 2014c. Vigilancia Epidemiológica y Estatus Actual del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), Punta Morada de la Papa (PMP) y Huanglongbing de los Cítricos (HLB) en México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 32:120-131.
94. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Calderón-Estrada, G., Flores-Sánchez, J. L., Dominguez-Monge, S., Baker, P. y González-Gómez, R. 2014d. Consideraciones epidemiológicas del cambio climático en la fitosanidad de los cultivos tropicales. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 147-167.
95. Mora-Aguilera, G., Acevedo, G., Flores, J., Domínguez, S., Coria, J., Hernandez, A., González, R., López, A., Sánchez, H., Feria, J., Trujillo, J., López, E., Méndez, A., Matuz, J. and Martínez, M. 2014e. Epidemiological Surveillance System for Coffee Rust Disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: a Regional Approach. *In: The 25th International Conference on Coffee Science*. 42-47 pp. September 8-14. Armenia, Colombia.
96. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., González-Gómez, R., González-Ochoa, M., Ramírez-Mendoza, C., López-Guzmán, I., López-Buenfíl, A., Flores-Sánchez, J. L., López-Pérez, E., Méndez-Ramos, A., Mendoza-Gómez, L. y Matuz-Conde, J. 2014f.

- Análisis espacio-temporal de la roya del café en Chiapas, Veracruz y Puebla. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32 (S): 43.
97. Mora-Aguilera, G., Coria-Contreras, J., Flores-Sánchez, J., Domínguez-Monje, S., Acevedo-Sánchez, G., Aguilar-Pérez, L., Martínez-Bolaños, M. y Guzmán-Deheza, A. 2014g. Desarrollo y validación de una trampa pasiva para monitoreo de esporas de *Hemileia vastatrix*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32 (S): 83.
98. Moyano, M. I. y Leone, A. 2014. Alerta! HLB. Terrible enfermedad de los cítricos. *Agromensajes* 39: 19-29. Agosto 2014. Facultad de Ciencias Agrarias. UNR. Consultado en línea en marzo de 2015 en: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/wp-content/uploads/2014/09/4AM39.pdf>
99. NAPPO. 2012. Protocolos de diagnóstico de la NAPPO: Huanglongbing de los cítricos. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. PD 02.
100. Nguyen, V. H., Tran, M. H., Nguyen, T. B., Bui, N. L., and Nguyen, M. C. 2013. Results on attempts in management of HLB under small scale in Vietnam and initiation in screening for HLB tolerant from varieties/clones belonging to Rutaceae. *IRCHLB III Proceedings*. Pp: 10-13.
101. OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). 2013. Norma Regional de Sanidad Vegetal (NRSV): Lineamientos de Armonización Normativa Regional de Certificación Fitosanitaria de Material Propagativo de Cítricos. <http://faolex.fao.org/docs/pdf/cos145367.pdf>
102. Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., Alatorre-Rosas, R., González-Hernández, H. and Mora-Aguilera, G. 2015a. *In vivo* selection of entomopathogenic fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) *Biological Control* 90: 1-5.
103. Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., Alatorre-Rosas, R., González-Hernández, H., Mora-Aguilera, G. and Rodríguez-Maciel, J. C. 2015b. *In vitro* selection of a fungal pathogen for use against *Diaphorina citri*. *Biological Control* 90: 6-15.
104. Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Bermúdez-Guzmán, M.J., Carrillo-Medrano, S. H., Medina-Urrutia, V. M., Hernández-Fuentes, L.M., Gómez-Jaimes, R., Manzano-Sánchez, G., Farías-

- Larios, J., Nieto-Ángel, D., Mijangos-Hernández, E., Sánchez-de la Torre, J.A. y Varela-Fuentes, S. 2014. El Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 449p.
105. Ortega-Arenas, L. D., Villegas-Monter, A., Ramírez-Reyes, A. J. y Mendoza-García, E. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazones, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana* 29(2): 317-333.
106. Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D. and Unakalamba, C. B. 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology* 4(4): 46-57.
107. Pacheco, C. J., Samaniego, R. J. y Fontes, P. A. 2012. Tecnología para el manejo integrado del psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en cítricos en Sonora. Folleto Técnico No. 88. INIFAP.
108. Parnell, S., Gottwald, T. R., Gilks, W. R. and den Bosch, F. V. 2012. Estimating the incidence of an epidemic when it is first discovered and the design of early detection monitoring. *Journal of Theoretical Biology* 305: 30-36.
109. Patiño-Arellano, S. A. 2012. Complejo de áfidos y riesgo de dispersión del virus de la tristeza de los cítricos en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 63 p.
110. Pelz-Stelinski, K. S., Brlansky, R. H., Ebert, T. A., Rogers, M. E. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *J. Econ. Entomol.* 103:1531–141.
111. Petri, G. y Nicolás, J. 2015. Evaluación del potencial impacto económico del HLB (Huanglongbing) en la economía Argentina. IICA. 52 p.
112. Ramírez, D. A. M., Robles, G. P. L. y Reyes, G. B. (eds.) 2000. Memorias de la segunda reunión nacional de la campaña contra el virus de la tristeza de los cítricos. 12 y 13 de Octubre, Veracruz, México. 134 p.
113. Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G., Ruiz-García, N., Ochoa-Martínez, D., Gutiérrez-Espinosa, A. y Febres, V. 2010. Análisis espacio-temporal de

- aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1: 493-507.
114. Robles, G. P. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>
115. Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., López-Arroyo, J. I. y Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19(1): 15-31.
116. Robles-González, M. M., Medina-Urrutia, V. M. y Manzanilla-Ramírez, M. A. 2014. Fenología y Poda. Pp: 135-154 *In: El limón mexicano (Citrus aurantifolia)*. Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A. y Bermúdez-Guzmán, M. (eds.). SAGARPA, INIFAP, CIRPAC. Colima, México.
117. Rogers, M.E., Stansly, P. A. and Stelinski, L. L. 2011. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a psyllid management plan. University of Florida, IFAS Extension, Gainesville, FL. 2 p.
118. Roistacher, C. N. 1991. Greening. *In Techniques for Biological Detection of Specific Citrus Graft Transmissible Diseases*, pp. 35–45. Rome: Food Agriculture Organization.
119. Roistacher, C. N. 1996. The economics of living with citrus disease: Huanglongbing (greening) in Thailand. 279-285 pp. *In: Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV. Riverside.
120. Sánchez-Velázquez, E. J., Santillán-Galicia, M. T., Novelli, V. M., Nunes, M. A., Mora-Aguilera, G., Valdez-Carrasco, J. M., Otero-Colina, G. and Freitas-Astúa, J. 2015. Diversity and genetic variation among *Brevipalpus* populations from Brazil and Mexico. *PLoS ONE* 10(7): e0133861. doi:10.1371/journal.pone.0133861.
121. Sandoval-Reyes, F., Arriaga-Gaona, M. L., Hernández-Limón, L., Hernández-Romero, I. Guzmán-González, F. I. 2013. Actividad biológica en campo del extracto etanólico de *Melia azedarach*, *Psidium guajava*, *Datura stramonium*, *Piper auritum* y

- Azadirachta indica a juss* sobre la *Diaphorina citri*. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 9: 22-29.
- 122.Santivañez, C. T., Vernal-Hurtado, P., Mora-Aguilera, G., Díaz-Padilla, G. y López-Arroyo, J. I. 2014. Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 73 p.
- 123.SENASICA. 2010. Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing. 2ª Edición. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), México, D. F. Revisado en web el 13 de marzo de 2016 <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>
- 124.SENASICA. 2012. Protocolo para establecer áreas regionales de control del Huanglongbing y el psilido asiático de los cítricos (ARCO's). www.senasica.gob.mx/?doc=9364)
- 125.SENASICA. 2016. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe octubre, 2015. México, D. F. Revisado en web el 15 de marzo de 2016. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
- 126.Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE). 2013. <http://www.senave.gov.py/docs/resoluciones/senave/Res80-13.pdf>
- 127.Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Cierre de la producción agrícola por estados. Revisado en web el 10 de enero de 2016. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- 128.SINAVEF. 2014. Huanglongbing "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Consultado en línea en Julio de 2014 en: <http://portal.sinavef.gob.mx/EpidemiologiaFitosanitariaHLB.html>
- 129.Singerman, A. and Useche, P. 2015. Impact Citrus Greening on citrus operations in Florida. <https://edis.ifas.ufl.edu/fe983>
- 130.Skaria, M. and Hanagriff, R. D. 2008. Micro-budded, high density citrus planting: Is there an opportunity for HLB control and financial returns?. IRCHLB Proceedings. Pp: 365-368.

- 131.Souza, A. A., Müller, G. W., Targón, M. L. P. N., Takita, M. A. and Machado, M. A. 2002. Stability of the mild protective “PIAC” isolate of citrus tristeza virus. Pp. 131-135. In: Proceeding of the 15th Conference of IOCV. Riverside, CA.
- 132.Spann, T. M., Schumann A.W., Rouse B., Ebel B. 2011. Foliar nutrition for HLB. Citrus Industry. (June): 6-10.
- 133.Stansly, P. A., Arevalo, H. A., Qureshi, J. A., Jones, M. M., Hendricks, K., Roberts, P. D. and Roka, F. M. 2014. Vector control and foliar nutrition to maintain economic sustainability of bearing citrus in Florida groves affected by Huanglongbing. Pest Management Science 70: 415-426.
- 134.Stuchi, E. S and Girardi, E.A. 2010. Use of horticultural practices in citriculture to survive Huanglongbing. Documentos, 189/Embrapa Cassava & Fruits, ISSN 1809-4996. 67 p.
- 135.Stuchi, E. S., Reiff, E. T., Sempionato, O. R., Parolin, L. G., and Toledo, D. A. 2013. Evidence that ‘flying dragon’ trifoliolate orange delays HLB symptom expression for four sweet orange cultivars, Tahiti lime and Okitsu mandarin. IRCHLB III Proceedings. P 10-18.
- 136.Teixeira, C. D., Saillard C., Eveillard S., Danet, L. J., da Costa, P., Ayres, J.A. and Bové, J. 2005. *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1857–1862.
- 137.Torres-Pacheco, I., López-Arroyo, J. I., Aguirre-Gómez, J. A., Guevera-González, R. G., Yanez-López, R., Hernández-Zul, M. I. y Quijano-Carranza, J. A. 2013. Potential Distribution in Mexico of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of CLas pathogen. Florida Entomologist 96: 36-47.
- 138.Trujillo, A. J., Sánchez, A. M. y Robles G. P. 2008. Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos en México. 3 pp. In: Memorias del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los Cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). 7-9 de Mayo, 2008. Hermosillo, Sonora, México.
- 139.Tsiantos, J., Psallidas, P. and Chatzaki, A. 2003. Efficacy of alternatives to antibiotic chemicals for the control of fire blight of pears. Ann. Appl. Biol. 143: 319-323.

140. Van der Merwe, A. J. and Andersen, F. G. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in transvaal citrus greening? *Farming in South Africa*. 12:439-440.
141. Van der Plank, J. E. 1963. *Plant Diseases. Epidemics and Control*. Academic Press, New York. 349 p.
142. Van Vuuren, S. P., Collins, R. P. and Da Graca, J. V. 1993. Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 50:112-116.
143. Van Vuuren, S.P., Van der Vyver, J. B., Luttig, M. and da Graça J. V. 2000. Low Incidence of Huanglongbing Fruit Symptoms in Valencia Sweet Orange Trees in the Presence of a Population of Citrus Tristeza Virus. In *Proc. 14th Conf. IOCV*. Riverside, CA.
144. Xia, Y., Ouyang, G., Sequeira, R. A., Takeuchi, Y., Baez, I., and Chen, J. 2011. A review of Huanglongbing (Citrus Greening) management in citrus using nutritional approaches in China. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2010-1003-01-RV.
145. Xu, M., Liang, M., Chen, J., Xia, Y., Zheng, Z., Zhu, Q., and Deng, X. 2013. Preliminary research on soil conditioner mediated citrus Huanglongbing mitigation in the field in Guangdong, China. *European Journal of Plant Pathology* doi: 10.1007/s10658-013-0238-z.
146. Zadoks, J. C., and Schein, R. D. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. Oxford University Press, New York. 427 p.
147. Zhang, M., Duan, Y., Zhou, L., Turechek, W. W., Stover, E. and Powell, C. A. 2009. Screening Molecules for Control of Citrus Huanglongbing Using an Optimized Regeneration System for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'-Infected Periwinkle (*Catharanthus roseus*) Cuttings. *Phytopathology* 100: 239-245.
148. Zhang, M. Q., Powell, C. A., Zhou, L. J., He, Z. L., Stover, E. and Duan, Y. P. 2011. Chemical compounds effective against the citrus Huanglongbing bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in planta. *Phytopathology* 101: 1097-1103.
149. Zhao, X. Y. 1981. Citrus yellow shoot disease (Huanglongbing) - a review. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 1:466-469.

CAPÍTULO II

EPIDEMIOLOGÍA COMPARATIVA DE LA INTENSIDAD EPIDÉMICA DEL HUANGLONGBING EN DOS ESCENARIOS REGIONALES DE MÉXICO

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo analizar comparativamente los procesos epidémicos entre las regiones del Pacífico (PCO) y Península de Yucatán (PEN) con el propósito de operar acciones preventivas y protectivas más racionales y eficientes que permitan la rentabilidad productiva. Se evaluaron 15 variables asociadas al sistema epidemiológico. El HLB se encontró presente en 176/197 huertos, en Colima 35, con cronicidad promedio del 66% (± 16.7); en Michoacán 131, con cronicidad promedio del 33.8% (± 30.7); en Yucatán 6, con cronicidad promedio del 6.5% (± 18.4); en Campeche 3, con cronicidad promedio del 1% (± 2.3); y en Q. Roo 2, con cronicidad promedio del 25% (± 10.6). A nivel unifactorial, la región del PCO fue significativamente mayor que la PEN, en cuanto a cronicidad (49.9%, ± 31.8), especie citrícola (165.1, moda= 111.0), vigor de árboles (119.1, moda= 151.8), número de brotes (20.4, ± 6.4), número de plagas (126.9, moda= 91.3), concentración de CLas en planta (7.7, ± 6.9) y vector (7.7, ± 7.6), número de generaciones potenciales (NGP) (16.4, ± 3.4), índice de abundancia citrícola (IAC) (0.34, ± 0.18) e índice de traspatio (IT) (0.21, ± 0.10) ($P < 0.05$). A nivel multifactorial, se generó un índice multivariado (IM) con las variables que explicaron el 90% de la varianza: edad de plantas, nivel de manejo agronómico de los huertos, concentración de CLas en planta, NGP y número de brotes, con distinto peso según el componente. El IM fue significativamente mayor en la región PCO, en Colima fue $IM=0.01$ y en Michoacán $IM=0.005$, en comparación con PEN, en la cual Campeche y Yucatán tuvieron el menor con $IM=0.0004$ y Q. Roo $IM=0.0007$ ($P < 0.0001$). Adicionalmente, el progreso temporal del HLB fue de menor velocidad e intensidad en la región PEN ($1/b=0.02$) que en la región PCO ($b=0.07$), lo cual permite sustentar que la baja carga de inóculo de CLas en planta y vector y la reducida disponibilidad de tejido, y en consecuencia menor NGP, mantienen una condición de baja prevalencia del HLB, en comparación con la región del PCO en donde existe una condición endémica y crónica de esta enfermedad.

1. INTRODUCCIÓN

El concepto de regionalidad en estudios fitosanitarios es un desafío y una oportunidad de desarrollo que provee una visión de sustentabilidad productiva. Adicionalmente, si el cultivo y su productividad es el eje central de integración fitosanitaria y tecnológica, es posible desarrollar modelos racionales productivos y sustentables (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b). Un ejemplo de la importancia de una visión regional es el estudio del cambio climático en la sanidad de cultivos, el cual es imposible entender y explicar con estudios en una dimensión espacial local o parcelaria (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014b; Parnell *et al.*, 2012).

En el control de plagas insectiles, Hendrichs *et al.*, (2007) acuñaron el concepto de *manejo integrado de plagas en áreas amplias* (enfoque regional) e indicaron que este enfoque es mejor que el manejo integrado de plagas a nivel parcelario, debido principalmente, a que reduce las poblaciones de insectos plagas durante mayor tiempo, reduce el uso de insecticidas por lo que tiene un menor efecto ambiental y también reduce los costos de aplicación. Hendrichs *et al.* (2007) señalaron que el enfoque parcelario es altamente reactivo y se basa en el control de la plaga cuando los niveles de la misma tienen implicación económica, mientras que el enfoque regional o de áreas amplias es preventivo y sustentable al cubrir una mayor área y tener un efecto duradero en la reducción de las poblaciones de la plaga.

Esta visión reactiva también se utiliza en áreas como la Epidemiología, ya que el enfoque clásico de esta disciplina se basa en el principio de infección, el cual tiene como consecuencia el estudio de la población de plantas enfermas (Vanderplank, 1963; Zadoks and Schein, 1979), es decir, la epidemiología se estudia a partir de focos de infección y bajo un escenario del principio de protección. Sin embargo, tal como el control de plagas lo señala esta visión reactiva es restrictiva, insustentable y requiere la aplicación de una estrategia preventiva, la cual explique holísticamente los factores regionales involucrados en una epidemia. Por lo tanto, un estudio epidemiológico con enfoque regional requiere la integración de los subsistemas del sistema epidemiológico, mediante la evaluación de variables del hospedante, patógeno, vector, clima, manejo, y suelo (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a; Flores-Sánchez *et al.*, 2012).

Aunque el concepto regional es intuitivo (Hendrichs *et al.*, 2007; Bové, 2012) se requiere un planteamiento conceptual a diferentes niveles de integración biológica, espacial, metodológica y operacional. Un modelo de estas características fue propuesto por Mora-Aguilera (Mora-Aguilera, 2003. Notas de curso de Epidemiología Agrícola) y empleado como base racional para estudios epidemiológicos regionales en cocotero (Góngora *et al.*, 2004), cítricos (Domínguez-Monge, 2011), nopal (Alonso-Barrera *et al.*, 2014), fresa (Ceja-Torrez *et al.*, 2014) y recientemente en café (Mora-Aguilera *et al.*, 2014e, 2014f, 2014g; Coria-Contreras *et al.*, 2014a, 2014b) y agave (LANREF, 2016. Comunicación personal). La regionalidad en epidemiología es por lo tanto reciente y su análisis e incorporación a esta disciplina está en desarrollo (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014b).

Por lo anterior, la epidemiología regional se refiere al estudio de procesos epidemiológicos en un área constituida por un conjunto de unidades de producción que mantienen relaciones productivas, económicas y ambientales (Cuadro 2.4) (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b).

La visión reactiva de la epidemiología se ha aplicado con el Huanglongbing de los cítricos (HLB), enfermedad ampliamente distribuida en la citricultura mundial (Bové, 2006; Da Graca, 1991; Gottwald, 2010). Los estudios epidemiológicos se han basado en modelos descriptivos del comportamiento del HLB, a nivel parcelario (Gottwald *et al.*, 2006; 1989; 2014b; Aubert *et al.*, 1984; Bassanezi *et al.*, 2006). No obstante, en este patosistema, existen algunos estudios que muestran que el enfoque regional de control es más efectivo que el parcelario (Gottwald *et al.*, 2014a; Bassanezi *et al.*, 2013a; Bové, 2012; Rogers *et al.*, 2011). Bassanezi *et al.* (2013a) demostraron que el control regional de *Diaphorina citri* (DC), vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) y *C. L. americanus*, bacterias asociada al HLB en San Pablo, Brasil, permite reducir la incidencia de esta enfermedad hasta el 75%, requiere programas menos intensivos de control local del vector, y reduce los costos de manejo del HLB, porque las aplicaciones son menos intensivas y más eficientes. Sin embargo, en estos trabajos no se ha realizado un esfuerzo por entender el progreso epidémico a nivel regional que permita la planificación de control o estimar los potenciales impactos productivos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c)

En México, CLas se detectó por primera vez en Julio de 2009 en Tizimín, Yucatán y actualmente se encuentra presente en 19 de los 24 estados citrícolas del país (SENASICA,

2015). El comportamiento epidémico de esta enfermedad permitió definir dos escenarios epidémicos contrastantes (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a): 1) Región del Pacífico, con mayor intensidad epidémica y con prevalencia en huertos comerciales; esta región se integra por los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, con una superficie cítrica de 100,932 ha, de las cuales el 90% es limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) y limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) (SIAP, 2015), y 2) Península de Yucatán, con menor intensidad epidémica y con prevalencia en traspatios; esta región se integra por los estados de Quintana Roo, Campeche, y Yucatán, con una superficie cítrica de 27,698 ha, de las cuales el 95% es naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (SIAP, 2015). Sin embargo, esta caracterización se basa principalmente en los reportes de plantas e insectos con CLAs por parte del sector oficial de Sanidad Vegetal de México (SENASICA, 2015) y en algunos estudios parcelarios de diagnóstico epidemiológico y análisis de gradientes (Esquivel-Chavez, 2011; Márquez *et al.*, 2011; Flores-Sanchez *et al.*, 2011).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue realizar un análisis comparativo regional que permitiera parametrizar los procesos epidémicos entre las regiones del Pacífico y Península de Yucatán con el propósito de operar acciones preventivas y protectivas más racionales y eficientes que permitan la rentabilidad productiva.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de sitios de estudio

En un estudio epidemiológico regional la representatividad de la heterogeneidad es fundamental (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a, 2013). La selección de sitios de muestreo a nivel regional se realizó con base en la estimación de un factor de riesgo por unidad espacial (municipio), el cual se calculó con un método ponderativo de variables del sistema epidemiológico: hospedante, patógeno, vector, clima, manejo, y suelo. Esta metodología se ha empleado en diversos estudios para definir riesgos regionales y para establecer sistemas de vigilancia epidemiológica, en otros pato-sistemas (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Mora-Aguilera *et al.*, 2014c; Mora-Aguilera *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2012). Las regiones de estudio fueron el Pacífico (PCO) con los estados de Colima (Tecomán y Armería) y Michoacán (Tepalcatepec, Buenavista, Apatzingán, Parácuaro, Múgica, Gabriel Zamora y La Huacana) y Península de Yucatán (PEN) con los estados de Quintana Roo (O. P. Blanco), Campeche (Campeche y Escárcega), y Yucatán (Tizimin, Dzan, Oxksutzcab,

Ticul y Kinchil) (SIAP, 2015). El número de sitios de muestreo se estimó con las siguientes ecuaciones:

$$Nue = (Sup - i^{Fact - i} / \sum Fact - i) * N \quad [E.1]$$

Donde: Nue = Número de unidades espaciales; $Sup-i$ = Superficie cítrica por unidad espacial- i ; $Fact-i$ = Factor de ponderación por unidad espacial- i ; N = número de unidades espaciales factibles de evaluar.

$$Fact - i = (Sup - i) * (Ind_{Suscep-i}) * (Carga_{CLas-i}) * (Ind_{DC-i}) * (Ind_{Trasp-i}) \quad [E.2]$$

Donde: $Fact-i$ = Nivel de riesgo por unidad espacial- i ; $Sup-i$ = Superficie sembrada (ha) de especies cítricas por estado, distribuida en cuartiles, en relación al total de la superficie cítrica del estado. A mayor superficie mayor valor de ponderación; Ind_{DC} = Índice de *D. citri* (DC) obtenido con el modelo de dinámica poblacional de *D. citri* generado por Torres-Pacheco *et al.*, 2013 a nivel nacional.

$$Indice_{Suscep} = [\sum_{i=1}^n (Sup - i * PondSuscep_i)] / Sup_{total} \quad [E.3]$$

Donde: $Indice_{Suscep}$ = Índice de susceptibilidad relativa de especies cítricas a *Candidatus Liberibacter asiaticus*; $Sup-i$ = Superficie sembrada de n especies de cítricos: limón mexicano= LM , limón persa= LP , limón italiano y toronjo= LI,T , mandarina= M y naranja dulce= ND , por unidad espacial; $PondSuscep_i$ = Valor ponderado de la susceptibilidad de especies cítricas a *Candidatus Liberibacter asiaticus*, $LM=5$, $LP=4$, LI , $T=3$, $M=2$ y $ND=1$ (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012); $SupCitri_{total}$ = Total de superficie cítrica sembrada en cada región.

$$Carga_{CLas} = (Región) + (Cercania_{foco}) + (Positivos_{Veg}) + (Positivos_{Psil}) \quad [E.4]$$

Donde: $Carga_{CLas}$ = Indicador del nivel de incidencia en planta y vector; $Region$ = Vertientes con categorías epidémicas por su nivel de intensidad (Península=1, Pacífico=2); $Cercania_{foco}$ = Indicador (1-4) del riesgo por cercanía de regiones con HLB:

Región con presencia=4, Región Contigua a una con presencia de HLB=3, Región Intermedia a una con presencia de HLB=2 y Región Distante a una con presencia de HLB=1; $Positivos_{veg}$: Incidencia de número de muestras vegetales positivas a HLB por municipio, con datos del SENASICA; $Positivos_{psil}$: Incidencia de número de muestras de vector positivas a HLB por municipio, con base de datos del SENASICA.

$$IndTrasp = [(Ind_{AsentHum}) + (Ind_{Sup-i}) + (Ind_{Aagri})]/3 \quad [E.5]$$

Dónde: $IndTrasp$ =Índice de traspatio; $Ind_{AsentHum}$ = Índice generado a partir de la superficie (ha) del territorio municipal entre la superficie (ha) de asentamientos humanos. Ind_{Sup-i} = Índice generado con la superficie citrícola (ha) del municipio entre la superficie (ha) territorial del municipio; Ind_{Aagri} = Índice generado con la superficie agrícola (ha) del municipio entre la superficie (ha) territorial del municipio.

Los huertos se seleccionaron por criterios de riesgo de presencia y dispersión de CLAs, tales como rutas de movilidad, preferencia a especies ácidas por mayor vulnerabilidad y atracción de DC.

2.2. Método de muestreo

El segundo nivel de muestreo en un estudio regional es el parcelario. El muestreo parcelario se realizó con el método “T”, el cual se nombre así por la forma de selección de plantas a evaluar. Es un método sistemático y de gran practicidad por ser de patrón de muestreo continuo. Consiste en seleccionar 20 plantas por huerto, intercaladas 1 cada 3, se seleccionan 10 plantas del bordo del huerto y 10 hacia el interior del huerto, en doble transecto sobre la planta 5 y 6. Esta propuesta se basa en el efecto bordo de distribución inicial del HLB, por infestación de vectores provenientes de fuente de inóculo externo que inducen infecciones en los árboles periféricos de los huertos citrícolas, en un gradiente de dispersión de 30 a 40 m hacia el interior del huerto (Gottwald *et al.*, 2014b; Robles-González *et al.*, 2013; Bassanezi *et al.*, 2006). También se basó en estudios preliminares en México de la infestación de DC en huertos de tamaño medio (< 10ha), antes del ingreso de CLAs, los cuales demostraron la colonización de bordo e interior del huerto dependiendo de la infestación del huerto (DGSV, 2008. Comunicación Personal).

2.3. Variables evaluadas

Se evaluaron 15 variables por huerto, las cuales se seleccionaron con base en los subsistemas del sistema epidemiológico: planta-patógeno-vector-manejo. A nivel de huerto se evaluó: tipo de especie citrícola (valor ponderado por vulnerabilidad de especie citrícola, LM=3, LP=2 y ND=1), superficie sembrada (ha), tipo de riego (rodado o microaspersión), nivel de manejo agronómico (BT=baja tecnificación y AT=alta tecnificación), índice de abundancia citrícola, índice de traspatio [E.5], cronicidad del HLB (promedio de severidad de 20 plantas evaluadas por huerto), concentración de CLas en planta y vector y número de generaciones potenciales (NGP). A nivel de planta se evaluó: edad, vigor de árboles, brotación, número de plagas y enfermedades y severidad del HLB; para la evaluación de variables a nivel de planta se empleó una escala nominal (Cuadro 1).

Cuadro 1. Escala nominal empleada para la evaluación de cinco variables a nivel de planta, en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante marzo a mayo de 2015.

Clases	Edad (años)	Vigor	No. plagas y enfermedades	Brotación ^b	Severidad (%) ^c
0	2-4	Muerto	0	Número de brotes vegetativos	0
1	4-8	Malo	1-3	presentes en un cubo de 50 cm ³ , en	25
2	8-10	Bueno	4-8	cuatro puntos	50
3	>10	Muy Bueno	>8	cardinales del dosel	75
4	NC	Excelente	NC	de los árboles	100

^aNC: Clase no considerada; ^bNúmero de brotes vegetativos por punto cardinal evaluados con un cubo de 50x50x50 cm, del reciente periodo de brotación; ^cPorcentaje de copa con síntomas de HLB (Flores-Sánchez *et al.*, 2015).

El nivel de manejo agronómico se obtuvo mediante una encuesta a los productores, en la que se evaluaron las siguientes categorías: aspectos generales de los huertos como superficie, especie, propiedad del huerto (AG), nivel general de nutrición (N), vigor de árboles (V) (, control de maleza (CM), control general de plagas y enfermedades (CPE), y

tipo y frecuencia de riego (R); a partir de estos datos se estimó un factor de ponderación por inductividad al HLB (FPI), el cual fue la suma de los valores parciales por categoría:

$$FPI = \sum(AG, N, V, CM, CPE, R) \quad [E.6]$$

El nivel de tecnificación por huerto se obtuvo con la regla de decisión:

$$NT = si(FPI \leq \frac{FPI}{2}, "BT", "AT") \quad [E.7]$$

Donde: *NT*= Nivel de tecnificación de los huertos; *FPI*= Factor de ponderación por inductividad al HLB; *BT*= Baja tecnificación y *AT*= Alta tecnificación.

El índice de abundancia citrícola, un estimador de la abundancia relativa del hospedante a nivel de unidad espacial agrícola, en este caso se estimó por municipio asociado de los huertos evaluados. Se usó la siguiente ecuación:

$$IAC = Supcitri/SupAgri \quad [E.8]$$

Donde: *IAC*= Índice de abundancia citrícola; *Supcitri*= Superficie citrícola sembrada del municipio; *SupAgri*= Superficie del municipio destinada a la producción de cultivos agrícolas.

Con el propósito de obtener un indicador de la población de *D. citri* y determinar su efecto en el estatus epidémico del HLB en las regiones evaluadas, se realizó la estimación del grados días desarrollo (GDD) mediante el método del seno simple (Allen, 1976). El número de generaciones potenciales (NGP) se calculó dividiendo los GDD/ 211, el cual es una constante de los GDD necesarios para que *D. citri* complete una generación (Nava *et al.*, 2007). Los datos del promedio diario de temperatura se obtuvieron de la red de estaciones climáticas de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2015) distribuidas en México, durante el periodo 2005 al 2010; y se corrigieron por periodos de brotación por región citrícola y especie producida. Para corregir por periodos de brotación, se usaron los datos generados por esta investigación o se infirieron de Torres-Pacheco *et al.* (2013); Velázquez-Monreal *et al.* (2012); Lozano-Contreras y Jasso-Argumedo, (2012). Esta

corrección se sustenta en estudios que sugieren que existe fenología apta para la colonización de DC, la cual no es constante durante todo el año (Tsai *et al.*, 2002; Liu and Tsai, 2000). Esto permite estimar con mayor precisión la población de DC mediante el NGP.

2.4. Cuantificación de CLas en planta y vector

Con el propósito de determinar la presencia y concentración de CLas en planta y vector. En cada huerto se colectaron muestras vegetales compuestas de ocho hojas por árbol, de los 20 árboles evaluados con el método “T”; y una muestra compuesta de adultos de DC.

La cuantificación de CLas en planta y vector se obtuvo mediante la técnica PCR tiempo real. Inicialmente se realizó el aislamiento del ADN de tejido vegetal, con el método CTAB 2% (Doyle y Doyle, 1987) con buffer salino, para 100 mg de tejido vegetal. Para insectos, el ADN se extrajo con el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA). La detección y cuantificación se realizó en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems ®), con los primers HLBas (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBr (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), y sonda (5'- AGA CGG GTG AGT AAC GCG-3') (Li *et al.*, 2006). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95 °C por 3min, 40 ciclos de 95°C por 5 s; 59 °C por 40s y 59 °C por 35s.

Para la cuantificación del número de copias genómicas de CLas en las muestras, se generó una curva de calibración externa. Se utilizó el fragmento del gen 16S rDNA clonado en un plásmido (PGEM-T ® Promega®). El cual se purificó y cuantificó por uv-espectrofotometría (Nanodrop 1000) y se realizaron diluciones seriales; éstas se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica base e=2.3132 para estimar la concentración de CLas (y) donde $y = 41.95 (-3.373) * \text{LN}(\text{Ct}) +$, la cual se expresa en número de copias del gen 16S ADNr. Con el propósito de evitar variabilidad por la cantidad de ADN entre muestras, y para que estas fueran comparables, se realizó una dilución a 20 ng/μL.

2.5. Análisis de datos

Se generó una matriz primaria de los valores promedio de cada variable por huerto. Con el propósito de determinar a nivel exploratorio, la comparación entre entidades federativas

con respecto a las variables de campo, se realizó un ANOVA y prueba de comparación de medias de dichas variables, por estado y municipio (Tukey, $P < 0.05$). Las variables nominales se convirtieron a rangos mediante análisis no paramétrico con el procedimiento PROC RANK de SAS. Se generaron modelos de regresión múltiple por municipio cítricola para examinar la influencia de las variables del sistema epidemiológico en la cronicidad del HLB como indicador de la intensidad epidémica de esta enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 1993; Freud and Littell, 2000).

Adicionalmente con la matriz primaria se realizó un análisis de componentes principales (ACP), de acuerdo con la metodología propuesta por Mora-Aguilera y Campbell (1997). Con esta metodología se busca reducir el número de variables a las más pertinentes, sin perder la capacidad explicatoria del conjunto de datos originales. Se eliminan variables con un peso relativamente alto de correlación (Hawkins y Fatti, 1984; Jolliffe, 2002). Inicialmente, se analizó la matriz de correlación del conjunto original de datos y la estructura de componentes principales (CPs), estimada con el procedimiento PROC PRINCOMP, para detectar el grado de colinearidad entre las variables. Mediante el ACP se determinó el número de CPs a seleccionar con el criterio de varianzas parciales altas ($\lambda \geq 0.7$, $\lambda = \text{eigenvalue}$) (Jolliffe, 2002) y el porcentaje acumulado de varianza total explicada por los CPs (70-90%). La selección preliminar de las variables asociadas a los CPs que se eligieron se hizo mediante el criterio de CPs mayores ($\lambda \geq 0.7$) y menores ($\lambda \leq 0.7$) analizando los eigenvectores de la matriz de correlación (Hawkins y Fatti, 1984). Las variables asociadas a CPs menores se eliminaron por correlacionarse con otras variables o por ser irrelevantes en la caracterización de la estructura de los datos. Posteriormente, se hizo la rotación de CPs mediante el procedimiento PROC FACTOR seleccionando las variables con pesos absolutos altos asociadas a los factores (Mora-Aguilera y Campbell, 1997). Todos los análisis se realizaron en SAS® 9.0 (SAS Institute, 1900).

Con el propósito de determinar el efecto de los factores integrados en la intensidad epidémica del HLB, por región cítricola, se generó un Índice Multivariado (IM) con los valores del análisis de factores obtenidos mediante el procedimiento PROC FACTOR de las variables que se seleccionaron a partir del análisis de CPs (Mora-Aguilera *et al.*, 2013), el cual se estimó con la siguientes ecuaciones:

$$IM = N_{cp} [(Factor1)(VpCp1) + \dots + (Factor - n)(VpCp - n)] \quad [E.9]$$

$$IndRel = 1/IndMulti \quad [E.10]$$

Donde: *IM*: Índice multivariado; *NCPs*: Número de componentes principales; *VpCp*: Varianza proporcional del componente principal *1, ...n.*; Factor 1, Factor 2, Factor *n*: es el vector asociado al Factor-*i*. *IndRel*: Índice multivariado relativo a las regiones evaluadas.

El *IndRel* se utilizó para realizar un ANOVA y prueba de comparación de medias, con Tukey ($P < 0.05$), por estado y municipio evaluado. El *IndRel* se empleó también para generar mapas interpolados por entidad federativa, mediante el software ArcGis® 9.2 (ESRI, 2003) por el método de proyección geoestadística inverso de la distancia (IDW). Para ello se emplearon puntos de referencia con fines de ajustar la proyección al total del área muestreada.

Finalmente, con el propósito de determinar el efecto del comportamiento temporal del HLB en la intensidad epidémica actual de esta enfermedad, se ajustaron datos de incidencia (porcentaje de municipios con presencia de la enfermedad por estado evaluado) y tiempos de detección (meses), mediante el modelo temporal Weibull ($y = 1 - (t/b)^c$), el cual se utilizó con el método no derivativo DUD de PROC NLIN de SAS 9.0; donde *y* representa la incidencia del HLB, *t* es el tiempo, *b* es un estimador del parámetro de tasa en su forma inversa y *c* es el parámetro de forma de la curva (Pennypacker *et al.*, 1980; Mora-Aguilera *et al.*, 1996). El estimador de los parámetros *b*, *c* y R^2 se utilizaron para determinar el ajuste de los modelos. Adicionalmente, se estimó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) con la expresión: $ABCPE = [\sum (y_i + y_{i+1})/2 dt_i] / n$, donde y_i e y_{i+1} son los valores de incidencia del HLB y dt_i son los tiempos de detección (Shaner y Finney, 1977).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de determinar los factores determinantes en la inductividad de la intensidad epidémica del HLB entre egiones citrícolas del Pacífico (PCO), la cual se representó con los estados de Colima y Michoacán; y Península de Yucatán (PEN), con los estados de Yucatán, Q. Roo y Campeche, se evaluaron 3940 árboles en 197 huertos comerciales de los cuales el 84% fue limón mexicano, el 9% limón persa y el 7% naranja dulce, en 23 municipios citrícolas de dichas regiones.

El HLB se encontró presente en 176 huertos del total evaluado, en Colima 35/35, con cronicidad promedio del 66% (± 16.7); en Michoacán 131/132, con cronicidad promedio del 33.8% (± 30.7); en Yucatán 6/15, con cronicidad promedio del 6.5% (± 18.4); en Campeche

3/9, con cronicidad promedio del 1% (± 2.3); y en Q. Roo 2/2, con cronicidad promedio del 25% (± 10.6); y (Cuadro 2).

3.1. Efectos unifactorial del sistema epidemiológico sobre la intensidad epidémica del HLB

A nivel univariado, la región del Pacífico fue significativamente mayor que la Península de Yucatán, en cuanto a cronicidad (49.9%, ± 31.8), especie citrícola (165.1, moda= 111.0), vigor de árboles (119.1, moda= 151.8), número de brotes (20.4, ± 6.4), número de plagas (126.9, moda= 91.3), concentración de CLas en planta (7.7, ± 6.9) y vector (7.7, ± 7.6), número de generaciones potenciales (NGP) (16.4, ± 3.4), índice de abundancia citrícola (IAC) (0.34, ± 0.18) e índice de traspatio (IT) (0.21, ± 0.10) ($P < 0.05$) (Cuadro 2). En las variables superficie, edad de plantación, tipo de riego y manejo agronómico no se encontraron diferencias significativas entre regiones. Los valores más altos en todas las variables se encontraron en Colima y Michoacán. Los valores más bajos corresponden a Campeche (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio de valores por variable evaluada en 191 huertos de 17 municipios de mayor importancia citrícola de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante febrero a abril de 2015. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$).

Variables	Pacífico		Península de Yucatán		
	Colima	Michoacán	Yucatán	Q. Roo	Campeche
^a Especie	111.0 a	109.6 a	13.4 b	13.0 b	15.3 b
Superficie	10.8 a	11.4 a	4.9 a	2.5 a	2.8 a
^a Edad	114.5 a	84.6 a	135.3 a	150.0 a	122.8 a
^a Manejo	114.6 a	113.4 a	83.4 a	70.5 a	93.2 a
^a Riego	120.4 a	85.2 a	146.1 a	62.5 a	105.4 a
Cronicidad	66.02 a	33.9 ab	7.8 b	25 b	0.29 b

(Continuación...)

^aVigor	148.2 a	89.8 ab	73.8 b	42.0 b	54.1 b
Brotos	23.8 a	19.5 ab	12.4 bc	7.4 c	5.8 c
^aPlaga	176.0 a	77.7 b	75.9 b	108.3 b	105.7 b
CLas planta	10.6 a	7.0 ab	0.88 b	1.10 b	0.07 b
CLas vector	10.5 a	6.9 ab	0.56 b	0.40 b	0.01 b
NGP	19.6 a	15.5 b	10.9 c	12.0 bc	11.4 c
IACi	0.34 a	0.33 a	0.24 ab	0.005 b	0.03 b
IT	0.35 a	0.17 b	0.13 c	0.08 c	0.09 c

^aVariables nominales convertidas a rangos con análisis no paramétrico mediante el procedimiento PROC RANK de SAS V9.0.

Cuadro 3. Coeficientes de correlación y niveles de significancia de 15 variables descriptivas estimadas en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante febrero a abril de 2015.

Variables	Sup	Edad	Riego	Manejo	Vigor	Plaga	Brotos	Cron-HLB	CLas-Planta	CLas-Vector	NGP	IAC	IT	ICC
Especie	0.2	-0.2	-0.2	0.1	0.3	0.1	0.6**	0.4	0.3	0.3	0.5**	0.4	0.3	0.4
Sup		-0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	-0.1	0.2	0.1
Edad			0.0	-0.1	-0.3	0.2	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	-0.1	0.0	0.1	-0.1
Riego				0.7**	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.2	0.0
Manejo					0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	-0.1	0.2	0.0
Vigor						0.4	0.4	0.3	0.2	0.1	0.3	0.1	0.3	0.2
Plaga							0.2	0.4	0.3	0.2	0.3	-0.1	0.4	0.0
Brotos								0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4
Cron-HLB									0.9**	0.8**	0.2	0.0	0.5**	0.1
CLas-Planta										0.9**	0.1	0.0	0.3	0.1
CLas-Vector											0.1	0.0	0.3	0.1
NGP												0.2	0.4	0.3
IAC													0.4	0.5**
IT														0.3

Coeficientes de correlación de Pearson de 191 huertos: $0.7 \leq r \leq 1.0$ representa correlación alta y $0.5 \leq r \leq 0.7$ correlación media entre las variables evaluadas. Nivel de significancia de la matriz de correlación de Pearson: * = $p < 0.05$ y ** = $p < 0.001$.

En los huertos de estudio la cronicidad del HLB se correlacionó con la concentración de CLas en planta y vector y con el IT (Cuadro 3). La concentración de CLas en planta se correlacionó con CLas en el vector. La especie citrícola se correlacionó con el número de brotes y NGP. El nivel de manejo agronómico se correlacionó con el tipo de riego. El IAC se correlacionó con el ICC. Todas las correlaciones tuvieron un efecto positivo entre variables (Cuadro 3).

Adicionalmente, los modelos de regresión múltiple de la cronicidad del HLB como variable dependiente, indicaron que las variables del sistema epidemiológico que mejor predicen son: concentración de CLas en planta y vector, vigor, edad y brotación. Los modelos se generaron por municipio para reducir la variabilidad interregional dependiente del municipio (Cuadro 4). En el caso de PEN, los municipios con presencia de la enfermedad se ajustaron únicamente a la concentración de CLas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Modelos de regresión múltiple de la cronicidad del HLB con las variables significativas del sistema epidemiológico, en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante febrero a abril de 2015.

Estado/ Municipio	Modelo	^a R ²	^b Pr>F	^c VIF	^d Cp
Región Pacífico					
Colima					
Tecomán	$y = 41.2 + 2.5_{CLasPlanta} + 0.1_{Vigor}$	0.94	0.01	1.3	12.8
Armería	$y = 72.1 + 1.4_{CLasPlanta} + 0.8_{CLasVector} - 0.1_{Edad}$	0.96	0.02	3.3	3.8
Michoacán					
Tepalcatepec	$y = -28.2 + 3.8_{CLasPlanta} + 0.94_{CLasVector} + 1.1_{Brotas}$	0.95	<0.05	4.7	4.9
Buena Vista	$y = 2.6 + 2.5_{CLasPlanta} + 1.5_{CLasVector} + 0.1_{Vigor}$	0.97	<0.05	11.4	1.1
Aguililla	$y = 6.3 + 5.6_{CLasPlanta}$	0.89	0.01	1.0	12.8
Parácuaro	$y = 1.8 + 4.3_{CLasPlanta}$	0.96	<0.001	1.1	2.8
G. Zamora	$y = -0.7 + 4.06_{CLasPlanta}$	0.97	0.0002	1.0	1.1
Apatzingán	$y = -2.8 + 3.4_{CLasPlanta} + 0.1_{Vigor} + 1.3_{CLasVector}$	0.88	<0.05	3.1	1.3
Múgica	$y = 17.6 + 3.1_{CLasPlanta} - 0.1_{Edad}$	0.89	<0.001	1.14	8.3
La Huacana	$y = 0.6 + 13.2_{CLasPlanta}$	0.84	<0.001	1.0	-1.5

Región Península de Yucatán					
Yucatán					
Tizimín	$y = -1.73 + 9.16_{CLasPlanta}$	0.96	0.05	1.0	4.3
Q. Roo					
O. P. Blanco	$y = 3.1 + 0.03_{CLasPlanta}$	0.99	<0.000 1	1.5	1.2
Campeche					
Campeche	$y = 0.05 + 25_{CLasVector}$	0.86	0.002	3.7	1.3

^aR²: Coeficiente de determinación. ^bPr>F: Significancia del modelo. ^cVIF: Factor de inflación de la varianza. ^dCp: Cp de Mallow.

La cronicidad del HLB está relacionada positivamente con la concentración de CLas en planta, lo cual previamente se sugirió a partir de un estudio parcelario (Flores-Sánchez *et al.*, 2015), con CLas en vector, brotación y vigor; adicionalmente, se correlacionó negativamente con la edad (Cuadro 4). Estas variables del hospedante indican que la cronicidad del HLB depende de la disponibilidad de tejido; sin embargo, varían por región citrícola. Esto sugiere que la visión parcelaria y unifactorial dificulta explicar el proceso epidémico del HLB en su forma integral, por lo que se requiere complementar con un enfoque regional multivariado (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a).

3.2. Análisis temporal del comportamiento del HLB

En cuanto al comportamiento temporal del HLB, considerando el municipio como la unidad espacial de incidencia regional, se encontró que en PCO, el HLB tuvo una dispersión más rápida y con mayor intensidad debido a que los parámetros de tasa de infección aparente ($1/b=0.07$), forma de la curva ($c=1.26$), incidencia final ($Yf=100$) y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad ($ABCPE=31.05$) fueron mayores a los encontrados en la región PEN ($1/b=0.02$; $c=1.45$; $Yf=52.3$; $ABCPE=14.4$) (Cuadro 5, Figura 1). Previamente, se demostró la aplicabilidad del modelo Weibull, por su flexibilidad para describir una epidemia temporal integrada a nivel regional (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). Adicionalmente, estos resultados corroboran la factibilidad de estimar un modelo temporal cuando el proceso de contagio y dispersión tiene fuerte influencia de

inóculo primario, condición válida para un patógeno en fase de incursión y establecimiento regional.

Cuadro 5. Parámetros del comportamiento temporal de la incidencia del HLB (porcentaje de municipios con HLB por estado evaluado) y tiempos de evaluación (meses) durante el periodo de 2010 a 2015, ajustados con el modelo Weibull ($1 - \text{Exp}^{-(t/b)^c}$). Análisis con datos de SENASICA, 2015.

Región/ Estado	Parámetros temporales						
	$1/b$	c	r^2	Pr>F	Y_0	Y_f	ABCPE
Región Pacífico							
Colima	0.09	1.41	0.99	<0.0001	10	100	35.3
Michoacán	0.05	1.11	0.92	<0.0001	20	100	26.8
Promedio	0.07	1.26	0.95	<0.0001	15	100	31.05
Península de Yucatán							
Yucatán	0.02	1.35	0.94	<0.0001	3.5	48.8	11.5
Q. Roo	0.02	0.20	0.84	<0.0001	37.5	62.5	24.6
Campeche	0.02	2.80	0.88	<0.0001	9.1	45.5	7.2
Promedio	0.02	1.45	0.88	<0.0001	16.6	52.3	14.4

$1/b$: Parámetro de tasa de infección aparente en forma inversa; c : Parámetro de forma de la curva; r^2 : Coeficiente de determinación; Pr>F: Significancia del modelo; Y_0 y Y_f : Incidencia inicial y final de municipios con HLB por estado; ABCPE: Parámetro de Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad.

Previamente, se mostró también que la forma epidémica a nivel regional (estatal) es de tipo monomolecular (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). Las curvas epidémicas del HLB en México, confirman esta tendencia en particular en donde la epidemia progresa principalmente a nivel parcelario en comparación con traspatios, en los cuales se observan asíntotas, posiblemente por contagio limitado por la ocurrencia de cítricos mezclados con otras especies frutícolas y arbóreas como fue el caso de Yucatán, Campeche y Quintana Roo.

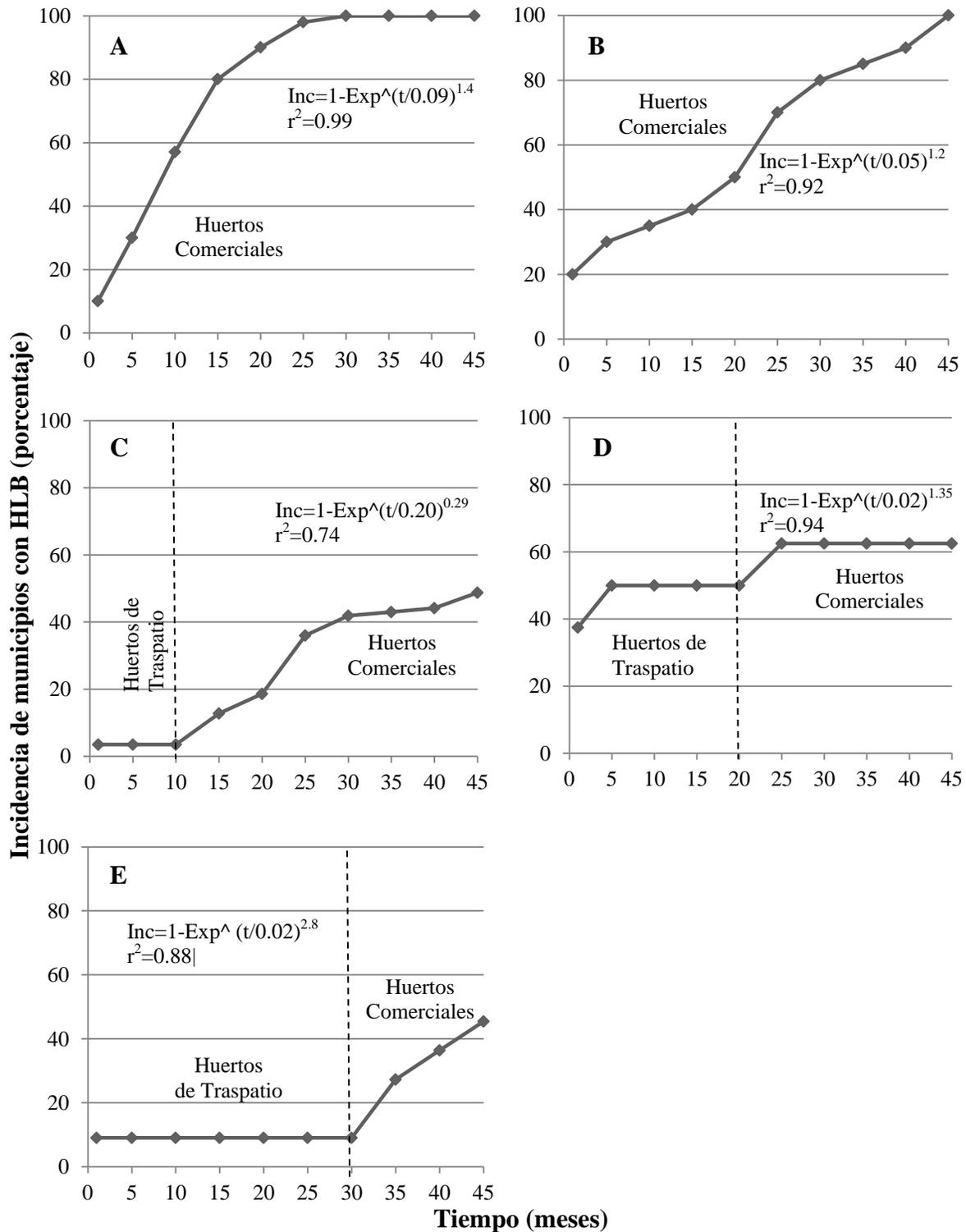


Figura 1. Gráficos temporales de la incidencia del HLB (porcentaje de municipios con HLB) en A) Colima, B) Michoacán, C) Yucatán, D) Q. Roo y E) Campeche, durante el periodo de 2010 a 2015. Las líneas y modelos representan el ajuste del modelo Weibull $(1 - \text{Exp}^{-(t/b)^c})$, donde b y c son parámetros. Análisis con datos de SENASICA, 2015.

3.3. Efecto multifactorial del sistema epidemiológico sobre la intensidad epidémica del HLB

A partir del análisis de componentes principales se seleccionaron cuatro componentes que explican el 90% de la varianza acumulada (36, 20, 17 y 16 %). Las variables asociadas a estos componentes fueron: edad de plantas, nivel de manejo agronómico de los huertos, concentración de CLas en planta, NGP y número de brotes, con distinto peso según el componente.

El índice multivariado (IM) se generó a partir de tres factores, los cuales explicaron el 90% de la varianza total. El IM fue significativamente mayor en la región PCO, en Colima fue IM=0.01 y en Michoacán IM=0.005, en comparación con PEN, en la cual Campeche y Yucatán tuvieron el menor con IM=0.0004 y Q. Roo IM=0.0007 ($P<0.0001$) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Índice multivariado obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables del hospedante, patógeno, vector y manejo evaluadas en 191 huertos de los 17 municipios de mayor importancia citrícola de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche durante febrero a abril de 2015. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey, $P<0.05$).

Estado	Municipio	Huertos ^a	Árboles ^b	IndMulti ^c
Colima	Tecomán	17	340	0.01 a
	Armería	18	360	0.009 ab
Michoacán	Aguililla	5	100	0.012 a
	Tepalcatepec	20	400	0.005 b
	Buenavista	27	540	0.004 b
	Apatzingán	30	600	0.01 a
	Parácuaro	13	260	0.003 bc
	Múgica	19	380	0.003 bc
	G. Zamora	6	120	0.001 c
	La Huacana	12	240	0.005 b
Yucatán	Tizimín	3	60	0.0003 d
	Dzan	3	60	0.0003 d
	Oxkutzcab	3	60	0.0008 e

(Continuación...)				
	Ticul	3	60	0.0002 d
	Kinchil	3	60	0.0003 d
Q. Roo	O. P. Blanco	2	40	0.0007 e
Campeche	Campeche	7	140	0.0004 d
	Escárcega	2	40	0.0004 d
Total	18	193	3860	1.14

^{a,b}Huertos-Árboles= Número de huertos y árboles evaluados por municipio citrícola; ^cÍndice Multivariado promedio por municipio, obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables. Los municipios faltantes no se consideraron en este análisis por tener un solo huerto evaluado.

A nivel de municipio, se clasificaron tres grupos con base en la intensidad epidémica representada por el IM (Cuadro 6): 1) Tecomán y Armería, Colima; Aguililla, Tepalcatepec, Buenavista y Apatzingán, Michoacán (IM promedio=0.008) (Figura 2 y 3); 2) Parácuaro, Múgica y Gabriel Zamora, Michoacán; Tizimín, Dzan y Oxkutzcab, Yucatán (IM promedio=0.001) (Figura 3 y 4); 3) O. P. Blanco, Q. Roo; La Huacana, Michoacán; Campeche, Carmen, Candelaria y Escárcega, Campeche; Espita, Muna, Ticul y Kinchil, Yucatán (IM promedio=0.0004) ($P<0.05$) (Figura 3 y 4).

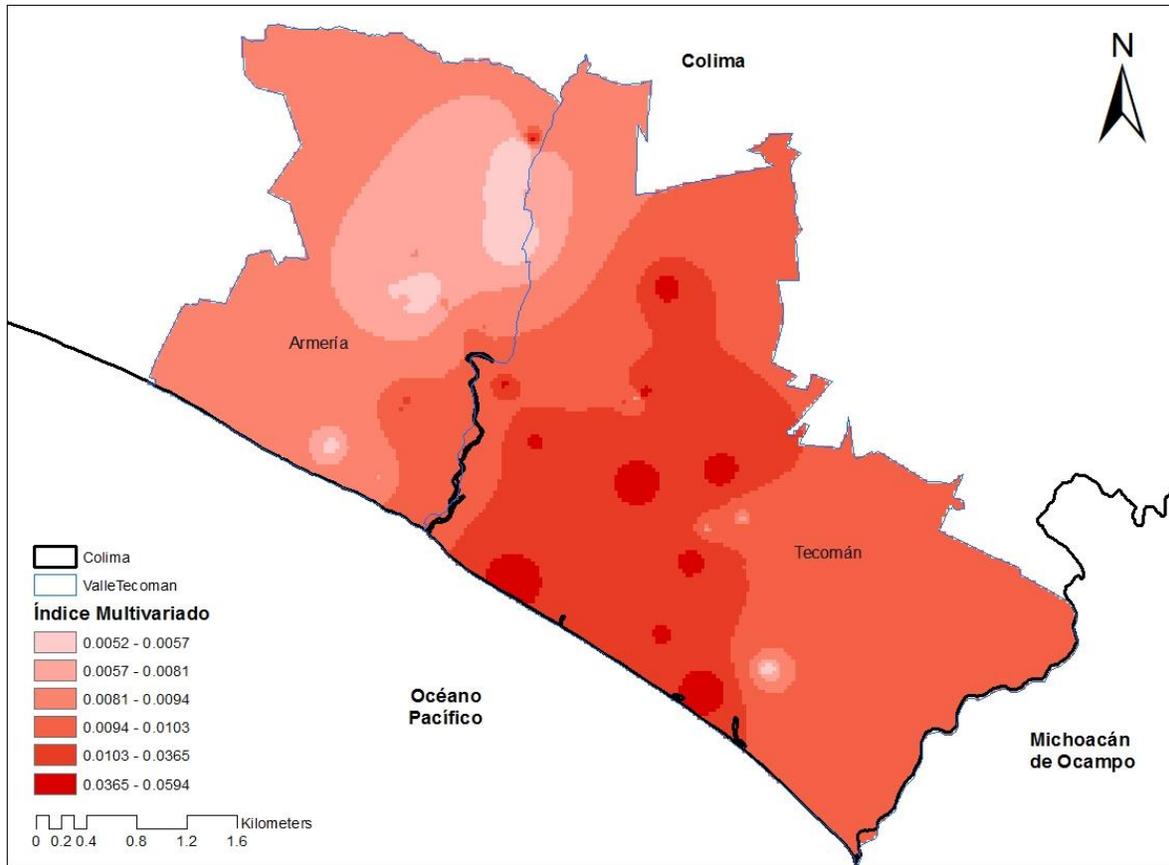


Figura 2. Regionalización de la intensidad epidémica del HLB con base en un índice multivariado obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables del hospedante, patógeno, vector y manejo, evaluada en 35 huertos de Tecomán y Armería, durante febrero a abril de 2015. La escala denota el índice multivariado. El color rojo intenso indica mayor nivel de inductividad e intensidad epidémica.

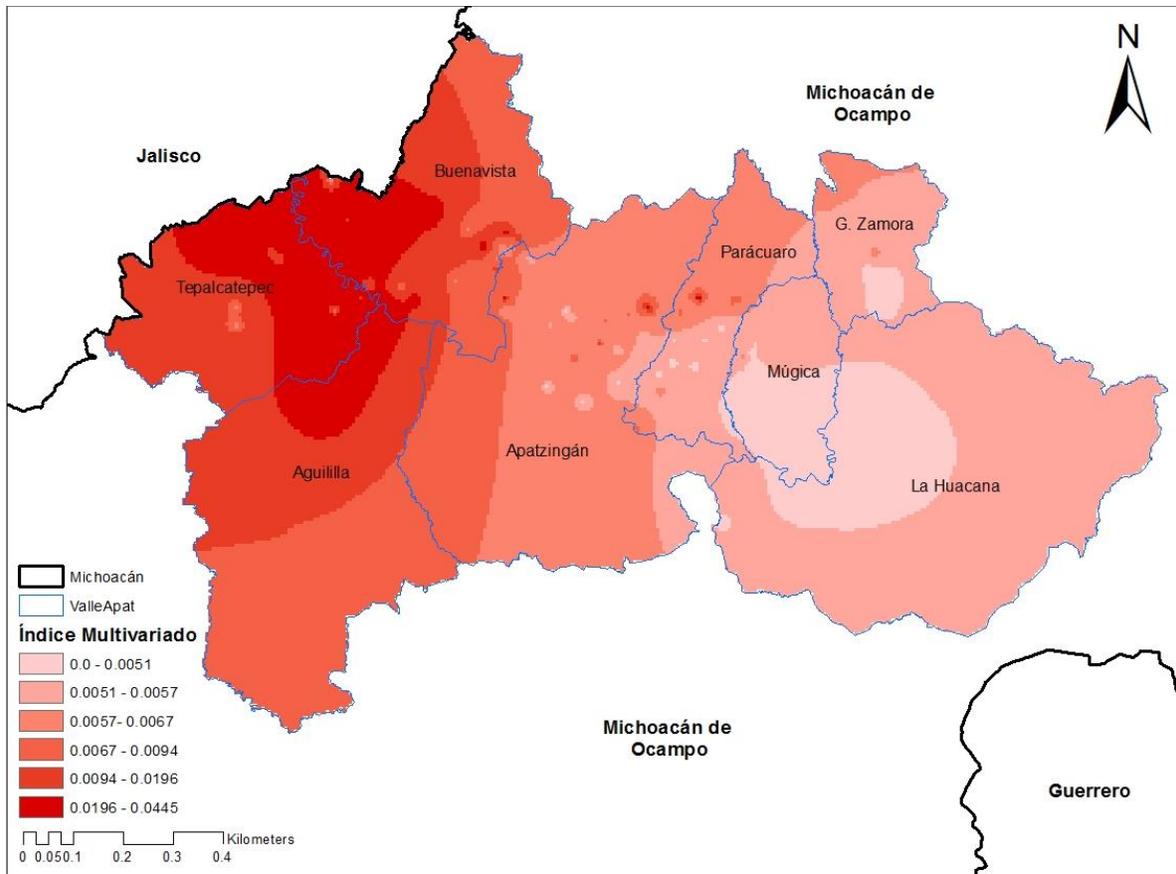


Figura 3. Regionalización de la intensidad epidémica del HLB con base en un índice multivariado obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables del hospedante, patógeno, vector y manejo, evaluada en 133 huertos de los municipios de mayor importancia citrícola del estado de Michoacán, durante febrero a abril de 2015. La escala denota el índice multivariado. El color rojo intenso indica mayor nivel de inductividad e intensidad epidémica.

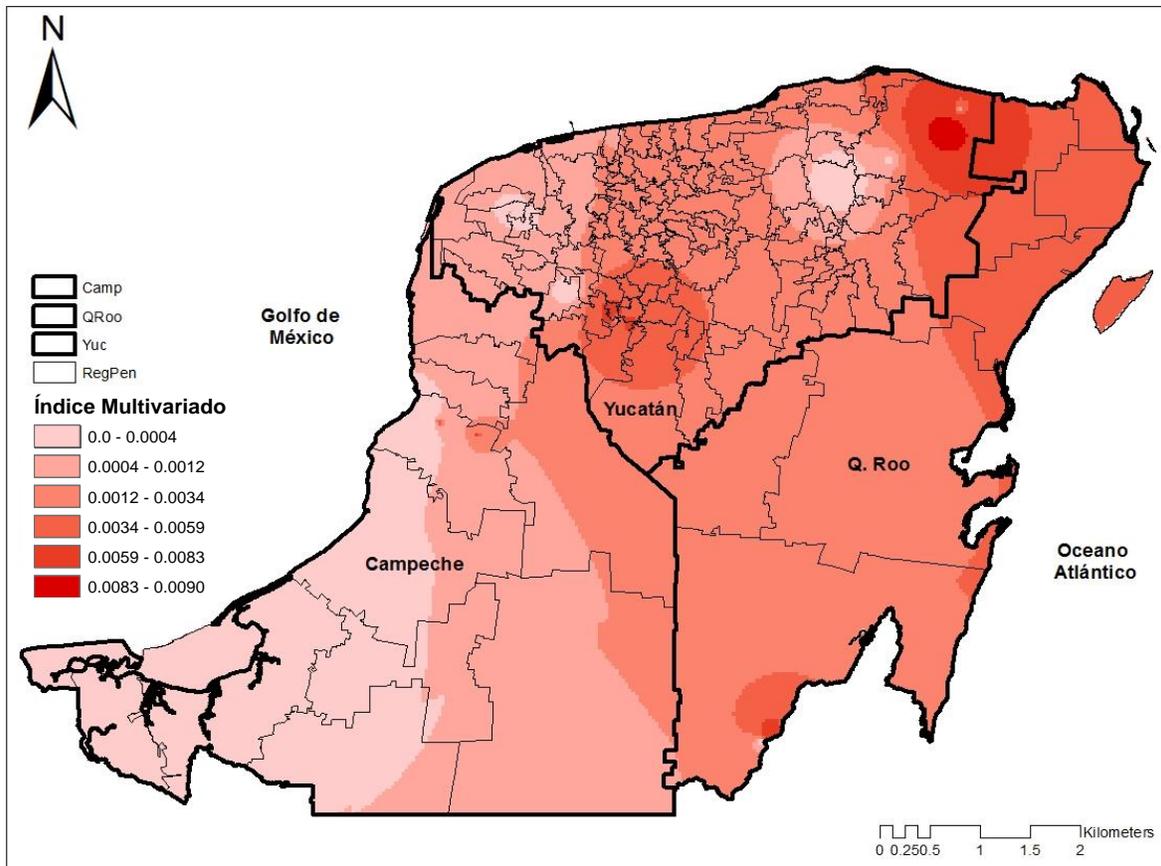


Figura 4. Regionalización de la intensidad epidémica del HLB con base en un índice multivariado obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables del hospedante, patógeno, vector y manejo, evaluada en 30 huertos de los municipios de mayor importancia cítrica de la Península de Yucatán, durante febrero a abril de 2015. La escala denota el índice multivariado. El color rojo intenso indica mayor nivel de inductividad e intensidad epidémica.

El enfoque regional consiste en maximizar la variabilidad de los subsistemas del sistema epidemiológico con el propósito de entender la inductividad epidémica bajo la premisa que existe una heterogeneidad inductiva a nivel regional que puede ser entendida a través del análisis del sistema epidemiológico. En el entendimiento de la intensidad regional del HLB se incluyó: especies cítricas, edad promedio de plantas, nivel de tecnificación de los huertos, densidad de plantación, entre otros; mientras que el enfoque parcelario mantiene los factores controlados, y solo permite que se exprese la variable de interés con el propósito de evidenciar su efecto de manera individual. Este último enfoque es restrictivo y a menudo los autores señalan que los resultados solo se aplican bajo las condiciones de estudio (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a).

En el control de plagas insectiles, Hendrichs *et al.* (2007) acuñaron el concepto de manejo integrado de plagas en áreas amplias (enfoque regional) e indicaron que este enfoque es mejor que el manejo integrado de plagas a nivel parcelario, debido a que reduce las poblaciones de insectos plagas durante mayor tiempo, reduce el uso de insecticidas por lo que tiene un menor efecto ambiental y también reduce los costos de aplicación.

En el caso del HLB, existen algunos estudios como el desarrollado por Bassanezi *et al.* (2013a) quienes demostraron que el control regional de *Diaphorina citri* (DC), permite reducir la incidencia de esta enfermedad hasta el 75%, requiere programas menos intensivos de control local del vector, y reduce los costos de manejo del HLB, porque las aplicaciones son menos intensivas y más eficientes.

Ambos planteamientos tienen como objetivo el insecto como plaga y vector, y se basan en que a mayor área bajo control mayor será el efecto de reducción en la población de insectos (Hendrichs *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2013a; Rogers *et al.*, 2011); en estudios epidemiológicos como el HLB, donde el objetivo debe ser la población de plantas, se requiere considerar otros factores asociados al hospedante, patógeno, insecto-vector y manejo agronómico para definir riesgos con una visión preventiva e integral (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b).

Un estudio regional epidemiológico se puede implementar en áreas de ausencia o baja prevalencia de un patógeno como una estrategia preventiva. Esto implica un nuevo paradigma en el estudio de los problemas fitosanitarios, con base en la prevención, y sustentable a diferencia del enfoque reactivo y de protección que se planteó durante décadas en la visión epidemiológica clásica (Vanderplank, 1963; Zadoks and Schein, 1979). Sin embargo, un enfoque regional puede ser aplicable para plagas ya establecidas y cuyo manejo racional sugiere que debe operar a una escala espacial amplia. Un ejemplo es la roya del café en México (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c).

Este enfoque multivariado permitió establecer que las diferencias entre la región del PCO y PEN se asocian principalmente al subsistema hospedante con las variables: especie citrícola, edad de plantas e IAC; al subsistema manejo con: tipo de riego y manejo agronómico; y al subsistema patógeno con: cronicidad del HLB, concentración de CLas en planta y vector. Las variables del hospedante tienen en común la disponibilidad de tejido para la colonización de DC y para potencializar la infección y dispersión de CLas. Estudios

previos han mostrado la importancia del efecto del hospedante (Hall *et al.*, 2013; Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Liu and Tsai, 2000; Pluke *et al.*, 2008). En este estudio se encontró que la disponibilidad de tejido y el NGP fue mayor en la región PCO (Cuadro 2), lo que coincide con lo reportado previamente en estudios del potencial de distribución de DC en México (Díaz-Padilla *et al.*, 2014; Torres-Pacheco *et al.*, 2013).

Diversos autores señalan que la brotación es el factor más importante para la abundancia de este vector con preferencia a frecuencia y calidad del brote (brotes pequeños u hojas tiernas recién expandidas) (Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Liu and Tsai, 2000; Pluke *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2007). En la región PCO el IAC fue mayor al de PEN, con presencia de las especies cítricas limón mexicano y limón persa; las cuales, además por sus características fenológicas presentan brotes vegetativos durante todo el año, lo que garantiza la disponibilidad de alimento y sitios de oviposición de DC. La combinación de un índice de abundancia cítrica y fenología apta para la colonización puede explicar las mayores poblaciones de DC (Tsai *et al.*, 2002; Liu and Tsai, 2000) y por lo tanto de NGP mas altos. Por lo que las poblaciones son mayores (Robles-González *et al.*, 2014; Miranda-Salcedo y López-Arrollo, 2011; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). En la región PEN la especie de mayor abundancia es naranja dulce, la cual tiene dos ventanas de brotación vegetativa de enero a marzo y julio a octubre (Torres-Pacheco *et al.*, 2013; Lozano-Contreras y Jasso-Argumedo, 2012; Domínguez-Monge, 2011; Flores-Sánchez, 2011), por lo que la disponibilidad de tejido para DC es menor. Adicionalmente, el IAC es en promedio 50% menor en PEN, lo cual reduce procesos de colonización.

Otros factores que tienen efecto sobre la densidad poblacional de DC, se relacionan con el manejo de la poda y edad de las plantaciones; la poda promueve la brotación (Robles-González *et al.*, 2014; Stuchi and Girardi, 2010; Davis and Albrigo, 1994) y favorece la abundancia del vector (Hall *et al.*, 2013; Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Torres-Pacheco *et al.*, 2013; Lozano-Contreras y Jasso-Argumedo, 2012; Miranda-Salcedo y López-Arrollo, 2011; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). Estos factores se consideraron en esta investigación mediante las variables del subsistema manejo, al considerar que el nivel de manejo agronómico alto y riego por microaspersión inducen mayor crecimiento y brotación vegetativa en las plantas.

En cuanto al subsistema patógeno las variables relacionadas fueron cronicidad del HLB y concentración de CLas en planta y vector, las cuales fueron mayores en la región PCO y en las especies ácidas limón mexicano y limón persa en comparación con naranja dulce. Esta información coincide con el reporte que señala que CLas induce síntomas foliares e histológicos de mayor intensidad en las especies ácidas (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Aparentemente, la baja carga de inóculo de CLas en la región PEN podría asociarse a la reducción de inóculo primario o erradicación de plantas enfermas, principalmente en huertos de traspatio (SENASICA, 2010) y a la amplia distancia entre las zonas citrícolas (SIAP, 2015), que en combinación con un IAC bajo puede afectar los procesos de reinfección y el potencial de dispersión de DC en comparación con la región PCO. En esta región la erradicación de plantas no fue posible debido a que el umbral económico se superó rápidamente (Belasque *et al.*, 2009; Robles-González *et al.*, 2013). Lo anterior se comprobó mediante el análisis del comportamiento temporal de esta enfermedad entre las regiones de estudio, en el cual se encontró que en PEN, CLas se dispersó con menor velocidad e intensidad, con una incidencia promedio actual de estados con presencia de CLas del 52%, en comparación con PCO, en donde esta enfermedad se dispersó con mayor velocidad e intensidad y en donde la incidencia promedio actual de estados es del 100% (Cuadro 5).

Bassanezi *et al.* (2013b) reportaron que para las condiciones de San Pablo, Brasil, la erradicación de plantas con HLB fue ineficiente en el progreso de la enfermedad a nivel parcelario, y explicaron que infecciones primarias tienen mayor impacto que infecciones secundarias, en parcelas experimentales con tamaño pequeño (0.8 a 2.9 ha) y forma estrecha, por la alta capacidad de dispersión del vector entre huertos; y a fuertes programas de control del vector en las parcelas.

Sin embargo, bajo las condiciones de la región PEN, en donde prevalece un proceso epidémico del HLB con menor intensidad debido a la baja carga de inóculo de CLas en planta y vector; a la baja disponibilidad de tejidos de colonización principalmente en naranja dulce, y menor NGP (Cuadro 2), es necesario mantener la eliminación de plantas enfermas por debajo de un umbral de endemidad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). El gobierno de México, inició desde 2009 un Protocolo de Actuación operado por los organismos auxiliares de sanidad vegetal (Salcedo-Baca *et al.*, 2012). Las acciones de

erradicación continúan al presente así como la liberación del parasitoide *Tamarixia radiata*. Adicionalmente, se ha demostrado la presencia natural de entomopatógenos (Cortez-Madrigal *et al.*, 2014). Todo esto puede explicar que a pesar de ser el punto de ingreso de CLas a México, la región no ha sido vulnerada productivamente. Mientras que en la región del PCO, la condición de endemicidad y cronicidad actual y con base en los estudios complementarios a este, se considera que la erradicación es una opción inviable, y que con acciones de manejo integrado del cultivo existe la posibilidad de mantener la sustentabilidad y rentabilidad de la actividad citrícola. Actualmente, la opción de manejo son las Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs), la cual es una estrategia del gobierno Mexicano que se basa en que el control regional de DC con base en los estudios de manejo regional vs control local de San Pablo, Brasil (Bassanezi *et al.*, 2013) y en las CHMAs de Florida (Rogers *et al.*, 2011). Las ARCOs en México se desarrollaron bajo fundamentos epidemiológicos de riesgo y potencial de disepersión (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b) y consisten en el manejo del HLB mediante el control regional de DC mediante ingredientes químicos y agentes de control biológico (SENASICA, 2012).

4. CONCLUSIONES

La presente investigación constituye el primer reporte sobre la aplicación del enfoque regional para determinar los factores involucrados en la caracterización de la intensidad epidémica del HLB, enfermedad inducida por CLAs. El presente estudio comparó y parametrizó las dos regiones citrícolas donde el HLB muestra una condición epidémica activa. Considerando que CLAs es de reciente ingreso al país (2009) y se encuentra en fase de establecimiento, esta enfermedad no podría entenderse y explicarse con estudios parcelarios debido a que se requeriría una condición endémica, lo cual no permitiría establecer acciones preventivas.

El HLB se encontró presente en 176 huertos del total evaluado, en Colima 35, con cronicidad promedio del 66% (± 16.7); en Michoacán 131, con cronicidad promedio del 33.8% (± 30.7); en Yucatán 6, con cronicidad promedio del 6.5% (± 18.4); en Campeche 3, con cronicidad promedio del 1% (± 2.3); y en Q. Roo 2, con cronicidad promedio del 25% (± 10.6). Lo cual demuestra que la región del Pacífico (PCO) es la más vulnerable.

La cronicidad de infección de CLAs se relacionó con la concentración de CLAs en planta y vector, especie citrícola, brotación, vigor, edad, superficie de huertos, los cuales varían por región citrícola. La integración multivariada permitió una mejor caracterización regional que el enfoque univariado.

La mayor intensidad epidémica estimada con un índice multivariado (IM) se observó en la región PCO, siendo mayor en Colima con $IM=0.01$. En comparación con PEN, Campeche y Yucatán tuvieron un $IM=0.0004$ y Q. Roo $IM=0.0007$. La inductividad en PCO se asoció principalmente, a cítricos agrios más susceptibles a CLAs, mayor IAC, y a la mayor concentración de CLAs en planta y vector.

La menor carga de inóculo de CLAs en la región PEN se asoció a la erradicación de plantas enfermas como parte del programa oficial (SENASICA-Protocolo de actuación), a la estrategia ARCOs y acción natural de agentes de control biológico, así como a la amplia distancia entre las zonas citrícolas. Estos aspectos pudieron reducir los procesos de reinfección y el potencial de dispersión de DC en comparación con la región PCO. Lo anterior se comprobó mediante el análisis del comportamiento temporal de esta enfermedad entre las regiones de estudio, en el cual se encontró que en PEN, el HLB se dispersó con menor velocidad e intensidad, con una incidencia regional promedio actual del 52%, en

comparación con PCO, en donde esta enfermedad se dispersó con mayor velocidad e intensidad y en donde la incidencia promedio actual es del 100%.

5. REFERENCIAS

1. Allen, J. C. 1976. A modified sine wave method for calculating degree days. *Environmental Entomology* 5: 388-396.
2. Aubert, B., Sabine, A., Geslin, P. and Picardi, L. 1984. Epidemiology of the greening disease in Reunion Island before and after the biological control of the African and Asian citrus psyllas. *Proc. Intern. Soc. Citricult.* 1: 440-442.
3. Bassanezi, R. B., Bergamin-Filho, A., Amorim, L. and Gottwald, T. R. 2006. Epidemiology of Huanglongbing in Sao Paulo. *Proc. Huanglongbing Green. Int. Workshop*, p. 37. Ribeirao Preto, Braz. Araraquara, Braz. Fundecitrus 8.
4. Bassanezi, R. B., Montesino. L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto. P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., Bergamin, Filho. A. 2013a. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796.
5. Bassanezi RB, Belasque Jr J, Montesino LH, 2013b. Frequency of symptomatic trees removal in small citrus blocks on citrus Huanglongbing epidemics. *Crop Protection* 52: 72-77.
6. Belasque, J. J., Filho, B. A., Bassanezi, B. R., Barbosa, J. C., Fernandes G. N., Yamamoto, T. P., Lopes, A. S., Machado, M. A., Pereira Leite, J. R. Ayres, J. A. & Massari, C. A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology* 34(3): 137-145.
7. Bové, J. M. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo State, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 94 (3): 465-467.
8. Bové, M. J. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*: 88, 7-37.
9. Cabrera-Hidalgo, A., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Rebollar-Alviter, A. y Marbán-Mendoza, N. 2014. Ocurrencia de *Nacobus aberrans* en Cultivos Hortícolas del Noroeste de Michoacán, México. *Nematropica* 44: 107-117.
10. Campbell, C. L. and Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York, USA, John Wiley & Sons Inc. 532 pp.

11. Comisión Nacional del Agua-Servicio Meteorológico Nacional (CONAGUA-SMN). 2015. Normales climatológicas por estación. Revisado en web el 10 de enero de 2016. http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75
12. Cortez-Madrigal, H., Sánchez-Saavedra, J. M., Díaz-Godínez, G. and Mora-Aguilera, G. 2014. Enzymatic Activity and Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi from Central and Southeastern Mexico to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Southwestern Entomologist* 39(3): 491-502.
13. Da Graca, J. V. 1991. Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology* 29: 109-136.
14. Davies, F. S. and Albrigo, L. G. 1994. Citrus. Wallingford: CAB International. 254p.
15. Díaz-Padilla, G., López-Arroyo, J. I., Sánchez-Cohen, I., Guajardo-Panes, R. A., Mora-Aguilera, G. y Quijano-Carranza, J. A. 2014. Áreas de abundancia potencial en México del vector de CLas, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(7): 1137-1153.
16. Domínguez-Monge, S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 63 p.
17. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
18. Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J.J., Manzanilla-Ramírez, M.A., Flores-Sánchez, J.L. y López-Arroyo, J.I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8):769-782.
19. ESRI, 2003. ArcGIS 9: Using ArcGIS Geostatistical Analyst. ESRI Press, Redlands, CA.
20. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., López-Arroyo, J. I. y Robles-García, P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.

21. Flores-Sánchez, J., Mora-Aguilera, G., Velázquez-Monreal, J. J., López-Arroyo, J. I., Loeza-Kuk, E., Hernández, R., Domínguez-Monge, S. y Acevedo-Sánchez, G. 2012. Caracterización epidemiológica del HLB en Colima con énfasis en el subsistema manejo. *In* Memorias del 3° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. p: 61-62. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.
22. Flores-Sánchez, J. L. 2011. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing de los cítricos (HLB), en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Edo. de México. 68 p.
23. Freud, R. J. and Lettel, R. C. 2000. SAS System for regression. Third edition. SAS. Institute, Cary, NC. 245 p.
24. Gottwald, T., Luo, W., Riley, T. and Parnell, S. 2014a. Commercial risk-based survey for HLB and implications for efficacy of Citrus Health Management Areas (CHMAs). *Journal of Citrus Pathology* 1: 110-11.
25. Gottwald, T., Luo, W., Riley, T. and Parnell, S. 2014b. Edge effect and Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology* 1: 126-127.
26. Gottwald, T. R. 2010. Current epidemiological understanding of Citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48:119-139.
27. Gottwald, T. R., Bergamin-Filho, A., Bassanezi, R. B., Amorim, L. and Irey, M. 2006. Concepts in Huanglongbing epidemiology. *Proc. Intl. Workshop Prev. Citrus Green. Dis. Sev. Infect. Areas*, pp. 1–10. Tokyo: Int. Res. Div., Agric. For. Fish. Res. Council. Sec., Minist. Agric., For. Fish.
28. Gottwald, T. R., Aubert, B. and Zhao, X. Y. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79: 687–93.
29. Hall DG, Richardson ML, Ammar E-D and Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus Huanglongbing disease. *Entomol. Exp. App.* 146: 207–223.
30. Hawkins, D. M., and L. P. Fatti. 1984. Exploring multivariate data using the minor principal components. *Statistician* 33: 325-338.

31. Hendrichs, J., Kenmore, P., Robinson, A. S. and Vreysen, M. J. B. 2007. Area-wide integrate pest management (AW-IPM): Principles, Practice and Prospects. Pp: 3-33 *In* Vreysen, M. J. B., Robinson, A. S. and Hendrichs, J. (eds.). Area-wide control of insects pest. Springer. Vienna, Austria.
32. Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative Real-Time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*. 66: 104-115.
33. Liu, Y. H. and Tsai, J. H. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Annals of Applied Biology* 137:201-206.
34. Lozano-Contreras, M. G. y Jasso-Argumedo, J. 2012. Identificación de enemigos naturales de *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) en el estado de Yucatán, México. *Fitosanidad* 16: 5-11.
35. Madden, L. V. 1983. Measuring and modelling crop losses at the field level. *Phytopathology* 73: 1591-1596.
36. Medina, U. M., Zapiaín, E. G., Robles, G. M. M., Pérez, Z. O., Orozco, S. M., Williams, T. and Becerra, S. R. 2007. Fenología, eficiencia productiva y calidad de fruta de cultivares de naranjo en el trópico seco de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30:133-143.
37. Miranda-Salcedo, M. A. y López-Arroyo, J. I. 2011. Avances de investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* KUWAYAMA en Michoacán, México. Pp: 149-155 *In* Memorias del 2º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. 9-11, Diciembre. Texcoco, Edo. de México.
38. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Flores-Sánchez, J., Hernández, R., González- Gómez R. and Robles-García P. 2014a. Regional Epidemiology: A new frontier and challenge in plant pathology. Pp: 6 *In*: 47º Congreso Brasileiro de Fitopatología. Del 17 al 22 de Agosto. Londrina, Paraná. Brasil.
39. Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López Arroyo, J. I., Velázquez Monreal, J., Flores-Sánchez, J., Acevedo –Sánchez, G., Domínguez-Monge, S. y González-Gómez,

- R. 2014b. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108-119.
40. Mora-Aguilera, G., Acevedo, G., Flores, J., Domínguez, S., Coria, J., Hernandez, A., González, R., López, A., Sánchez, H., Feria, J., Trujillo, J., López, E., Méndez, A., Matuz, J. and Martínez, M. 2014c. Epidemiological Surveillance System for Coffee Rust Disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: a Regional Approach. Pp: 42-47 *In: The 25th International Conference on Coffee Science*. September 8-14. Armenia, Colombia.
 41. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Flores-Sánchez, J., González-Gomez, R. and Robles-García, P. 2013. Applied epidemiology to plant disease risk analyses. Pp: 27-29 *In Proceedings IV Brazilian Workshop of Plant Disease Epidemiology*. Curitiba, Brasil. Dec. 2-4.
 42. Mora-Aguilera, G. and Campbell, C. L. 1997. Multivariate techniques for selection of epidemiological variables. Pp 51-58 *In L. Franci and D. A. Neher (eds.), Exercises in Plant Disease Epidemiology*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.
 43. Mora-Aguilera, G., Nieto-Angel, D., Cambell, C. L., Téliz, D., and García, E. 1996. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86: 70-78.
 44. Moa-Aguilera, G., Nieto-Angel, D., Téliz-Ortíz, D. and Campbell, C. L. 1993. Development of a prediction model for Papaya Ringspot in Veracruz, Mexico. *Plant Disease* 77: 1205-1211.
 45. Nava, D. E., Torres, M. L. G., Rodrigues, M. D. L., Bento, J. M. S. y Parra, J. R. P. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology* 131: 709-715.
 46. Ortega-Arenas, L. D., Villegas-Monter, A., Ramírez-Reyes, A. J. y Mendoza-García, E. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazonas, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana* 29(2): 317-333.
 47. Parnell, S., Gottwald, T. R., Gilks, W. R. and den Bosch, F. V. 2012. Estimating the incidence of an epidemic when it is first discovered and the design of early detection monitoring. *Journal of Theoretical Biology* 305: 30-36.
 48. Pennypacker, S. P., Knoble, H. D., Antle, C. E. and Madden, L. V. 1980. A flexible model for studying plant disease progression. *Phytopathology* 70: 232-235.

49. Pluke, R. W. H., Qureshi, J. A. and Stansly, P. A. 2008. Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. Florida Entomologist 91: 36-42.
50. Robles, G. P. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>.
51. Robles-González, M. M., Medina-Urrutia, V. M. y Manzanilla-Ramírez, M. A. 2014. Fenología y Poda. Pp: 135-154 In: El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A. y Bermúdez-Guzmán, M. (eds.). SAGARPA, INIFAP, CIRPAC. Colima, México.
52. Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal. J. J., Manzanilla-Ramírez. M. A., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia. V. M., López-Arroyo, J. I. y Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1): 15-31.
53. Rogers, M. E., Stansly, P. A. and Stelinski, L. L. 2011. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a Psyllid Management Plan. University of Florida, IFAS Extension, Gainesville, FL. 2 p.
54. Salcedo-Baca, D., Gonxález-Hernández, H., Rodríguez-Leyva, E., Vera-Villagrán, E., Múzquiz-Fragoso, C. y Hurtado-Arellano, A. 2012. Evaluación del impacto de la campaña contra el Huanglongbing (HLB) en 2008, 2009 y 2010. IICA, SAGARPA, SENASICA. 126 p.
55. SAS Institute, 2008. Guía de procedimientos SAS, Versión 9. SAS Institute, Cary, NC, USA.
56. SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe octubre, 2015. México, D. F. Revisado en web el 15 de marzo de 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
57. SENASICA. 2010. Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing. 2ª Edición. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad

- Agroalimentaria (SENASICA), México, D. F. 38 p. Revisado en web el 13 de marzo de 2016 <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>
58. SENASICA. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), México, D. F. 60 p. Revisado en web el 13 de marzo de 2016 <http://senasica.gob.mx/?doc=9364>
 59. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Cierre de la producción agrícola por estados. Revisado en web el 11 de diciembre de 2015. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
 60. Shaner, G. and Finney, R. E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056.
 61. Stuchi, E. S and Girardi, E.A. 2010. Use of horticultural practices in citriculture to survive Huanglongbing. *Documentos*, 189/Embrapa Cassava & Fruits, ISSN 1809-4996. 67 p.
 62. Tsai, H. T., Wang, J. J., AND Liu, Y. H. 2002. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in southern Florida. *Florida Entomologist* 85: 446-451.
 63. Torres-Pacheco, I., López-Arroyo, J. I., Aguirre-Gómez, J. A., Guevera-González, R. G., Yanez-López, R., Hernández-Zul, M. I. y Quijano-Carranza, J. A. 2013. Potential Distribution in Mexico of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of CLas pathogen. *Florida Entomologist* 96: 36-47.
 64. Van der Plank, J. E. 1963. *Plant Diseases. Epidemics and Control*. Academic Press, New York. 349 p.
 65. Velázquez-Monreal, J. J., Robles-González, M. R., Manzanilla-Ramírez, M. A., Orosco-Santos, M., Carrillo-Medrano, S. H. y López-Arroyo, J. I. 2012. Dinámica poblacional de *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) en cítricos ácidos en el estado de Colima. Pp: 116-125 *In* Memorias del 3° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.

66. Zadoks, J. C., and Schein, R. D. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. Oxford University Press, New York. 427 p.

CAPÍTULO III
IMPLICACION DEL MANEJO Y CRONICIDAD DE INFECCIÓN EN EL
IMPACTO PRODUCTIVO DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* EN LIMÓN
MEXICANO

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la importancia del manejo agronómico y cronicidad de infección en el impacto productivo de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle Christm.), con el fin de identificar prácticas tecnológicas de mitigación que propicien la sustentabilidad de la producción, en la zona citrícola del Pacífico en México, gravemente afectada por CLas, patógeno asociado al Huanglongbing (HLB). En 2014 y 2015 se seleccionaron 28 huertos con alta tecnificación (AT) y 28 con baja tecnificación (BT), en Colima y Michoacán. En cada huerto se determinó la cronicidad de infección de CLas, con base en el promedio de severidad del HLB en 100 árboles; de los cuales se seleccionaron 15, tres por clase de severidad (0=0, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100%), para determinar la relación de esta enfermedad en el impacto productivo. En cada árbol se pesó y contó el número de frutos con madurez de cosecha. En una muestra aleatoria de 20 frutos se midieron variables morfológicas y organolépticas. El impacto productivo inducido por CLas fue significativamente mayor en Colima que en Michoacán (8 vs 6.3 t/ha). En huertos con AT se obtuvo una diferencia de hasta 4 t/ha de fruta con respecto a BT (Tukey, $P<0.05$). Para ambas entidades, el nivel de tecnificación de los huertos aportó el 66% de la pérdida productiva mientras que la cronicidad de infección el 16%, $Perd=39.4 + (0.57)x_1 - (1.15)x_2$, $r^2=0.82$. El porcentaje de reducción de las variables morfológicas y organolépticas fue en el rango de 7 a 55% y también mayor en Colima (Tukey, $P<0.05$). Esta investigación demuestra que el impacto productivo de CLas está relacionado principalmente con el nivel de tecnificación de los huertos, por lo que con acciones de manejo integrado del cultivo existe la posibilidad de mantener la sustentabilidad y rentabilidad de la actividad citrícola.

1. INTRODUCCIÓN

El concepto de cronicidad de infección se usa frecuentemente en humanos y se refiere al estudio de enfermedades sistémicas con un establecimiento permanente, a las cuales se les da seguimiento temporal para evaluar el comportamiento patogénico del agente infeccioso y control de la misma, con el fin de mantener la calidad de vida de los pacientes. En este grupo de enfermedades se encuentran la hepatitis, diabetes, cáncer y problemas cardiovasculares (Ali *et al.*, 2010; Osougwu *et al.*, 2013; Kwon *et al.*, 2014). En el caso de enfermedades de plantas el concepto de cronicidad no se ha empleado probablemente porque la fenología de los cultivos, biología de los agentes infecciosos y prácticas agronómicas condicionan y limitan el seguimiento temporal por varios años de algunos de estos problemas fitopatológicos.

En este sentido, se puede definir que cronicidad es la asociación permanente y sistémica de un agente infeccioso con el hospedante causando una degeneración de la esperanza de vida del huésped en función de medidas de mitigación adoptadas. Por su naturaleza se aplicaría a cultivos perenes como los frutales y árboles forestales. En el caso de los cítricos es fundamental la aplicación de este concepto dado que la condición sistémica de varios agentes infecciosos como virus, viroides y fitoplasmas ha propiciado mecanismos de adaptación entre los cuales se puede citar la protección cruzada (Souza *et al.*, 2002; Van Vuuren *et al.*, 1993), efectos de supresión inter-específica (Van Vuuren *et al.*, 2000) o la selección natural de cepas moderadas (Rivas-Valencia *et al.*, 2010).

En el contexto de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), agente causal del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, con mayor distribución en el mundo, debido a su naturaleza sistémica y a la ausencia de germoplasma resistente, es de esperarse un proceso adaptativo infeccioso al hospedante que debe estudiarse desde una perspectiva epidemiológica con fines de manejo de la enfermedad. Entender el efecto de CLAs en los niveles de pérdidas permitiría estimar tiempos de vida útil de las plantas, p.e. umbral de rentabilidad; así como la comprensión de los efectos fisiológicos permitiría generar esquemas de mitigación integrales que incluyan el uso de altas densidades de plantación para compensar impacto productivo, manejo nutrimental y manejo hídrico.

En el caso de México, el HLB está presente desde 2009 y en el Pacífico Mexicano desde 2010 en estados como Nayarit, Jalisco, Colima y Michoacán (SENASICA, 2015); esta enfermedad se asocia a la bacteria de origen sistémico *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), se transmite por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (DC) (Alanis-Martínez *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2013) y presenta mayor severidad de síntomas fisiológicos e histológicos en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle Christm.) y limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka), en comparación con naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012), lo cual representa un escenario diferente al reportado en Brasil, Florida, California y otras partes del mundo (Bové, 2006; Bassanezi *et al.*, 2009, 2011).

A nivel regional, el progreso epidémico del HLB en México, presenta dos escenarios contrastantes: 1 Región del Pacífico, con mayor intensidad epidémica y con prevalencia en huertos comerciales de limón mexicano y limón persa, y 2) Península de Yucatán, con menor intensidad epidémica y con baja a moderada prevalencia en traspatios y con naranja dulce (Capítulo II; Mora-Aguilera *et al.*, 2014). En México, el 95% de la superficie sembrada con limón mexicano se encuentra en el Pacífico, en las entidades de Michoacán (55%), Colima (24%), Guerrero (8.2) y Oaxaca (7.8%) (SIAP, 2015), lo que constituye un alto riesgo económico-productivo.

El hecho que CLas no tenga métodos de control directo y que afecte a todas las especies de cítricos reduce las posibilidades de mejoramiento de variedades resistentes (Xu *et al.*, 2013). A pesar de esto, existen estudios, sobre materiales que presentan tolerancia o que prolongan la vida productiva de huertas cítricas (Stuchi *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2013) y sobre agentes inductores de resistencia sistémica adquirida que reducen la dispersión y contagio entre plantas (Bagio *et al.*, 2014). Estudios sobre el efecto de la nutrición también sugieren que pueden favorecer la producción a pesar de la infección crónica (Hernández-Chan *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2014; Gottwald *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011).

Las experiencias en Brasil, EUA, China, África y México, indican que el enfoque de control regional de DC representa la estrategia de mayor eficiencia en el manejo del HLB, ya que reduce la dispersión del inóculo secundario y minimiza los costos de aplicación, en complemento a la erradicación de fuentes de inóculo primario y al uso de material vegetal

certificado (Bassanezi *et al.*, 2013; Bové, 2006); sin embargo, la eliminación de árboles enfermos es una opción inviable en regiones cítricas con un escenario endémico del HLB (Belasque *et al.*, 2009; Fritz, 2011), es decir regiones con una distribución homogénea y crónica de la enfermedad.

Por lo anterior, se requiere una estrategia de manejo integrado del cultivo, la cual se base en la nutrición (Hernández-Chan *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2014; Gottwald *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011), manejo hídrico y del suelo (Campos-Herrera *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013), altas densidades de plantación (Stuchi y Girardi, 2010; Skaria y Hanagriff, 2008; Medina-Urrutia *et al.*, 2004), programas de renovación frecuente de plantaciones y de ciclo corto (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012), y el control regional de DC mediante productos químicos y biológicos (Orduño-Cruz *et al.*, 2015a, 2015b; Cortez-Madrigal *et al.*, 2014; Stansly *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2013; Sandoval-Reyes *et al.*, 2013; López-Arroyo *et al.*, 2012; Rogers *et al.*, 2011).

La importancia de CLas se demostró con estudios epidemiológicos de impactos productivos encontrándose pérdidas en rendimiento del 40 al 100% para naranja dulce (Bassanezi *et al.*, 2009, 2011), del 17% en limón persa (Flores-Sánchez *et al.*, 2015), y del 62% en limón mexicano (Robles-González *et al.*, 2013). Sin embargo, esos estudios no incluyeron al manejo agronómico, cronicidad de infección y regionalidad, o no fueron conducidos con metodologías epidemiológicas que permitieran manejar el efecto de la variabilidad de la severidad, por lo que la información que generaron se considera es restrictiva en un enfoque integral del problema. Otras investigaciones consideraron indicadores de costo-beneficio del manejo del HLB y concluyeron que la ganancia neta sería igual que la obtenida bajo un escenario de cero manejo de esta enfermedad, por el costo de insumos y su aplicación (Lopez and Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012); no obstante su análisis careció de un enfoque de campo con la evaluación de prácticas agronómicas empleadas para el manejo del HLB.

Estudios sobre el impacto potencial de CLas en México y otras países se realizaron con criterios principalmente socio-económicos (Singerman and Useche, 2015; Lopez and Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012) y eventualmente con criterios epidemiológicos (Salcedo *et al.*, 2010) permitiendo determinar, en este caso, mediante modelos de simulación los impactos a distintos escenarios de tiempo según la región y tipo de criterio.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar las implicaciones del manejo agronómico y la cronicidad de infección en el impacto productivo de CLAs, en limón mexicano del Pacífico Mexicano, con el fin de identificar prácticas tecnológicas de mitigación que propicien la sustentabilidad de la producción citrícola.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de los sitios de estudio

Este estudio se realizó en los Valles de Tecomán, Colima durante los meses de abril y mayo de 2014, y en Apatzingán, Michoacán, en 2015. Estos meses representan la época de cosecha más importante en limón mexicano (Robles-González *et al.*, 2014). En el caso de Michoacán se contó con el apoyo del Comité Estatal de Sanidad Vegetal tanto en recurso humano, el cual fue entrenado para este trabajo, como medios de transporte. La selección de los huertos fue a partir de un muestreo regional ponderativo (Reg-N; Capítulo II) de 166 huertos; 134 huertos de Michoacán y 32 huertos de Colima, el cual consideró los factores epidemiológicos de repetitividad, por medio de selección de huertos específicos, tales como: nivel de cronicidad regional de infección de CLAs, superficie (ha), edad de 6 a 10 años y nivel de tecnificación.

Con el fin de determinar la implicación del manejo agronómico en el impacto productivo de CLAs se aplicó, a los productores, una encuesta cuantitativa por huerto, en la que se evaluaron las siguientes categorías: aspectos generales de los huertos (AG), nivel general de nutrición (N), vigor de árboles (V), control de maleza (CM), control general de plagas y enfermedades (CPE), y tipo y frecuencia de riego (R); a partir de estos datos se estimó un factor de ponderación por inductividad al HLB (FPI), el cual fue la suma de los valores parciales por categoría:

$$FPI = \sum(AG, N, V, CM, CPE, R) \quad [1]$$

El nivel de tecnificación por huerto se obtuvo con la regla de decisión:

$$NT = si(FPI \leq \frac{FPI}{2}, "BT", "AT") \quad [2]$$

Donde: *NT*= Nivel de tecnificación de los huertos; *FPI*= Factor de ponderación por inductividad al HLB; *BT*= Baja tecnificación y *AT*= Alta tecnificación.

2.2. Evaluación de variables y cronicidad

Para estimar la cronicidad de infección de CLas, a partir del área de ingreso (mayor actividad humana y maquinaria) de cada huerto se seleccionaron 100 árboles, en un bloque de 10x10. Se midió la severidad con base en el porcentaje de copa con síntomas de HLB, mediante una escala nominal con clases 0=0, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100% (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). La cronicidad por huerto se estimó con el promedio de severidad de los 100 árboles. La premisa es que una infección sistémica sostenida por más tiempo se refleja en una mayor severidad de síntomas en dosel, concentración bacteriana y daños histológicos (Flores-Sánchez *et al.*, 2015, 2014; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Para estimar la producción total, en el bloque de 10x10 de cada huerto se seleccionaron 15 árboles, tres por clase de severidad. En cada árbol se cosechó, se contó y pesó el número de frutos totales con madurez de cosecha. Esto se realizó con personal experto contratado para homogeneizar criterios de cosecha. Adicionalmente, en una muestra aleatoria de 20 frutos por árbol se midieron las variables morfológicas: diámetro ecuatorial, diámetro polar, grosor de cáscara y volumen de jugo; adicionalmente, se midieron, las variables organolépticas: pH y grados brix (Bassanezi *et al.*, 2009; Flores-Sánchez *et al.*, 2015). El porcentaje de pérdida por variable se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$Perd(\%)i = 100 - (Pe * 100)/Pt \quad [3]$$

Donde: *Perd(%)i*: es el porcentaje de pérdida por variable-*i*; *Pe*: es la cuantificación de la producción-*P estimada-e* de cada variable en árboles enfermos; y *Pt*: es la cuantificación de *P* de árboles sanos, para cada variable morfológica y organoléptica.

Finalmente, con el propósito de tener una estimación por unidad de producción se transformó la pérdida en producción a toneladas por hectárea (t/ha), con base en la siguiente ecuación:

$$Perd (t/ha) = (Ptotal * N)/1000 * (Perd(\%)j)/100 \quad [4]$$

Donde: *Perd (t/ha)*: es la pérdida en toneladas por hectárea; *Ptotal*: es la producción de árboles sanos en kilogramos; *N*: es la población de plantas en una hectárea (ha) de acuerdo con una densidad de 400 plantas/ha; 1000: constante para convertir kilogramos (kg) a toneladas (t); *Perd(%)j*: es el porcentaje de pérdida por huerto; 100: constante. Debido a que en limón mexicano existe *n* cosechas al año la estimación es relativa y no representaría la estimación anual.

2.3. Diagnóstico y Cuantificación de CLas

Para cuantificar la concentración de CLas y determinar su relación con la cronicidad de infección y pérdida productiva, en cada árbol se colectó una muestra compuesta de ocho hojas, dos por punto cardinal del dosel. El análisis molecular consistió en el aislamiento de ADN con el método CTAB 2% (Doyle y Doyle, 1987) con buffer salino, para 100 mg de tejido vegetal. Posteriormente, las muestras se cuantificaron mediante un nanodrop espectrofotómetro y se estandarizó a 20 ng/μL con agua estéril libre de nucleasas. La detección y cuantificación se realizó por qPCR en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems ®), con los primers HLBas (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBr (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), y sonda (5'- AGA CGG GTG AGT AAC GCG-3') (Li *et al.*, 2006). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95 °C por 3min, 40 ciclos de 95°C por 5 s; 59 °C por 40s y 59 °C por 35s.

Para la cuantificación del número de copias genómicas de CLas en las muestras, se generó una curva de calibración externa. Se utilizó el fragmento del gen 16S rDNA clonado en un plásmido (PGEM-T ® Promega®). El cual se purificó y cuantificó por uv-espectrofotometría (Nanodrop 1000) y se realizaron diluciones seriales; éstas se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica para estimar la concentración de CLas (y) donde $y = (-3.373) * LN(Ct) + 41.95$, la cual se expresa en número de copias del gen 16S ADN_r. Con el propósito de evitar variabilidad en la concentración de ADN de las muestras y para que estas fueran comparables, se realizó una dilución a 20 ng/μL. El procedimiento descrito se tiene estandarizado en el laboratorio de FRUTI-MOL en Colegio de Postgraduados, lugar donde se procesaron las muestras.

2.4. Análisis de datos

El análisis estadístico fue parcelas divididas en donde la parcela grande fue el nivel de tecnificación de los huertos y la parcela chica el nivel de cronicidad de infección de CLas. Los datos de cada variable se analizaron con un ANOVA y prueba de comparación de medias (Tukey, $P < 0.05$); adicionalmente, los datos de producción obtenida, cronicidad de infección, y concentración de CLas se ajustaron mediante modelos de regresión lineal

simple $\hat{y} = a + bx$, donde \hat{y} representa la estimación del valor de producción, x el valor de cronicidad y a y b son los parámetros de ordenada al origen y tasa de incremento, respectivamente. La implicación del manejo y cronicidad se determinó mediante un análisis de regresión múltiple $\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + e_{ij}$, donde \hat{y} representa el estimador del porcentaje de pérdida en el rendimiento, β_0 = parámetro de ordenada al origen, β_i = parámetros que estiman el efecto del manejo y cronicidad, X_i = valores de manejo y cronicidad para cada huerto evaluado, e_{ij} = error; el ajuste de los modelos se realizó mediante el método Stepwise del procedimiento REG. Todos los análisis se realizaron en SAS® 9.0 (SAS Instituto, 2008).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar la implicación del manejo y cronicidad de infección en el impacto productivo de CLas en limón mexicano, se cosecharon 900 árboles (126 asintomáticos y 774 con diferentes niveles de severidad del Huanglongbing) en 56 huertos comerciales, 28 con alta tecnificación (AT) y 28 con baja tecnificación (BT) de los municipios citrícolas de mayor importancia de Colima y Michoacán (Cuadro 1).

No se observaron frutos con síntomas atribuibles al HLB a diferencia de lo reportado por Robles-González *et al.* (2013), a pesar de considerar un número alto de huertos y de frutos evaluados; esta condición de frutos asintomáticos también se reportó en limón persa en Yucatán (Flores-Sánchez *et al.*, 2015), lo cual sugiere que en el caso de cítricos agrios el HLB no induce los síntomas reportados en frutos de cítricos dulces (Bassanezi *et al.*, 2009; Gottwald *et al.*, 2007; Bové, 2006).

3.1. Diagnóstico y Cuantificación de CLas

En el presente estudio las 126 muestras colectadas de árboles asintomáticos resultaron molecularmente negativas a CLas, mientras que las 774 muestras de árboles con síntomas de HLB fueron positivas. A nivel regional, se encontró una relación directamente proporcional del incremento de la concentración de CLas (número de copias del gen 16S ADN_r de CLas x 1',000,000) en función de la cronicidad de infección (x), la cual para Colima fue $[CLas] = -0.31 + 0.036 x$, $r^2=0.66$ (Figura 1A); y para Michoacán fue $[CLas] = -0.62 + 0.038 x$, $r^2=0.79$ (Figura 1B).

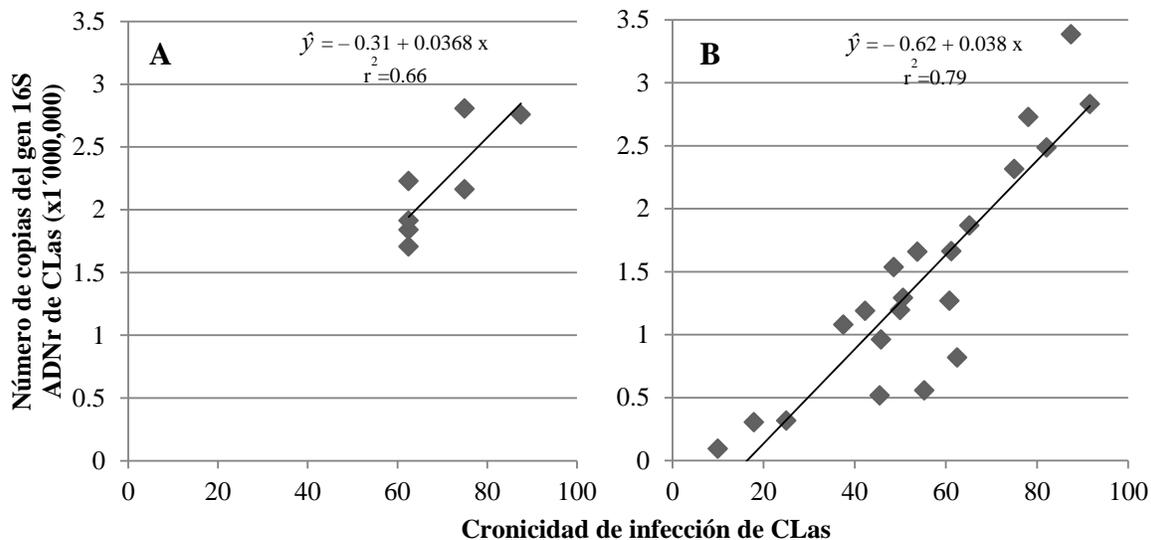


Figura 1. Relación entre la concentración de CLAs (número de copias del gen 16S ADNr de la bacteria x 1'000,000) y la cronicidad de infección de infección de CLAs (promedio de la severidad de 100 árboles por huerto) en 56 huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle Christm.) con BT de las zonas cítricas de los estados de Colima (A) y Michoacán (B), durante 2014 y 2015. La línea y modelo representan el ajuste por regresión lineal simple.

La severidad del HLB en planta mostró el mismo comportamiento de incremento de la concentración de CLAs; para Colima la concentración en planta fue $[CLAs] = 0.008 + 0.032x$, $r^2=0.71$; y para Michoacán fue $[CLAs] = 0.004 + 0.030x$, $r^2=0.79$, donde $CLAs$ es la concentración de la bacteria y x es la severidad de la enfermedad (Figura 2A). Los resultados indicaron que la cantidad de CLAs es mayor en Colima con 1.67×10^6 (número de copias del gen 16S ADNr de CLAs) en comparación con Michoacán en donde fue de 1.07×10^6 (Tukey, $P < 0.05$) (Figura 2B).

En las dos entidades productoras de limón mexicano el incremento de la concentración de CLAs está directamente relacionado con el porcentaje de severidad del HLB en planta y con la cronicidad de infección por huerto, esto significa que árboles con alto porcentaje de síntomas en el dosel y huertos con elevado promedio de cronicidad, contienen mayor cantidad de la bacteria (Figura 1A), lo cual coincide con lo que se reportó, a nivel de plantas, para limón persa en Yucatán en donde se encontró esta misma relación ($r^2 = 0.91$) (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, se propone el uso de la cronicidad de infección de CLAs como indicador de la carga de inóculo regional y periodos de infección (Figura 2) en estudios epidemiológicos regionales para la definición de áreas de riesgo y

endemicidad del HLB (Mora-Aguilera *et al.*, 2014), ya que al ser una variable cualitativa evaluada directamente en campo, reduce los costos de las pruebas moleculares para la cuantificación de CLas y disminuye el tiempo para conocer el estatus epidemiológico *in situ*.

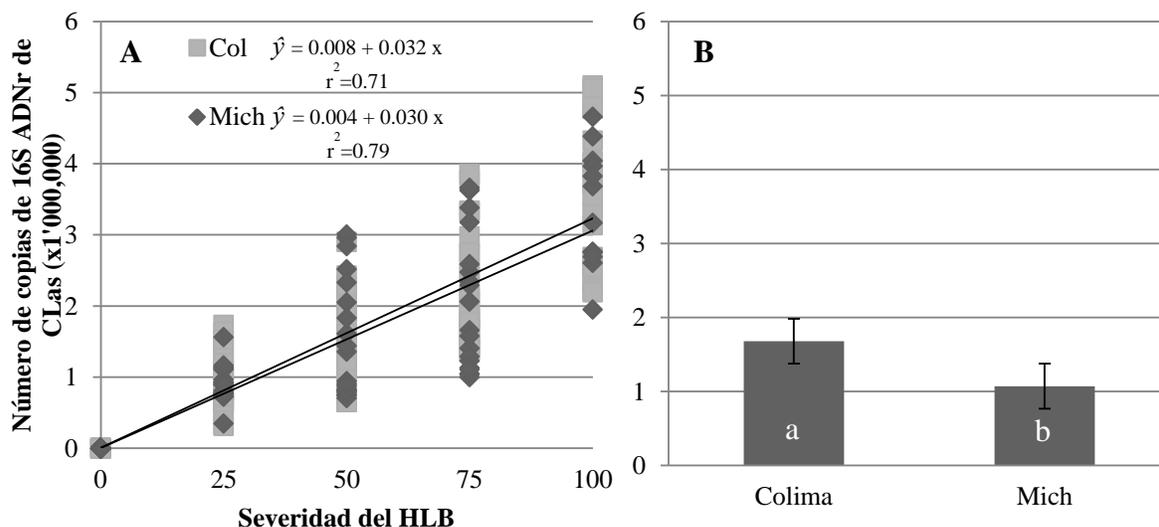


Figura 2. A) Relación entre la concentración de CLas (número de copias del gen 16S ADNr de la bacteria x 1'000,000) y la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en 900 árboles cosechados de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle Christm.) y B) Comparación de medias de la concentración de CLas en Colima (2014) y Michoacán (2015). Las líneas y modelos representan el ajuste por regresión lineal simple. Barras con al menos una letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey, $P < 0.05$). Las líneas en las barras representan el error estándar.

3.2. Implicación del manejo en el impacto productivo de CLas

La estimación del factor de ponderación por inductividad al HLB (FPI) permitió categorizar las condiciones de tecnificación de los huertos evaluados en: 1) baja tecnificación (BT), cuando los productores realizan prácticas agronómicas como riego rodado, bajo nivel de nutrición, ausencia de control de plagas y enfermedades, ausencia de podas de formación y saneamiento, y control ineficaz de *Diaphorina citri* (DC), el FPI varió de 7 a 30; y 2) alta tecnificación (AT), cuando se realizan prácticas agronómicas como: riego por microaspersión, alto nivel de nutrición, control de malezas, podas fitosanitarias, control de plagas y enfermedades, así como control sistemático de DC, con un FPI de 40 a 62.

El impacto productivo promedio en relación a la concentración de CLas en limón mexicano fue mayor en huertos con BT= 49.4% (4.9 t/ha) en comparación con huertos AT=7.8% (0.8 t/ha) (Tukey, $P<0.05$) (Figura 3A). Adicionalmente, se observó que en huertos con BT, la pérdida fue directamente proporcional a la cronicidad de infección (x) de CLas, la cual para Colima fue del 62.7% (7 t/ha) con $Perd= -3.99 + 0.96 x$, $r^2=0.79$; y para Michoacán del 36.7% (3.4 t/ha) con $Perd= -0.34 + 0.82 x$, $r^2=0.82$; mientras que en huertos con AT no se observó este efecto en Colima $Perd=15.4 - 0.09 x$, $r^2=0.02$; y tampoco para Michoacán $Perd=1.43 + 0.11 x$, $r^2=0.08$ (Figura 3B), lo cual era de esperarse dado que la pérdida fue menor al 10% (Cuadro 2).

La integración del efecto de la cronicidad de infección y el nivel tecnológico mediante un análisis de regresión múltiple demostró que para ambas entidades, la pérdida productiva depende en mayor medida del nivel de tecnificación de los huertos, al explicar el 66% de la varianza, mientras que la cronicidad de infección de CLas explicó solo el 16%. El modelo que mejor se ajustó fue $Perd=39.4 + (0.57)x_1 - (1.15)x_2$, $r^2=0.82$ ($P<0.05$), donde x_1 representa al valor de FPI y x_2 la cronicidad de infección de CLas.

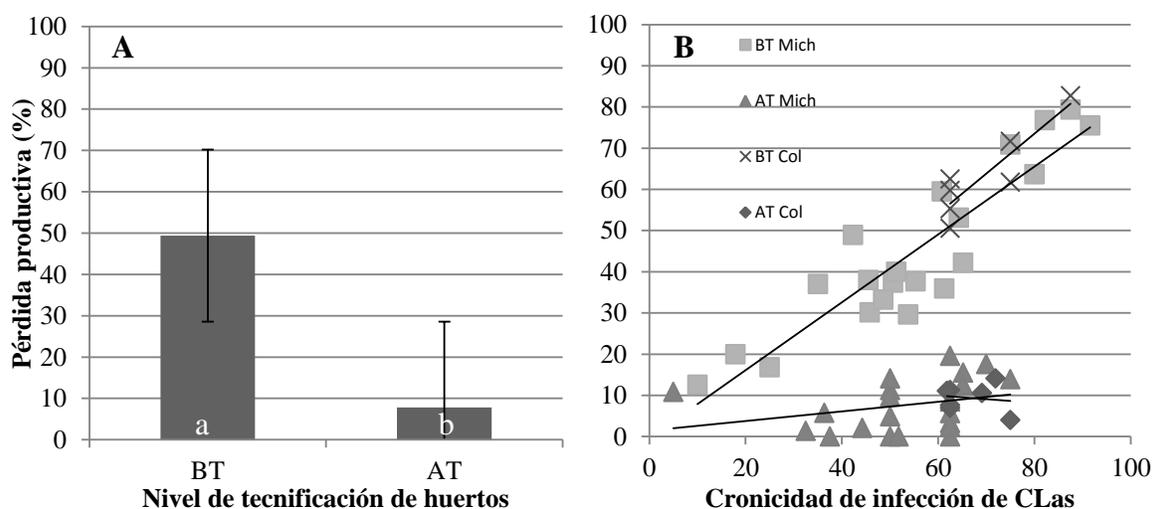


Figura 3. Promedio porcentual de pérdida productiva por: A) nivel de tecnificación de los 56 huertos y B) cronicidad de infección de CLas (promedio de la severidad de 100 árboles por huerto), en huertos con BT y AT de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle Christm.) de las zonas cítricas de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015. Barras con al menos una letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey, $P<0.05$). Las líneas en las barras representan el error estándar.

Símbolos diferentes indican diferentes estados y nivel de tecnificación de los huertos. Las líneas representan el ajuste por regresión lineal simple.

A nivel de planta, el impacto productivo promedio en relación a la severidad (x) del HLB, también tuvo un comportamiento similar que el descrito para [CLas]. Así, para Michoacán: $Prod = 15.8 \exp^{-0.013 x}$, $r^2=0.95$ (Figura 4A) y para Colima: $Prod = 17.3 \exp^{-0.05 x}$, $r^2=0.84$ (Figura 4B). Esto implica que árboles con 100% de síntomas de HLB en el dosel, la pérdida en el rendimiento es del 62.8% (6.3 t/ha) y 80% (8 t/ha) para Michoacán y Colima, respectivamente.

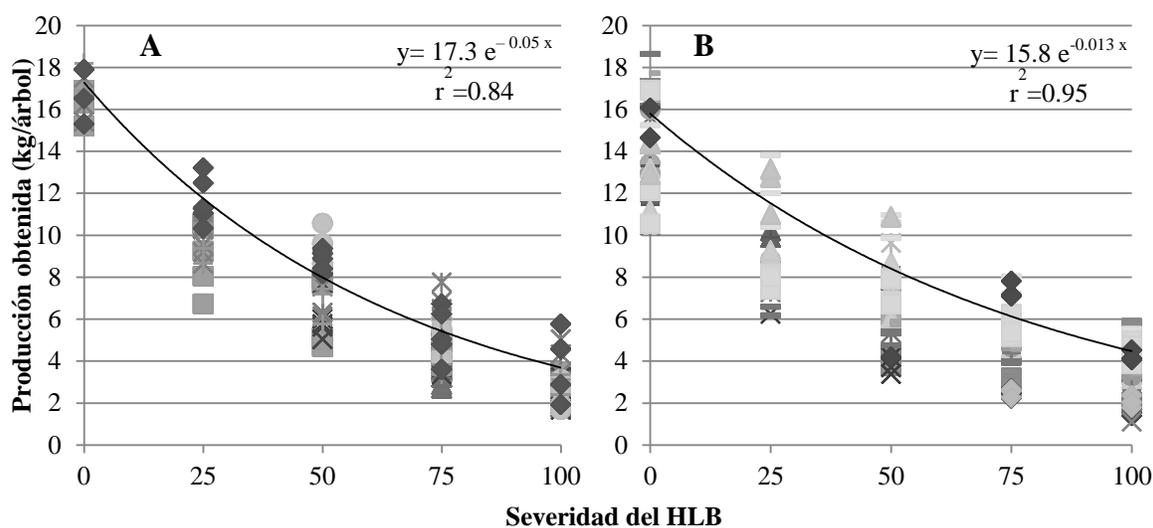


Figura 4. Relación entre la producción (kg) obtenida y la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en árboles de huertos con baja tecnificación (BT) en: Colima (A) y Michoacán (B), durante 2014 y 2015. Símbolos diferentes indican huertos diferentes. Las líneas y modelos representan el ajuste por regresión lineal simple por estado. Datos de huertos con AT no se ajustaron por no mostrar diferencias significativas.

3.3. Efecto de CLas en la calidad de fruta

Las variables morfológicas y organolépticas presentaron, solo en huertos con BT, una relación detrimental en función de la severidad del HLB ($r^2=0.62$ a 0.76). El porcentaje de reducción fue mayor en Colima en comparación con Michoacán con DP= 48% vs 25%, DE= 52% vs 22%, GC= 53% vs 37%, VJ= 55% vs 32%, Brix= 33% vs 27% y pH= +20% vs +7%, para el 100% de severidad (Tukey, $P<0.05$) (Cuadro 3); en todos los casos el efecto más alto se encontró en árboles con el 100% del dosel con síntomas de la enfermedad. Los frutos de

estas plantas presentaron menor tamaño, cantidad y calidad de jugo al ser más ácidos y con menor contenido de azúcares.

Cuadro 1. Porcentaje de reducción de variables morfológicas y organolépticas de frutos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) en relación a la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en árboles cosechados de huertos con baja tecnificación (BT) de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$).

Estado/ Severidad del HLB (%)	^a Variables Morfológicas				Variables Organolépticas	
	^b DP	DE	GC	VJ	Brix	pH
Colima						
0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
25	16 b	21 b	23 b	18 b	13 b	+6 b
50	24 c	27 c	42 c	29 c	20 c	+9 c
75	37 d	37 d	48 d	40 d	27 d	+11 d
100	48 e	52 e	53 e	55 e	33 e	+20 e
Promedio	25	27	33	28	19	+9
Michoacán						
0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
25	9 b	8 b	10 b	14 b	10 b	+2 b
50	16 c	15 c	24 c	21 c	19 c	+2 c
75	24 d	21 d	27 c	25 c	22 d	+3 d
100	25 d	22 d	37 d	32 d	27 e	+7 e
Promedio	15	13	20	18	15	+3

^aDP= Diámetro polar, DE=Diámetro ecuatorial, GC= Grosor de cáscara, VJ= Volumen de jugo, Brix= Grados brix y pH; ^b Porcentaje de reducción por variable evaluada, estimada con la proporción de los valores obtenidos por clase de severidad en relación a plantas sanas (severidad=0%).

Se comprobó que en limón mexicano existe un efecto de CLas en la calidad de la fruta, lo cual también se reportó para naranja dulce (Bassanezi *et al.*, 2009) y limón persa (Flores-

Sánchez *et al.*, 2015). El efecto más intenso se encontró en frutos de árboles con severidad del 100%, los cuales presentaron menor peso, tamaño, cantidad y calidad de jugo al ser más ácidos y reducirse el contenido azúcares, en comparación con frutos de árboles sanos; lo anterior es producto de la acumulación de foto-asimilados y almidón en los tejidos infectados con CLAs y por la baja translocación al fruto (Chin *et al.*, 2014; Folimonova y Achor, 2010; Kim *et al.*, 2009).

3.4. Efecto de la cronicidad regional de CLAs

CLAs tuvo mayor endemicidad y cronicidad en Colima con 68% (± 7.8), es decir, con intensidad epidémica alta y homogénea, en comparación con Michoacán, donde fue del 53.7% (± 18.8) y con endemicidad restringida a los municipios de Tepalcatepec (67.7%), Aguililla (65.2%) y Buenavista (57.8%); mientras que en Gabriel Zamora (43%) y La Huacana (7.5%) la cronicidad fue de baja intensidad y con presencia de focos de infección (Cuadro 1). Esto tuvo un efecto diferencial a nivel de parcela y municipio en función a la combinación de cronicidad y nivel tecnológico (Cuadro 2).

Huertos con BT de algunos municipios de Michoacán como Tepalcatepec con 59.6% (6.6 t/ha) y Buenavista con 45.9% (5.6 t/ha) mostraron pérdidas similares a las de los municipios de Colima: Armería con 66.9% (7.4 t/ha) y Tecomán con 58.4% (6.5 t/ha), Colima; mientras que La Huacana y Gabriel Zamora, Michoacán, mostraron las menores pérdidas entre 12.6 y 16.7% (0.7 a 0.8 t/ha, respectivamente) (Cuadro 2), lo cual se asocia al efecto de la cronicidad regional de CLAs.

Cuadro 2. Cronicidad de CLas y nivel de tecnificación y su asociación con las características de los huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) cosechados para medir el impacto productivo de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente.

No	Estado ^a	Municipio	Huerto	Sup. (ha)	Nivel de Tecnificación ^b	Edad (años)	Tipo de Riego ^c	Cronicidad ^d
1	Mich	Aguililla	Ag1	8	BT	10	Rodado	65.2
2			Ag2	38	AT	6	Micro	65.2
3			Ag3	24	AT	6	Micro	65.2
4		Apatzingán	Apat1	8	AT	10	Rodado	50
5			Apat2	10	AT	6	Micro	50
6			Apat3	8	AT	6	Rodado	50
7			Apat4	12	AT	6	Micro	50
8			Apat5	10	BT	6	Rodado	17.9
9			Apat6	8	BT	6	Rodado	35
10			Apat7	12	BT	10	Rodado	50.65
11			Apat8	20	BT	8	Rodado	53.75
12		Buenavista	Buen1	8	AT	6	Micro	62.5
13			Buen2	7	AT	6	Micro	37.5
14			Buen3	5	AT	10	Micro	44.23
15			Buen4	8	AT	6	Micro	70
16			Buen5	10	BT	10	Rodado	45.5
17			Buen6	7	BT	6	Rodado	82.14
18			Buen7	6	BT	8	Rodado	61.25
19		G. Zamora	GZ1	6	AT	6	Rodado	62.5
20			GZ2	8	BT	8	Rodado	25
21		La Huacana	LH1	5	BT	6	Rodado	10
22			LH2	3	AT	6	Rodado	5
23		Mújica	Muj1	8	BT	6	Rodado	45.8
24			Muj2	14	BT	6	Rodado	64.3
25			Muj3	7	AT	8	Rodado	36.36
26			Muj4	5	AT	6	Rodado	62.65
27		Parácuaro	Par1	7	BT	10	Rodado	55.3

								(Continuación...)
28			Par2	10	BT	6	Rodado	60.8
29			Par3	3	BT	6	Rodado	48.6
30			Par4	7	AT	6	Rodado	32.5
31			Par5	8	AT	6	Rodado	62.5
32			Par6	20	AT	6	Micro	51.78
33		Tepalcatepec	Tep1	5	BT	6	Micro	51.3
34			Tep2	8	BT	6	Micro	42.3
35			Tep3	17	BT	8	Rodado	80
36			Tep4	5	BT	6	Micro	91.6
37			Tep5	22	BT	6	Micro	87.5
38			Tep6	8	BT	8	Micro	75
39			Tep7	28	AT	10	Rodado	62.5
40			Tep8	10	AT	10	Micro	75
41			Tep9	5	AT	6	Micro	62.5
42			Tep10	30	AT	6	Micro	50
43	Col	Armería	Arm1	2	BT	8	Rodado	75
44			Arm2	3	BT	8	Rodado	87.5
45			Arm3	3	BT	8	Micro	62.5
46			Arm4	12	AT	10	Micro	62.5
47			Arm5	30	AT	8	Micro	62.5
48			Arm6	40	AT	10	Micro	62.5
49		Tecomán	Tec1	30	BT	10	Micro	62.5
50			Tec2	30	BT	8	Rodado	62.5
51			Tec3	3	BT	6	Rodado	75
52			Tec4	10	BT	10	Micro	62.5
53			Tec5	15	AT	10	Micro	69.1
54			Tec6	10	AT	8	Micro	75
55			Tec7	8	AT	6	Micro	61.84
56			Tec8	10	AT	6	Micro	71.9
Total	2	10	56	613	2	7.3	2	57.3

^aMich: Michoacán; Col: Colima. ^bNivel de Tecnificación: BT: Baja tecnificación; AT: Alta tecnificación. ^cMicro: riego por microaspersión. ^dCronicidad de infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, estimada con el promedio de severidad de 100 árboles por huerto.

En la presente investigación se encontró mayor pérdida productiva en Colima que en Michoacán (Cuadro 2), lo cual se puede explicar por la mayor cronicidad de la infección en el primero, es decir, por el mayor tiempo de exposición de los árboles a una infección sistémica de CLas en comparación con Michoacán (Figura 1B). Los datos de plantas positivas a CLas en abril de 2010 para Colima y diciembre 2010 para Michoacán (SENASICA, 2015) tuvieron una proporción de 0.3/ha:0.07/ha. El muestreo regional de la cronicidad de infección de esta bacteria mostró una cronicidad promedio del 68% y 53.7% en Colima y Michoacán, respectivamente (Cuadro 1). Un estudio previo de pérdidas productivas para *C. latifolia* en México no consideró la cronicidad regional de CLas debido a que se realizó en el único huerto con presencia del HLB en Yucatán, con un periodo de infección de 15 meses (Flores-Sánchez *et al.*, 2015), considerado bajo para determinar el efecto de la cronicidad en comparación con el tiempo de infección de CLas en Colima y Michoacán, de 4 y 5 años, respectivamente al momento del presente estudio.

En enfermedades de humanos como la hepatitis, cáncer, diabetes el concepto de cronicidad es ampliamente usado e implica la presencia permanente de una infección durante la vida del individuo (Kwon *et al.*, 2014; Osougwu *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2010; Ben-Shlomo and Kuh, 2002).

La relación significativa entre la cronicidad de infección de CLas y la producción de limón mexicano requirió la depuración gráfica por outliers (2%) para obtener los mejores ajustes del modelo ($r^2 = 0.7$ a 0.84). La dificultad de establecer una relación cuantitativa entre el nivel de enfermedad y la producción en cítricos para HLB y CVC se reportó previamente (Bassanezi *et al.*, 2011; Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2012) y se debe principalmente a la alta variabilidad de la producción de árboles con el mismo nivel de enfermedad, lo que significa una variación temporal en el rendimiento y calidad de fruta a nivel de árbol (Ye *et al.*, 2008 a, b); por efectos de manejo agronómico y variabilidad varietal. Este trabajo, y el de Flores-Sánchez *et al.* (2015) intentó con éxito disminuir este tipo de variabilidad al aparear plantas sintomáticas y asintomáticas.

Cuadro 3. Pérdida productiva inducida por CLas, por municipio citrícola y por nivel de tecnificación de los huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle Christm.): baja tecnificación (BT) y alta tecnificación (AT), en los estados de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey, $P < 0.05$).

Estado/ Municipio	Nivel de tecnificación			
	BT ^a		AT	
	Porcentaje ^b	t/ha ^c	Porcentaje	t/ha
Colima				
Armería	66.9 a	7.4	8.6c	1.0
Tecomán	58.4b	6.5	10.1bc	1.1
Promedio	62.7	7.0	9.4	1.0
Michoacán				
Tepalcatepec	59.6 b	6.6	11.3 b	1.2
Buenavista	45.9 c	5.6	4.3 de	0.5
Parácuaro	42.7 c	4.6	3.2 e	0.3
Aguililla	42.2 c	3.8	14.0 a	1.2
Múgica	41.9 c	2.3	5.7 d	0.3
Apatzingán	32.2 d	2.9	5.9 d	0.5
Gabriel Zamora	16.7 e	0.8	3.3 e	0.2
La Huacana	12.6 e	0.7	10.8 b	0.6
Promedio	36.7	3.4	7.3	0.6

^aBT: Baja tecnificación, AT: Alta tecnificación; ^bPorcentaje de pérdida productiva estimada con la proporción de la producción obtenida en árboles con 100% de cronicidad en relación a árboles sanos; ^ct/ha: Pérdida productiva expresada en toneladas por hectárea estimada con la diferencia de la producción obtenida en una hectárea de árboles sanos menos la producción estimada en árboles con 100% de cronicidad.

El manejo agronómico condicionó el efecto de la cronicidad de infección de CLas en las pérdidas productivas inducidas en limón mexicano. Las prácticas agronómicas realizadas por los productores en huertos con AT compensan el efecto de CLas sobre la producción, sin inhibir su efecto, mientras que en huertos con BT la infección sistémica y crónica de

CLas induce que los efectos fisiológicos y anatómicos, que se han reportado, sean de mayor magnitud y tengan mayor impacto en la producción; tales como la reducción de la tasa fotosintética, menor producción de azúcares y foto-asimilados, acumulación de almidón, taponamiento de los tubos cribosos con proteínas PP1 y PP2 y calosa, e hipertrofia e hiperplasia sobre los tejidos vasculares de los árboles infectados (Flores-Sánchez *et al.*, 2014; Hernández-Chan *et al.*, 2014; Chin *et al.*, 2014; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Folimonova y Achor, 2010; Kim *et al.*, 2009).

Esta información coincide con otras investigaciones, las cuales indican que el manejo del HLB tiene un efecto positivo al reducir la pérdida productiva en naranja dulce en San Pablo, Brasil y California, E.U.A. No obstante, los costos de producción se incrementarían en tal medida que la ganancia neta sería igual que la obtenida bajo un escenario de cero manejo de esta enfermedad (Lopez y Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012). Sin embargo, estos estudios se basan en pronósticos a 20 años del costo-beneficio de estrategias nacionales de contención del HLB y carecen de un enfoque epidemiológico de campo y del análisis puntual de las prácticas agronómicas discutidas en este estudio.

Si bien, de manera individual las estrategias de manejo como la nutrición (Bassanezi *et al.*, 2014; Gottwald *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011), el manejo hídrico (Campos-Herrera *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013), el uso de altas densidades de plantación (Stuchi y Girardi, 2010; Skaria y Hanagriff, 2008; Medina-Urrutia *et al.*, 2004), programas de renovación frecuente de plantaciones y de ciclo corto (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012), y el control regional de DC (Bassanezi *et al.*, 2013; Stansly *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2011; Sandoval-Reyes *et al.*, 2013; López-Arroyo *et al.*, 2012), tienen un efecto reducido en el manejo del HLB, su complementación mediante el manejo integrado del cultivo como nuevo sistema productivo, permitiría la convivencia con la enfermedad aún en condiciones crónicas de infección de CLas, tal como se comprobó en el presente estudio. Sin embargo, son necesarios estudios tecnológicos específicos para optimizar la relación costo-beneficio.

4. CONCLUSIONES

El presente estudio constituye la primera investigación que estima cuantitativamente con un enfoque epidemiológico las pérdidas inducidas por CLas en limón mexicano. También es la primera evidencia de la implicación del manejo agronómico y la cronicidad de infección regional en el impacto productivo inducido por esta bacteria. Los resultados permiten postular que las regiones citrícolas bajo una condición crónica y endémica pueden mantener la sustentabilidad y rentabilidad productiva. Sin embargo, será necesario establecer el tiempo de reemplazo de huertos en función a la rentabilidad.

En esta investigación se propone el uso de la cronicidad de infección como estimador del tiempo de infección para patógenos sistémicos que afectan sostenidamente a cultivos perenes como frutales. El entendimiento de la cronicidad de un patógeno en función de la fisiología de la planta por efecto de manejo tecnológico, genética de la planta, coinfecciones con otros patógenos sistémicos es fundamental para coadyuvar al manejo fitosanitario y realizar estudios epidemiológicos sobre una base racional biológica comprensible.

La pérdida productiva fue mayor en Colima que en Michoacán, derivado de una mayor endemicidad y cronicidad. CLas también tuvo un efecto en la calidad de la fruta, lo cual también se ha reportado para naranja dulce y limón persa. El efecto más intenso se encontró en frutos de árboles con severidad del 100%.

Sobre el manejo agronómico se demostró que éste tiene mayor implicación en la pérdida productiva de limón mexicano por efecto de CLas que la cronicidad de infección, bajo una condición endémica, es decir, con presencia homogénea de la enfermedad en una región; por lo que las prácticas agronómicas realizadas por los productores en huertos con AT compensan el efecto de CLas sobre la producción, sin inhibir su efecto.

Si bien, de manera individual las estrategias de manejo como la nutrición, el manejo hídrico, el uso de altas densidades de plantación, programas de renovación frecuente de plantaciones y de ciclo corto, y el control regional de DC, tienen un efecto reducido en el manejo del HLB, su complementación mediante el manejo integrado del cultivo como nuevo sistema productivo, permitiría el manejo de esta enfermedad aún en condiciones crónicas de infección de CLas como el Pacífico Mexicano.

5. REFERENCIAS

1. Ahmad, K., Sijam, K., Hashim, H., Rosli, Z., and Abdu, A. 2011. Field assessment of calcium, copper and zinc ions on plant recovery and disease severity following infection of Huanglongbing (HLB) disease. *African Journal of Microbiology Research* 5(28): 4967-4979.
2. Alanis-Martínez, E. I., Cora-Valencia, E., López-Arroyo, J. I. y López-Buenfil, A. 2015. Identificación del número variable de secuencias repetidas en TANDEM (VNTRs) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33 (Suplemento): S197.
3. Ali, M. K., Narayan, V. K. M. and Tandom, N. 2010. Diabetes & coronary heart disease: Current perspectives. *Indian Journal of Medical Research* 132: 584-597.
4. Bagio, T. Z., Barreto, T. P., Canteri, M. G., Leite-Junior, R. P. 2014. Resistência sistêmica adquirida em citros para controle de Huanglongbing. *In: 47° Congresso Brasileiro de Fitopatología*. 62. Agosto. Londrina, Paraná. Brasil.
5. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H. and Stuchi, E. S. 2009. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 125: 565-572.
6. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Godoy, G. M. C., Filho, A. B., Amorin, L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in Sao Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130(4): 577-586.
7. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., Bergamin, Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796.
8. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Matos, D., Quaggio, J. A., Boaretto, R. M., and Bové, J. M. 2014. Three years of nutritional management on Huanglongbing epidemics and crop loss in sweet orange grove. *In: 47° Congresso Brasileiro de Fitopatología*. 494. Agosto de 2014. Londrina, Paraná. Brasil.
9. Belasque, J. J., Filho, B. A., Bassanezi, B. R., Barbosa, J. C., Fernandes G. N., Yamamoto, T. P., Lopes, A. S., Machado, M. A., Pereira Leite, J. R., Ayres, J. A., and Massari, C. A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e

- assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*. 34(3): 137-145.
10. Ben-Shlomo, Y. and Kuh, D. 2002. A life course approach to chronic disease epidemiology: conceptual models, empirical challenges and interdisciplinary perspectives. *International Journal of Epidemiology* 31: 285-293.
 11. Bové, M. J. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
 12. Campos-Herrera, R., El-Borai, F. E., Ebert, T. E., Schumann, A., and Duncan, L. D. 2014. Management to control citrus greening alters the soil food web and severity of a pest-disease complex. *Biological Control* 76: 41-51.
 13. Chin, E. L., Mishchuk, D. O., Breksa, A. P. and Slupsky, C. M. 2014. Metabolite signature of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection in two citrus varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 6585-6591.
 14. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
 15. Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Flores-Sánchez, J. L. y López-Arroyo, J. I. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782.
 16. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., López-Arroyo, J. I. y Robles-García, P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.
 17. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., Velázquez-Monreal, J. J. y Manzanilla-Ramírez, M. A. 2014. Impacto productivo y fisiológico inducido por *Candidatus liberibacter asiaticus* en limón mexicano a cuatro años de ingreso en Colima. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31 (Suplemento): S54.
 18. Folimonova, S. Y., and S. D. Achor. 2010. Early events of citrus greening (huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100: 9-49.

19. Fritz M. R. 2011. Defining the economic “tipping point” in the management of citrus greening: Follow the standard protocol or shift to an enhanced foliar nutritional program. *In*: 18th International Farm Management Congress. Pp: 159-165 Methven, Canterbury, New Zealand.
20. Gonçalves, F. P., Stuchi, E. S., Lourenço, S. A., Hau, B. and Amorim, L. 2012. Relationship between sweet orange yield and intensity of Citrus Variegated Chlorosis. *Plant pathology* 61: 641-647.
21. Gottwald, T. R., Graham, J. H., Ireby, M. S., McCollum, T. G., and Wood, B. W. 2012. Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection* 36: 73-82.
22. Gottwald, T. R., da Graça, J. V., and Bassanezi, R. B. 2007. Citrus huanglongbing: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, Online. doi:[10.1094/PHP-2007-0906-01-RV](https://doi.org/10.1094/PHP-2007-0906-01-RV).
23. Gottwald, T. R., Aubert, B. and Zhao, X. Z. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglungbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79:687-693.
24. Hall, D. G., Richardson, M. L., Ammar, E. D., and Halbert, S. E. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol. Exp. App.* 146: 207-223.
25. Hernández-Chan, E. C., Mora-Aguilera, G., Cano-Medrano, R., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J. I., Velázquez-Monreal, J. J., Flores-Sánchez, J. L. y Domínguez-Monge, S. 2014. Efecto Fisiológico y Nutricional del HLB en limón mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: (Suplemento) S97.
26. Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., and Wang, N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50–57.
27. Kwon, Y. C., Ray, R. B. and Ray, R. 2014. Hepatitis C virus infection: establishment of chronicity and liver disease progression. *Experimental and Clinical Sciences* 13: 977-996.

28. Li, W., Hartung, J. S., and Levy, L. 2006. Quantitative Real-Time PCR for Detection and Identification of Candidatus Liberibacter Species Associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104-115.
29. López-Arroyo, J. I., Díaz-Martínez, S., Torres-Acosta, R. I., Reyes-Rosas, M. A. y Loera-Gallardo, J. 2012. Nuevos registros de depredadores del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama, en el Noreste de México. P: 287 *In: Memorias del 3° Simposio nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing.* 9-11 Diciembre. Veracruz, México.
30. Lopez, J. A. and Durborow, S. L. 2014. Huanglongbing and the California citrus industry: A cost comparison of do nothing vs. do something management practices. *The Texas Journal of Agriculture and Natural Resources* 27: 51-68.
31. Manzanilla-Ramírez, M. A., Robles-Gonzalez, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Orozco-Santos, M. y Carrillo-Medrano, S. H. 2012. Experiencias y perspectivas del Huanglongbing en Limón Mexicano. Pp: 406-414 *In Memorias del 3° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing.* 9-11, Diciembre. Veracruz, México.
32. Medina-Urrutia, V. M., Becerra-Rodríguez, S. y Ordaz-Ordaz, E. 2004. Crecimiento y rendimiento del limón mexicano en altas densidades de plantación en el trópico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10: 43-49.
33. Miranda, S. H. G., Adami, A. C. O. and Bassanezi, R. B. 2012. Economic impacts of Huanlongbing disease in São Paulo State. Poster prepared for presentation at the International Association of Agricultural Economists (IAAE) Triennial Conference, Foz do Iguaçu, Brazil, August 18-24. Revisado en web el 10 de diciembre de 2015. http://iaae.confex.com/data/abstract/iaae/iaae28/Paper_17434_abstract_11032_0.pdf
34. Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., Gutiérrez-Espinosa, A. y Loeza-Kuk, E. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108-119.
35. Nguyen, V. H., Tran, M. H., Nguyen, T. B., Bui, N. L., and Nguyen, M. C. 2013. Results on attempts in management of HLB under small scale in Vietnam and initiation

- in screening for HLB tolerant from varieties/clones belonging to Rutaceae. Pp: 10-13
In: IRCHLB III Proceedings. February 4-8. Orlando, Florida.
36. Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., Alatorre-Rosas, R., González-Hernández, H. and Mora-Aguilera, G. 2015a. *In vivo* selection of entomopathogenic fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Biological Control 90: 1-5.
 37. Orduño-Cruz, N., Guzmán-Franco, A. W., Rodríguez-Leyva, E., Alatorre-Rosas, R., González-Hernández, H., Mora-Aguilera, G. and Rodríguez-Maciel, J. C. 2015b. *In vitro* selection of a fungal pathogen for use against *Diaphorina citri*. Biological Control 90: 6-15.
 38. Ozougwu, J. C., Obimba, K. C., Belonwu, C. D. and Unakalamba, C. B. 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. Journal of Physiology and Pathophysiology 4(4): 46-57.
 39. Robles-González, M. M., Medina-Urrutia, V. M. y Manzanilla-Ramírez, M. A. 2014. Fenología y Poda. Pp: 135-154 *In* Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A. y Bermúdez-Guzmán, M. (eds.). El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). SAGARPA, INIFAP, CIRPAC. Colima, México.
 40. Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal. J. J., Manzanilla-Ramírez. M. A., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia. V. M., López-Arroyo, J. I. y Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19: 15-31.
 41. Rogers, M.E., Stansly, P. A. and Stelinski, L. L. 2011. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a Psyllid Management Plan. University of Florida, IFAS Extension, Gainesville, FL. 2 p.
 42. Sandoval-Reyes, F., Arriaga-Gaona, M. L., Hernández-Limón, L., Hernández-Romero, I. Guzmán-González, F. I. 2013. Actividad biológica en campo del extracto etanólico de *Melia azedarach*, *Psidium guajava*, *Datura stramonium*, *Piper auritum* y *Azadirachta indica a juss* sobre la *Diaphorina citri*. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 9: 22-29.

43. SAS Institute, 2008. Guía de procedimientos SAS, Versión 9. SAS Institute, Cary, NC, USA.
44. SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe Julio, 2015. Revisado el 27 de julio 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
45. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Cierre de la producción agrícola por estados. Revisado el 11 de diciembre de 2015. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
46. Skaria, M. and Hanagriff, R. D. 2008. Micro-budded, High Density Citrus Planting: Is There an Opportunity for HLB Control and Financial Returns?. IRCHLB Proceedings. P 365-368.
47. Spann, T. M., Schumann A.W., Rouse B., Ebel B. 2011. Foliar nutrition for HLB. Citrus Industry. (June) Pp: 6-10.
48. Stansly, P. A., Arevalo, H. A., Qureshi, J. A., Jones, M. M., Hendricks, K., Roberts, P. D. and Roka, F. M. 2014. Vector control and foliar nutrition to maintain economic sustainability of bearing citrus in Florida groves affected by Huanglongbing. Pest Management Science 70: 415-426.
49. Stuchi, E. S., Reiff, E. T., Sempionato, O. R., Parolin, L. G., and Toledo, D. A. 2013. Evidence that 'flying dragon' trifoliate orange delays HLB symptom expression for four sweet orange cultivars, Tahiti lime and Okitsu mandarin. Pp: 10-18 *In*: IRCHLB III Proceedings. February 4-8. Orlando, Florida.
50. Stuchi, E. S and Girardi, E. A. 2010. Use of horticultural practices in citriculture to survive Huanglongbing. Documentos, 189/Embrapa Cassava & Fruits, ISSN 1809-4996. 67 p.
51. Xia, Y., Ouyang, G., Sequeira, R. A., Takeuchi, Y., Baez, I., and Chen, J. 2011. A review of Huanglongbing (Citrus Greening) management in citrus using nutritional approaches in China. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2010-1003-01-RV.
52. Xu, M., Liang, M., Chen, J., Xia, Y., Zheng, Z., Zhu, Q., and Deng, X. 2013. Preliminary research on soil conditioner mediated citrus Huanglongbing mitigation in the field in Guangdong, China. European Journal of Plant Pathology doi: 10.1007/s10658-013-0238-z.

53. Ye, X., Sakai, K., Sasao, A., and Asada, S. 2008a. Potential of airborne hyperspectral imagery to estimate fruit yield in citrus. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 90: 132-144.
54. Ye, X., Sakai, K., Asada, S., & Sasao, A. 2008b. Application of narrow-band TBVI in estimating fruit yield in citrus. *Biosystems Engineering* 99: 179-189.

CAPÍTULO IV
EPIDEMIOLOGÍA DEL HUANGLONGBING BAJO UNA CONDICIÓN
ASINTOMÁTICA EN PUEBLA Y VERACRUZ, MÉXICO

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB) es la enfermedad de los cítricos con mayor importancia y distribución en el mundo. En México se asocia a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) y su detección se realizó en Julio de 2009 en el estado de Yucatán. En junio 2010 se detectó en Veracruz y en agosto 2011 en Puebla a CLas en el insecto vector *Diaphorina citri* (DC). En este último estado, en septiembre 2013 se detectaron cinco muestras de naranja dulce positivas a CLas. Este fue el primer reporte en el mundo de la condición asintomática del HLB. Por lo anterior, se realizó un estudio epidemiológico para caracterizar la dispersión parcelaria y regional de CLas asintomático mediante muestreos a ambos niveles en Puebla y Veracruz con el fin de definir el riesgo de dispersión con base en distancias, direccionalidad y carga de inóculo. A nivel parcelario la carga de inóculo en planta fue baja y con mayor concentración durante el mes de junio. El HLB asintomático a nivel parcelario mantuvo una dispersión activa en focos de 7x8 árboles (2,352 m²). A nivel regional las distancias de dispersión oscilaron de 1 a 12 km, y con presencia de positivos en un área de 110 km de diámetro (3,927 km²). Los datos indican que la baja dispersión de CLas bajo la condición asintomática, en esta región, está asociada a una baja concentración de CLas en planta y vector con 8,846 y 285 (copias del gen 16S ADNr de CLas), respectivamente; en complemento de la baja población de DC (13.2 generaciones potenciales). Esta información tiene gran relevancia en un contexto de prevención de la dispersión regional, mediante el desarrollo de métodos de muestreo que permitan identificar y delimitar focos de dispersión para erradicar árboles asintomáticos y para el control regional de DC. Sin embargo, no explican holísticamente la problemática en la región de Puebla-Veracruz, por lo que se sugiere complementarse con estudios de variabilidad genética de la bacteria, vector y planta, estudios fisiológicos, edafológicos, entre otras líneas de investigación.

1. INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing (HLB), causado por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) se detectó en México, en julio 2009, en el estado de Yucatán. A partir de esa fecha se dispersó a la mayoría de los estados citrícolas del país con dos escenarios epidémicos: 1) en la región del Pacífico con mayor intensidad y prevalencia en huertos comerciales, y 2) en la Península de Yucatán con menor intensidad y prevalencia en traspatio (Mora-Aguilera *et al.*, 2014).

En junio 2010 se detectó en Veracruz y en agosto 2011 en Puebla a CLas en el insecto vector *Diaphorina citri* (DC). En este último estado, en septiembre 2013 se detectaron cinco muestras de naranja dulce positivas a CLas (SENASICA, 2015). Estos árboles no presentaban los síntomas característicos del HLB para las condiciones de México como son: aclaramiento de nervaduras, moteado difuso y amarillamiento tenue generalizado (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Esta condición prevalecía hasta diciembre 2015. Por lo que este constituye el primer reporte mundial del HLB asintomático en condiciones de campo.

La condición asintomática del HLB es normal durante el periodo de incubación de la bacteria. Los síntomas putativamente aparecen después de varios meses o años de la infección inicial (Aubert, 1987). Sin embargo, hojas jóvenes pueden ser fuente de inóculo de CLas 10 o 15 días después de la infección por DC (Lee *et al.*, 2015). Bassanezi *et al.* (2013a) reportaron una reducción visual, pero no su enmascaramiento total, de síntomas de HLB asociado al incremento de la temperatura y posible movilidad de CLas a la zona radicular.

La dispersión intra-parcelaria inicialmente con efecto de borde (Aubert, 1987; Gottwald *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2005; Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011), tasas temporales de dispersión parcelaria (Bassanezi *et al.*, 2005; Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011) y dispersión regional (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2011) se ha empleado para desarrollar protocolos oficiales de muestreo, monitoreo, delimitación y control de brotes, y en áreas regionales de control de DC por parte del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). Sin embargo, estos instrumentos se han generado bajo la

asunción de una condición sintomática visual. De confirmarse que la condición asintomática no es producto de un periodo de incubación prolongado se requerirán protocolos adecuados para esta nueva condición.

Con base en lo anterior, se requiere un estudio epidemiológico que permita entender el comportamiento del HLB asintomático; es decir conocer su distribución y dispersión regional y posibles causas, lo cual permita traducirse tanto en insumos operativos de programas oficiales como en la correcta aplicación de medidas de control como erradicación de fuentes de inóculo primario y control regional de DC mediante datos del potencial de dispersión. En este contexto este estudio se planteó con los siguientes objetivos:

1. Caracterizar la distribución regional de CLas asintomático mediante muestreos en los estados de Puebla y Veracruz para definir distancias, direccionalidad y carga de inóculo con el fin de diseñar estrategias para áreas de control de *Diaphorina citri* y para la eliminación de inóculo primario en planta.
2. Análizar la estructura de focos de infección de CLas-asintomático con base en un muestreo restrictivo a foco simple y múltiple para su aplicación en estrategias de muestreo y manejo regional y a nivel de huertos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Caracterización regional de CLas asintomático en planta y vector

2.1.1. Selección de los sitios de estudio

En agosto y noviembre 2014 se realizaron muestreos regionales para coleccionar muestras vegetales y de adultos de *Diaphorina citri* en la región de Puebla-Veracruz. La selección de los sitios de estudio consideró el número y distribución de positivos asintomáticos CLas detectados por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Puebla (CESAVEP), así como el uso de rutas de alta movilidad de fruta y personal requerido para la producción de cítricos en la región, principalmente limón persa (*Citrus latifolia*), naranja (*C. sinensis*), mandarina (*C. reticulata*) y toronjo (*C. paradisi*). La estimación del número de huertos a muestrear se realizó con base en la metodología transectual Trans-N (LANREF, 2014. No publicado), y a la dirección principal de los vientos, por su efecto en la dispersión de *D. citri* (Figura 1).

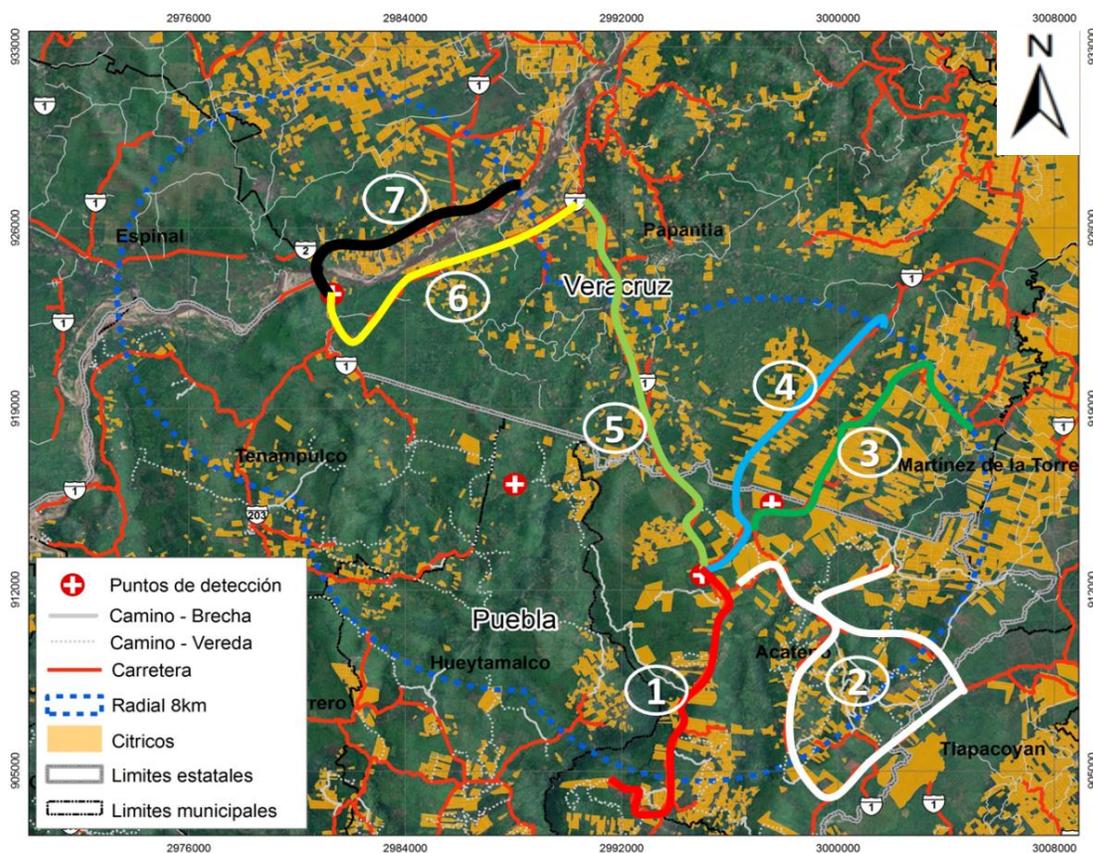


Figura 1. Mapa regional de la zona de muestreo de cítricos en Puebla y Veracruz con polígono citrícolas.

Para determinar el número de sitios de estudio por ruta transectual, se empleó la siguiente ecuación:

$$No. \text{ huertos} = Ind_Dist_i * N$$

Donde: N : Tamaño de muestra (sitios) operativamente factible evaluar. Ind_Dist : Índice de distancia relativo para cada huerto i en relación al total de distancia a recorrer. i = Huertos a evaluar en transecto j .

El desarrolló en MS-Excel para la ejecución de este algoritmo se ilustra en la Figura 2.

N		50				
Transecto	Distancia (km)	Ind_Dist	No. Sitios	Dist. Inicial (km)	Dist./sitios (km)	
T1	10.0	0.1	5	1.3	2.2	
T2	32.0	0.3	15	5.8	1.9	
T3	12.9	0.1	6	1.2	2.4	
T4	14.0	0.1	6	2.1	2.4	
T5	17.1	0.2	8	3.9	1.9	
T6	11.5	0.1	5	2.8	2.3	
T7	10.6	0.1	5	2.9	2.0	

Figura 2. Interface en MS-Excel para determinar número de huertos cítricos a muestrear por ruta transectual en la región Puebla-Veracruz (Acateno-Papantla, Martínez de la Torre, Tlapacoyan).

Adicionalmente, se empleó la herramienta Trans-N modalidad aleatoria para determinar la distancia entre sitios de estudio y distancia inicial del transecto (Figura 3), la cual emplea como parámetro el número de huertos ($No. \text{ huertos}$) y distancia por transecto.

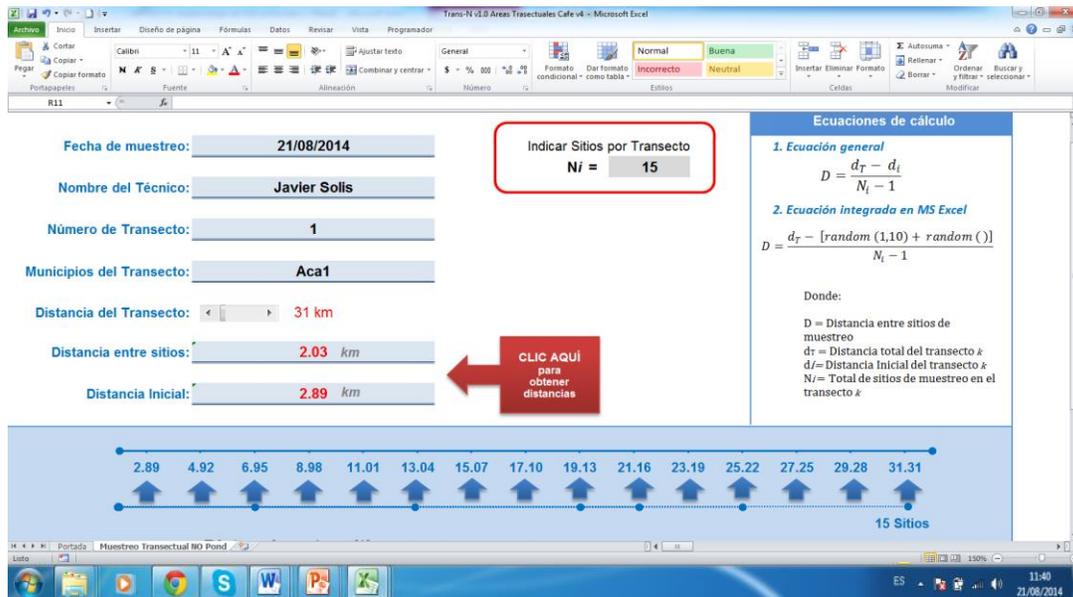


Figura 3. Interface en MS-Excel de la herramienta Trans-N aleatorio. Ejemplo transecto 2. Notar distancia inicio y distancia entre sitios o parcelas de cítricos a muestrear.

A partir del número de sitios, distancia inicial del transecto y distancia entre sitios de evaluación, se generaron mapas por transecto para mayor precisión en ubicación y optimización logística (Figura 4 y Anexo 1).

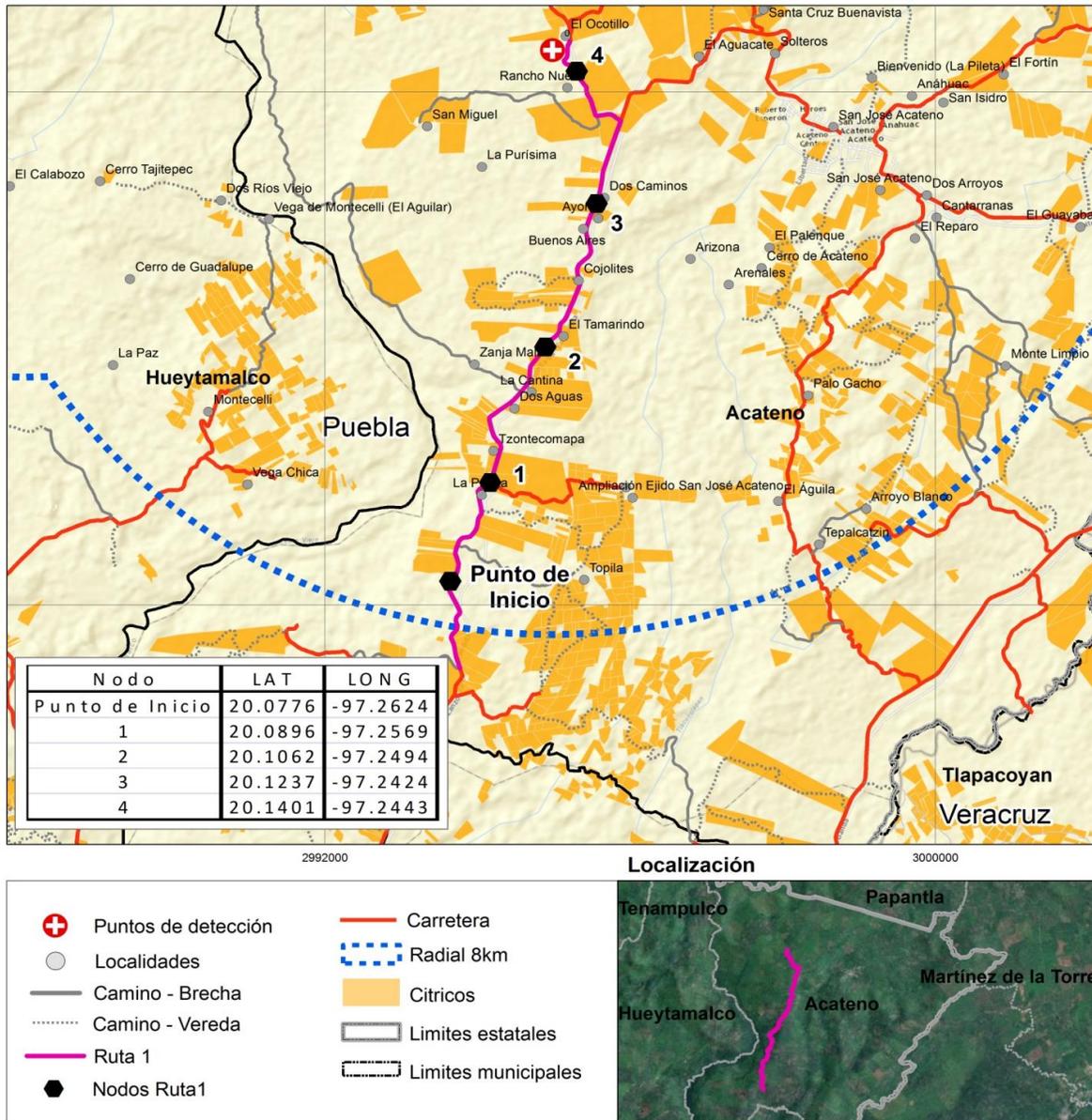


Figura 4. Plan de muestreo transectual con sitios o huertos de cítricos tentativos a muestrear y georreferencia para ubicación en campo. Ejemplo del transecto 1.

2.1.2. Sistema de muestreo y colecta de material vegetal e insectos

El método de muestreo a utilizar se denomina “T”, el cual combina efecto de infección de bordo e interna en una plantación. Los efectos de bordo están documentados (Gottwald *et*

al., 2014; Bassanezi *et al.*, 2005), así como efectos internos (Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011) (Figura 5).

El método consiste en seleccionar 20 plantas intercaladas 1 cada 3, con base en la forma de muestreo en “T” (Figura 5); este método es sistemático y de gran practicidad por ejecutarse en un transecto continuo. Se requiere seleccionar 10 plantas del bordo del huerto y en la planta 5 y 6 seleccionar 5 plantas hacia el interior del huerto y 5 plantas en retorno sobre el surco contiguo. El muestreo en “T” permite conocer el estatus epidemiológico fuera de la zona de dispersión activa del HLB asintomático.

El muestreo en “T” es actualmente empleado para la vigilancia de plagas reglamentadas de cítricos en el Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SINAVEF), y fue propuesto por el LANREF (No publicado).



Figura 5. Sistema de muestreo “T” para evaluar efecto de borde y dispersión interna. Notar que se seleccionan 20 plantas en total, las cuales se intercalan 1 cada 3, según línea de muestreo.

Debido a que las plantas seleccionadas se remuestrearían marcaron con pintura aerosol, para evitar errores de muestreo y que los resultados fueran comparables entre las dos fechas de muestreo. En ambas fechas de muestreo, en cada árbol muestreado se colectó una muestra compuesta de ocho hojas, dos de cada punto cardinal del dosel de los árboles.

Las muestras colectadas se depositaron en bolsas de poli-papel, previamente etiquetadas con los datos de cada sitio de muestreo, y se colocaron en una hielera con gel refrigerante para mantener la calidad de las muestras (DGSV-SENASICA, 2010).

Adicionalmente, en todos los sitios de evaluación se realizó la inspección visual de brotes tiernos para determinar la presencia de adultos de DC; y se colectó una muestra compuesta de 10 adultos, por cada sitio de evaluación (Figura 6) (Flores-Sánchez *et al.*, 2011).



Figura 6. Colecta de adultos de *D. citri* para cuantificación de concentración de CLas.

2.1.3. Estimación del número de generaciones potenciales (NGP) de *D. citri*

Con el propósito de relacionar la carga de inóculo y determinar la implicación de *D. citri* en el estatus epidémico del HLB asintomático en la región de Puebla y Veracruz se realizó la estimación del número de generaciones potenciales (NGP).

Para este estudio el cálculo del NGP de *D. citri* se realizó con base en dos ajustes a las metodologías previamente empleadas para este vector (Díaz-Padilla *et al.*, 2014; Torres-Pacheco *et al.*, 2013). Para ello se procedió de la siguiente manera: 1) Uso del método seno simple interceptado por dos umbrales, el cual es el más apropiado para utilizarse, ya que considera que la temperatura mínima puede ser menor al umbral inferior y la temperatura máxima es mayor al umbral superior (Figura 7) (Allen, 1976); y 2) Uso de datos climáticos corregidos por periodos de brotación vegetativa del cultivo, ya que éstos son más inductivos para el desarrollo de DC. Para la región de Puebla-Veracruz se consideró como especie predominante naranja dulce, por lo que se utilizaron datos de dos periodos de

brotación: enero-marzo y julio-octubre (Medina *et al.*, 2007). En el caso de Colima se consideró a limón mexicano como especie predominante, por lo que se utilizaron datos de todo el año (Robles-González *et al.*, 2014; Miranda-Salcedo y López-Arrollo, 2011; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012).

Los datos de temperatura y humedad relativa utilizados se obtuvieron a partir de una estación climática automatizada (WatchDog) instalada junto a una de las plantas confinadas para este estudio en el huerto El Ocotillo, San José Acateno, Puebla y de la red de estaciones climáticas de la CONAGUA (CONAGUA, 2015) del periodo 2010 al 2015, para mayor representatividad.

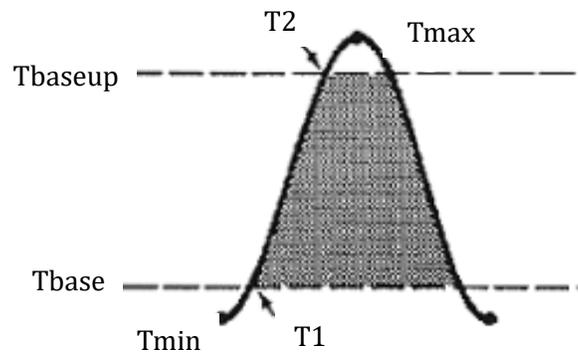


Figura 7. Diagrama de Esquema de método del seno interceptado por dos umbrales

La estimación del NGP se realizó con la siguiente fórmula:

$$NGP = \left(\frac{1}{\pi} \left\{ (Tbar - Tbase) * (T2 - T1) + (a[\cos(T1) - \cos(T2)] + (Tbaseup - Tbase) \left(\frac{\pi}{2} - T2 \right)) \right\} \right) / 211 \quad [E. 6]$$

$$T1 = \text{sen}^{-1}[(Tbase - Tbar)/a] \quad [E. 7]$$

$$T2 = \text{sen}^{-1}[(Tbaseup - Tbar)/a] \quad [E. 8]$$

Donde:

NGP= Número de generaciones potenciales de *D. citri*.

Tbase= 13.5

Tbaseup= 32

Tbar= (*Tmax*+*Tmin*)/2

$$\alpha = (T_{\max} - T_{\min}) / 2$$

T_{\min} = Temperatura mínima diaria del ambiente.

T_{\max} = Temperatura máxima diaria del ambiente.

211 = Grados días desarrollo necesarios para formar una generación potencial de *D. citri*.

2.1.4. Cuantificación de la carga de inóculo regional de CLas

El análisis molecular consistió en el aislamiento de ADN. Cuando éste fue a partir de tejido vegetal se utilizó el método CTAB 2% (Doyle y Doyle, 1987) con buffer salino, para 100 mg de muestra. Para insectos se empleó el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA). La detección y cuantificación se realizó mediante PCR tiempo real, en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems ®), con los primers HLBp (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBp (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), y sonda (5'- AGA CGG GTG AGT AAC GCG-3') (Li *et al.*, 2006). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 5 s; 59 °C por 40s y 59 °C por 35s (Anexo 3).

Para la cuantificación del número de copias genómicas de CLas en las muestras, se generó una curva de calibración externa. Se utilizó el fragmento del gen 16S rDNA clonado en un plásmido (PGEM-T ® Promega®). El plásmido se purificó y cuantificó por uv-espectrofotometría (Nanodrop 1000) y se realizaron diluciones seriales; éstas se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica para estimar la concentración de CLas (y), donde $y = (-3.373) * \text{LN}(\text{Ct}) + 41.95$, la cual se expresa en número de copias del gen 16S ADNr. Con el propósito de evitar variabilidad en la concentración de ADN de las muestra y para que estas fueran comparables, se realizó una dilución a 20 ng/μL.

2.1.5. Análisis de datos

Con el propósito de determinar de manera preliminar las distancias regionales de dispersión de CLas-asintomático, los datos obtenidos de positivos y distancias de sitios de muestreo se graficaron en Excel, para el mes de agosto; sin embargo, el número de sitios por transecto impidió realizar un análisis estadístico formal mediante la metodología de gradientes de dispersión. Adicionalmente, se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de

medias con Tukey ($P \leq 0.05$) de la concentración de CLas en las muestras vegetales y de insectos colectadas en el presente estudio en comparación con muestras de Colima obtenidas en un estudio complementario. Los análisis se llevaron a cabo en SAS Ver. 9.0.

2.2. Caracterización de focos de infección de CLas asintomático

2.2.1. Selección del sitio de estudio

Complementariamente al estudio regional se realizó un análisis de caracterización de seis focos de infección de CLas asintomático, en los cuales las plantas detectadas inicialmente se erradicaron por el CESAVERP (una planta por foco) (SENASICA, 2015) en el huerto El Ocotillo (Figura 8), el cual fue el primer reporte de HLB bajo la condición asintomática.

Con este fin se realizaron seis muestreos sistemáticos en torno a las plantas erradicadas de los 6 focos en: abril, junio, agosto, octubre, noviembre y diciembre de 2014.

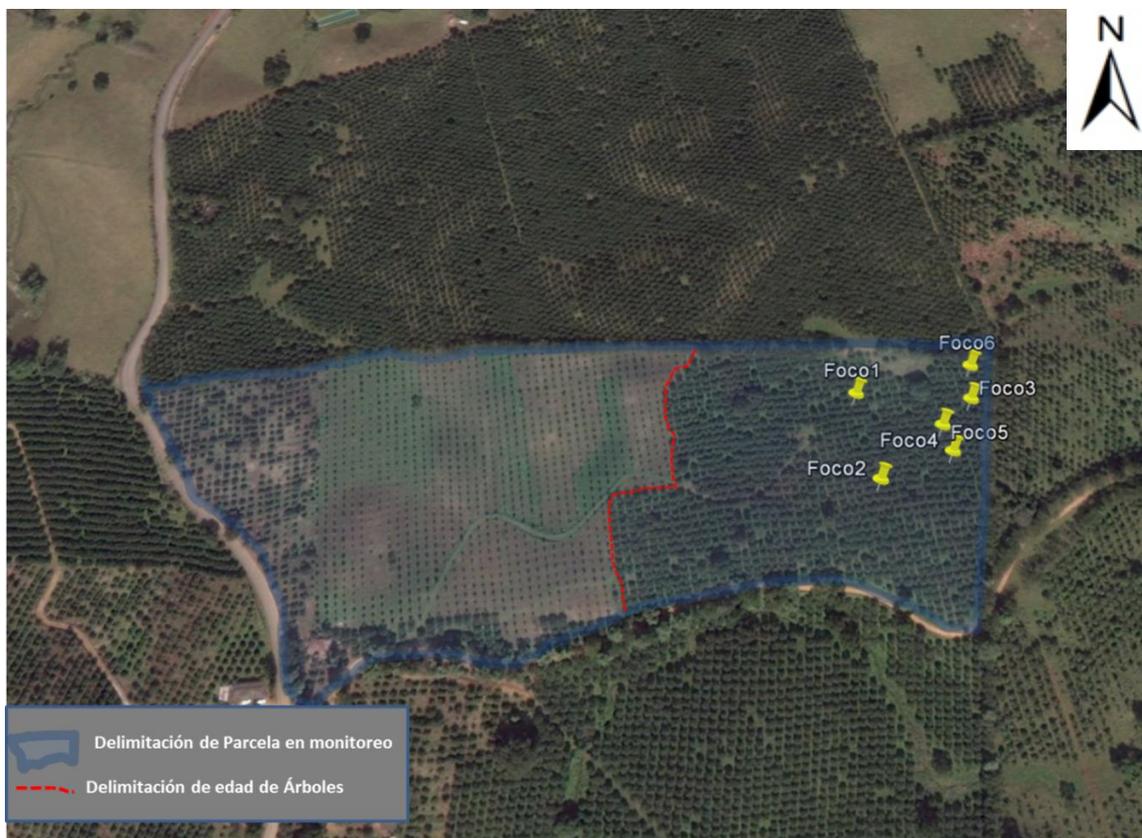


Figura 8. Distribución de focos estudiados en el huerto El Ocotillo, San José Acateno, Puebla, primera detección de cítricos infectados con CLas sin presentar síntomas característicos del HLB.

2.2.2. Sistema de muestreo y colecta de material vegetal e insectos

Para el sistema de muestreo entorno a focos fue empleado inicialmente en el patosistema CTV-Cítricos (Domínguez-Monge, 2011), y consiste en usar el sitio de ubicación de la planta erradicada como centroide, a partir de la cual se seleccionaron ocho plantas vecinas en el sentido de las manecillas del reloj. Adicionalmente, se incrementó el tamaño de foco a 2 o 3 veces el radio de plantas de muestreo en función del número de positivos por fecha de muestreo, convirtiéndose en muestreo de foco múltiple (Figura 9).

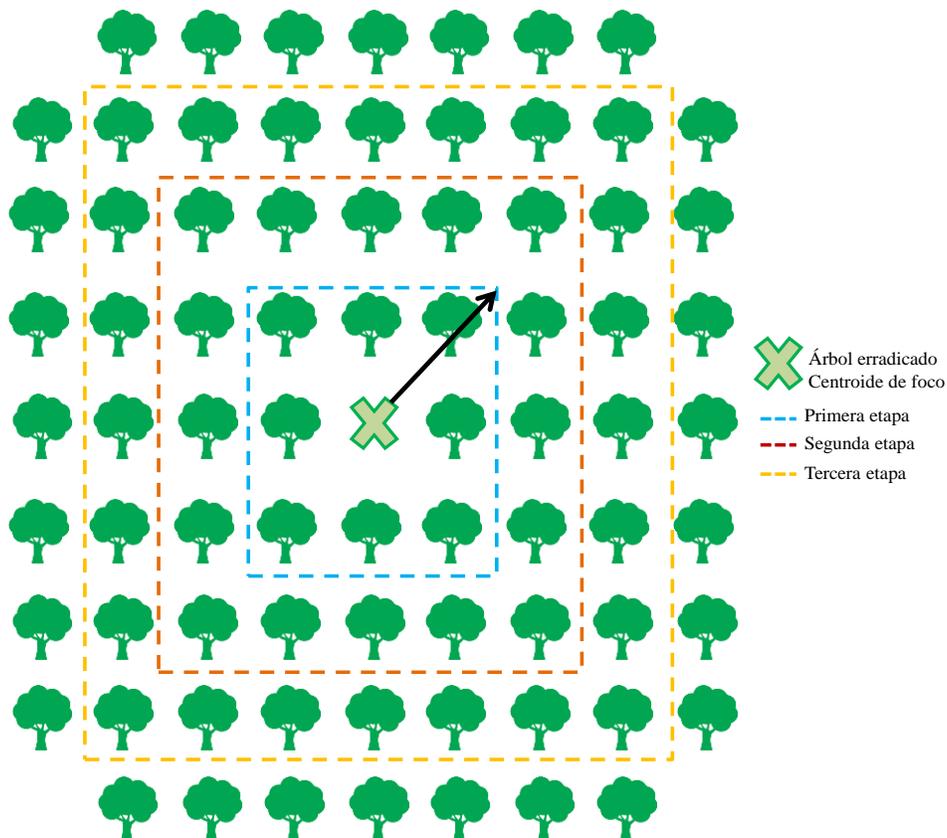


Figura 9. Sistema de muestreo a partir del centroide de foco o planta erradicada, en etapas en función de árboles positivos. En la etapa inicial el foco se constituye de 8 plantas vecinas seleccionadas en el sentido de las manecillas del reloj. En las siguientes etapas se incrementa 2 o 3 veces, según positivos.

En cada etapa de muestreo, cada árbol seleccionado se marcó con listones y pintura aerosol para su identificación en muestreos subsecuentes. En cada árbol se colectó una muestra compuesta de una hoja por punto cardinal del dosel. Las muestras se conservaron en bolsas de polipapel, previamente etiquetadas, en hielera con geles congelados. Adicionalmente, se inspeccionó la presencia de adultos de DC para llevar a cabo el análisis molecular

correspondiente y determinar la concentración de CLas asintomático en focos.

2.2.3. Diagnóstico molecular de CLas en tejido vegetal

Para este objetivo únicamente se efectuó la detección y no cuantificación de CLas, es decir, el fin fue determinar si las muestras tenían presencia de la bacteria. Por lo anterior, el análisis molecular consistió en el aislamiento de ADN con el método CTAB 2% (Doyle y Doyle, 1987) con buffer salino, para 100 mg de tejido vegetal. La detección se realizó con el método de presencia o ausencia en PCR tiempo real mediante un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems ®), con los primers OI1 (5'-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3') y (5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3') (Li *et al.*, 2006). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 5 s; 59 °C por 40s y 59 °C por 35s (Anexo 3).

2.2.4. Análisis de datos

El comportamiento de la dispersión espacial de CLas asintomáticos, fue analizado con mapas geostatísticos del número de positivos por área de muestreo focal y para las seis fechas de muestreo.

Para determinar la tasa temporal de dispersión del HLB, en focos de dispersión, los datos de fechas de evaluación (seis) y un Índice de Positividad (IndPos), el cual es mayor en muestras con mayor condición de positividad, lo que se hipotéticamente sería mayor concentración de CLas. El *IndPos* por planta se calculó con la siguiente ecuación:

$$IndPos = CT_{umbral} - CT_n$$

Donde: *CT_{umbral}*: Es el umbral máximo de Ct para determinar una muestra positiva (36 Ct);

CT_n: Valor del Ct de la muestra compuesta por árbol.

El *IndPos* A nivel de foco el *IndPos* se estimó con la siguiente ecuación:

$$IndPosF = \frac{\Sigma(IndPos)}{n}$$

Donde: *IndPosF*= Índice de positividad por foco; *IndPos*= Índice de positividad por planta del foco; *n*= Número de plantas por foco.

el *IndPosF*, se analizaron mediante el modelo temporal Weibull ($y = 1 - (t/b)^{-c}$) con el método no derivativo DUD de PROC NLIN de SAS 9.0; donde *y* representa el valor de *IndPosF*, *t* es un tiempo a definir, *b* es el parámetro de tasa en su forma inversa y *c* es el parámetro de

forma de la curva (Pennypacker, 1978; Mora-Aguilera *et al.*, 1996). El estimador de los parámetros b , c y r^2 se utilizaron para determinar el ajuste del modelo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización regional de CLas-asintomático en planta y vector

En agosto y noviembre de 2014, se muestrearon 36 huertos citrícolas, en 7 rutas transectuales con distancias entre 10-32 km, lo cual implicó un diámetro de 110 km. Esta región incluyó los municipios citrícolas de San José Acateno y Tenanpulco, Puebla y Martínez de la Torre, Tlapacoyan y Papantla, Veracruz (Figura 10).

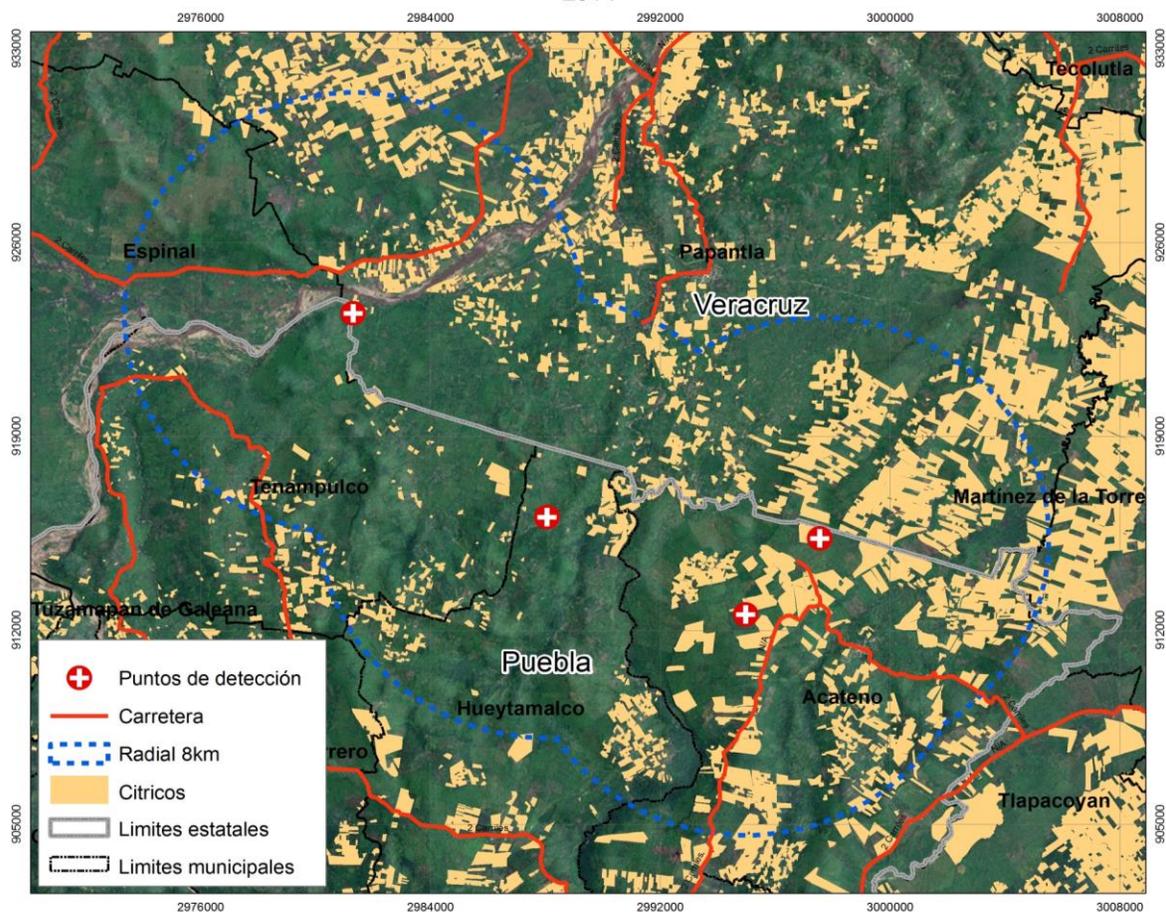


Figura 10. Región en la cual se desarrolló el estudio regional del estatus epidémico de CLas-asintomático. Incluye los municipios citrícolas de San José Acateno y Tenanpulco, Puebla y Martínez de la Torre, Tlapacoyan y Papantla, Veracruz.

3.1.1. Análisis en planta

A partir de los muestreos regionales de material vegetal de especies cítricas como naranja, limón persa, mandarina y toronjo, se encontró una baja concentración de CLas en condición asintomática en la región de Puebla y Veracruz, ya que del total de 732 muestras vegetales asintomáticas colectadas en ambos muestreos, únicamente el 1.7% resultaron positivas: 84 muestras en agosto (1.2%) y 30 muestras en noviembre (0.5%), con un intervalo de concentración de CLas de 226 a 8,846 copias de ADN ($\bar{X}=2,500$) (Figura 11).

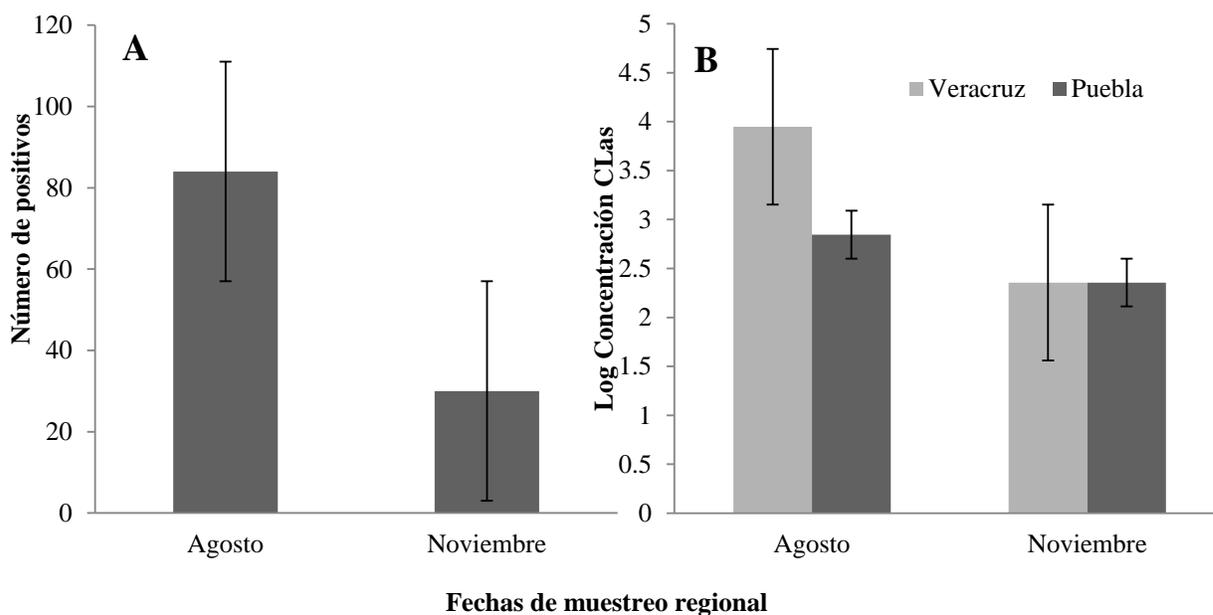


Figura 11. A) Número de árboles positivos y B) Concentración de CLas (Logaritmo del número de copias del gen 16S ADNr X 1'000,000), por fecha de muestreo, en la región citrícola de Puebla-Veracruz. Líneas en las barras indican el error estándar.

En la Figura 11 se observa que en agosto se presentaron mayor número de árboles positivos y mayor concentración de CLas en comparación a noviembre, lo cual es diferente a lo reportado por Bassanezi *et al.* (2013a) quienes indican que la aparición de plantas sintomáticas en San Pablo, Brasil se reduce durante el verano. Complementariamente, en la región de Paraná, Brasil reportaron que en el Otoño existe mayor concentración de CLas y recomiendan ésta época para realizar la detección de plantas enfermas con la bacteria causante del HLB (Sauer *et al.*, 2015). En las condiciones de Colima, México Feliz-Portillo *et al.* (2011) reportaron que durante los meses de diciembre a marzo se observó un

incremento de adultos de DC portadores de la bacteria y que los meses de julio a septiembre los de menor infectividad.

En el caso de México, bajo el escenario de árboles asintomáticos a CLas, la información generada en este estudio es importante debido a que puede usarse en la definición de épocas de muestreo de esta bacteria a nivel regional.

Con la información de positivos a CLas por fecha de muestreo se generó un mapa interpolado para visualizar la distribución de la carga de inóculo por municipio citrícola. En la Figura 12A se observa que para el mes de agosto la mayor concentración de positivos fue en la región de Papantla, Veracruz, la cual colinda con la región de San José Acateno, Puebla. Esta condición sugiere mayor presión de inóculo en dirección de Veracruz hacia Puebla, por lo que las acciones de manejo deberían realizarse para ambas entidades, con las estrategias de erradicación, uso de material vegetal certificado y control regional del vector (SENASICA, 2012; Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2013b), lo cual permitiría reducir el inóculo de CLas y las poblaciones de DC en toda la región, con lo que se espera reducir el potencial de dispersión de CLas bajo esta condición asintomática.

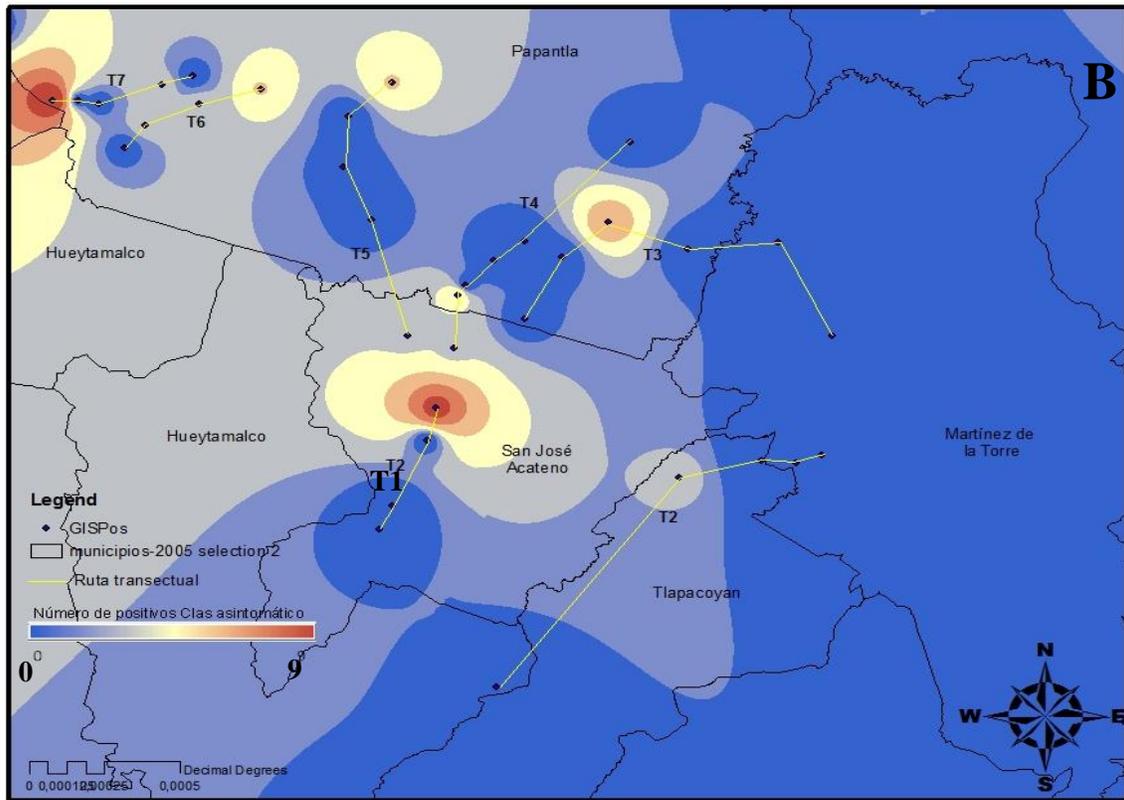
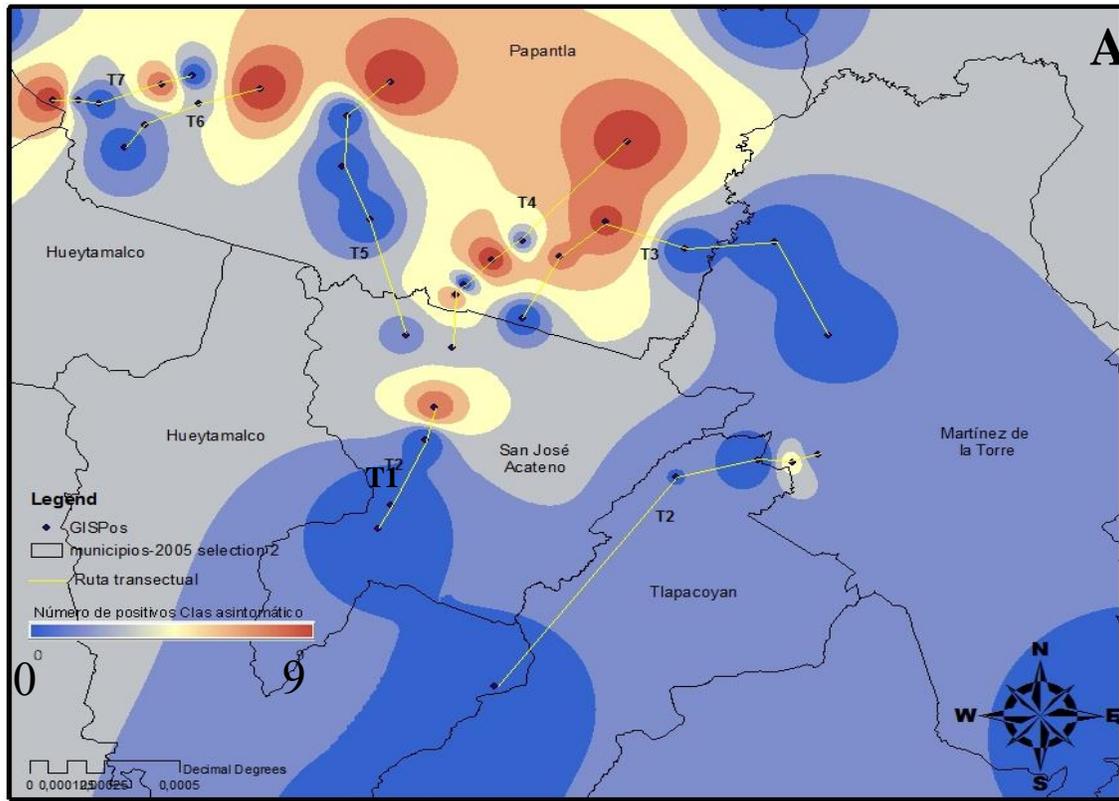


Figura 12. Mapas interpolados del número de árboles asintomáticos positivos a CLAs, por fecha de muestreo A) agosto y B) noviembre.

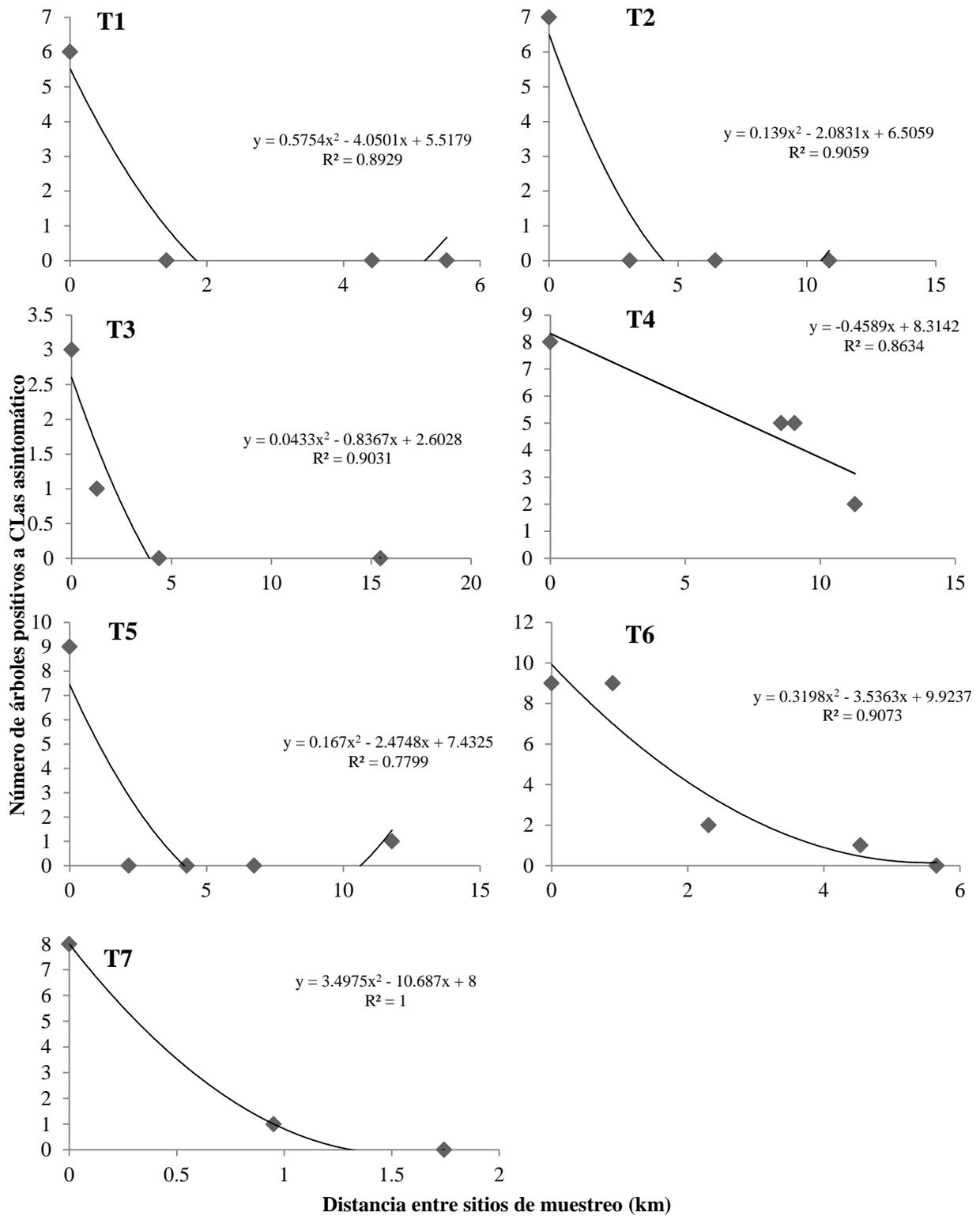


Figura 13. Gráficos del número de positivos y distancias entre sitios de muestreo para cada transecto: T1 a T7, a partir de huertos positivos considerados como focos iniciales por mayor concentración de CLas, en la región de Puebla y Veracruz.

Con el número de positivos y distancias entre sitios de muestreo, para el mes de agosto, se pudo inferir que las distancias regionales de dispersión del HLB asintomático oscilaron entre 1-12 km a partir de huertos positivos considerados como focos iniciales por mayor concentración de CLas, en cada ruta transectual (Figura 13). Sin embargo, esta tendencia requiere validarse ya que el reducido número de huertos por transecto impidió analizar los datos con modelos matemáticos de gradientes de dispersión.

No obstante la detección de esta bacteria en 84 sitios de estudio representa un diámetro de 110 km o un área de 3,927 km², por lo que ésta podría ser el área recomendada para el manejo del HLB mediante la estrategia de Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs), la cual parte del supuesto que a mayor área de control mayor será el efecto en la reducción de la población de DC y por consecuencia una menor dispersión de la enfermedad (Robles, 2012; Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2013b).

En un estudio con enfoque similar, en Yucatán y Quintana Roo, se encontraron distancias de dispersión entre 25 a 80 km, a un año de la primera detección de árboles con síntomas del HLB (Flores-Sánchez *et al.*, 2011). Complementariamente, en Colima, a 8 meses de la primera detección del HLB sintomático, las distancias variaron de 50-90 km, cubriendo la totalidad del territorio estatal en este tiempo (Robles-González *et al.*, 2013). Estos escenarios sugieren que para la región de Puebla y Veracruz, a dos años de la primera detección de plantas asintomáticas positivas a CLas, el proceso de dispersión es bajo.

3.1.2. Análisis en vector

En el caso de muestras del vector, de las 24 muestras colectadas en cada muestreo, cinco fueron positivas en agosto y ocho en noviembre con un rango de concentración de CLAs de 35 a 285.4 copias de ADN de CLAs ($\bar{X}=98.3$) (Figura 14). La cantidad de muestras positivas de DC fue inversa a las fechas observadas en planta. Sin embargo, no se puede asociar claramente el efecto de fecha en la concentración de CLAs debido a la posibilidad de insectos migrantes, es decir, la cantidad de bacteria en el vector no es estrictamente atribuible a la región y periodo de evaluación, por lo que para este fin se sugiere un estudio donde se cuantifique la concentración de CLAs en ninfas.

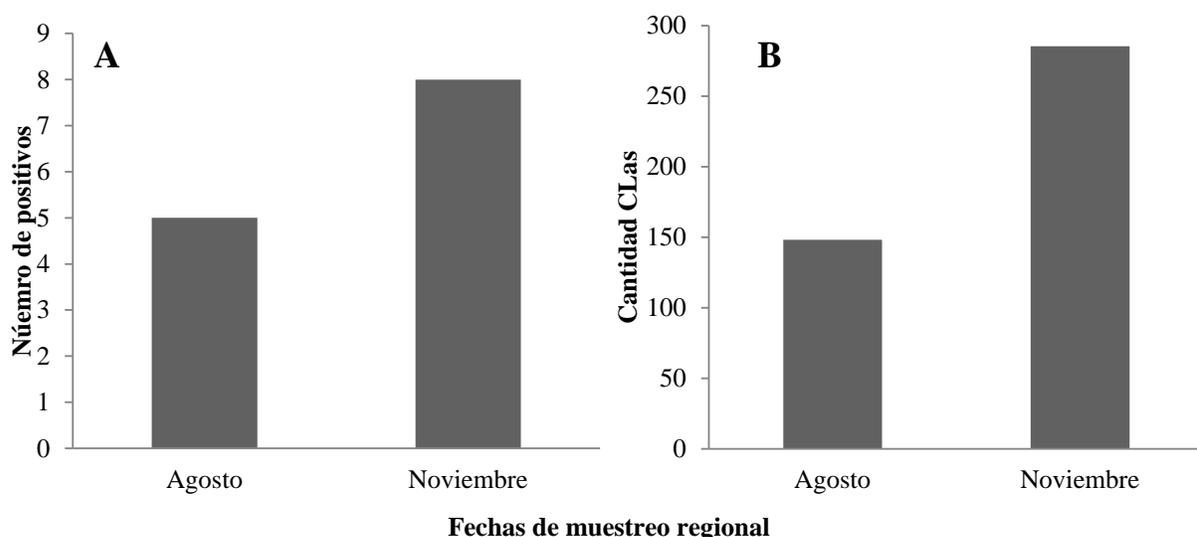


Figura 14. Concentración de CLAs en muestras de insectos de la región citrícola de Puebla-Veracruz. A) Número de muestras positivas y B) Concentración máxima de CLAs, por fecha de muestreo. Líneas en las barras indican el error estándar.

La concentración de CLAs tanto en planta como en vector se considera baja para la región de Puebla-Veracruz en comparación con otras regiones citrícolas como Colima, donde el HLB presenta una condición sintomática y endémica desde 2010 y donde la disponibilidad de tejido por abundancia de la especie citrícola limón mexicano, la cual tiene brotación vegetativa durante todo el año (Robles-González *et al.*, 2014) es mayor que en Puebla y Veracruz. En esta última región abunda la especie naranja dulce, la cual tiene dos ventanas de brotación vegetativa de enero a marzo y julio a octubre (Ortega-Arenas *et al.*, 2013), por lo que la disponibilidad de tejido para DC es menor. Diversos autores señalan que la

brotación es el factor más importante para la abundancia de este vector con preferencia en brotes pequeños u hojas tiernas recién expandidas (Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Liu and Tsai, 2000; Pluke *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2007).

En muestras vegetales colectadas en Colima en un estudio comparativo, la concentración de CLas varió de 108,283 a 1'055,977 copias de ADN. En el insecto la concentración fue similarmente alta y varió de 10,738 a 1'328,874 copias de ADN de CLas (Figura 15). Para esta región de Colima, las concentraciones de CLas en muestras vegetales e insectos son similares, lo que indica que el vector es altamente eficiente en la dispersión de CLas-sintomático, contrario a lo que se observa en Puebla.

Estos datos muestran que la baja concentración de CLas en el vector (285 copias de ADN de CLas) en Puebla con respecto a muestras vegetales (8,846 copias de ADN de CLas), lo cual podría explicar la prevalencia asintomática del HLB por falta de reinfecciones exitosas y por bajas concentraciones de inóculo en el vector y en la planta, limitando la adquisición exitosa.

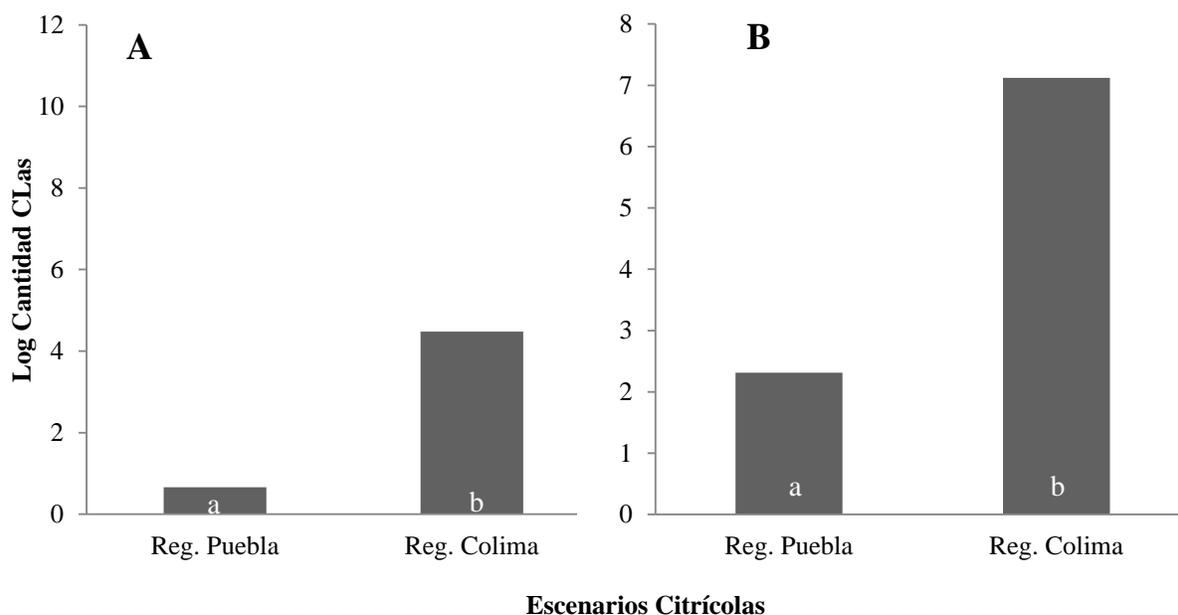


Figura 15. Comparación de carga de inóculo representado por el logaritmo de la cantidad de CLas presentes en muestras: A). Vegetales y B) Vector, en las regiones de Puebla y Colima. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas por Tukey ($P \leq 0.05$). Líneas en las barras indican el error estándar.

3.1.3. Generaciones Potenciales de *D. citri*

La estimación del número de generaciones potenciales (NGP) anuales de DC, permitió validar la hipótesis que en la región de Puebla y Veracruz existen menores condiciones de temperaturas entre 13.5 y 35°C y brotación vegetativa para el desarrollo del vector, en comparación con otras regiones citrícolas de México como el Pacífico, ya que el NGP de DC para Puebla y Veracruz fue de 13.2 por año, considerando datos climáticos de dos periodos de brotación al año (Medina *et al.*, 2007), mientras que para Colima y Michoacán fue de 16 por año, considerando datos climáticos durante todo el año, por brotación constante (Robles-González *et al.*, 2014). Estos datos son coincidentes, en cuanto a la inductividad de la región, a los reportados por Díaz-Padilla *et al.* (2014) (Figura 16), es decir que la región del Pacífico tiene mayor inductividad al desarrollo de *D. citri*, ya que con su metodología obtuvieron 28 GP para el Pacífico, mientras que para la región de Puebla y Veracruz obtuvieron 9 GP de este vector (Díaz-Padilla *et al.*, 2014). Sin embargo, la diferencias pueden deberse al uso del método del seno y corrección por fenología, lo cual se propone en este estudio para tener una estimación del NGP con mayor explicación biológica, dependiente de la disponibilidad de tejido y no únicamente de las condiciones ambientales (Tsai *et al.*, 2002; Liu and Tsai, 2000).

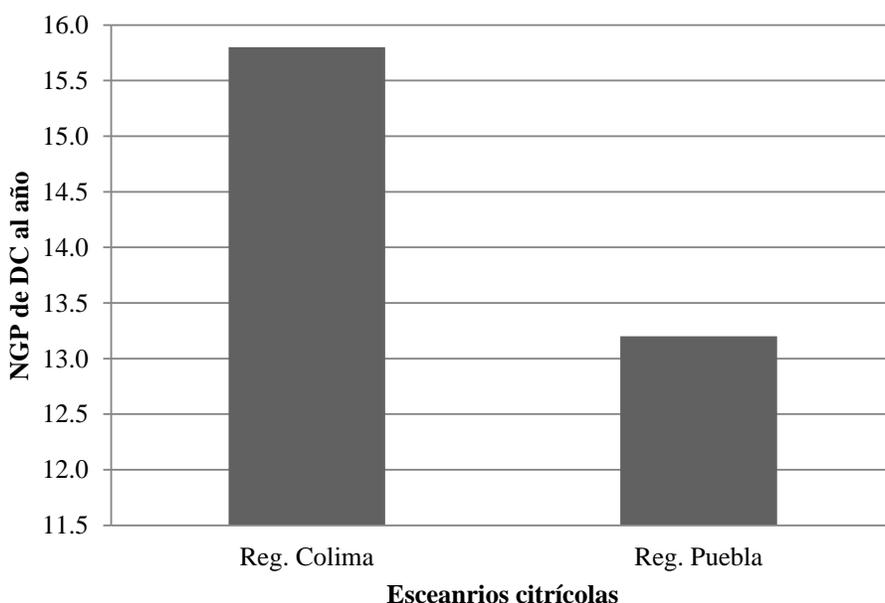


Figura 16. Número de Generaciones Potenciales (NGP) de *D. citri* al año, estimadas en el presente estudio para la región de Puebla y Veracruz con datos climáticos de dos periodos de brotación, y la región de Colima y Michoacán con datos climáticos de todo el año por brotación constante.

En un estudio de la abundancia estacional de DC en Veracruz se reportó que para naranja dulce, los meses con mayor abundancia de este insecto son de enero a abril con una densidad promedio de ocho adultos por trampa (Ortega-Arenas *et al.*, 2013). La presencia de brotes vegetativos tuvo influencia directa en la abundancia de *D. citri* debido a que la oviposición se realiza en brotes tiernos y el desarrollo de las ninfas transcurre en brotes jóvenes (Liu & Tsai 2000, Pluke *et al.* 2008). Mientras que en Colima y Michoacán las mayores poblaciones de DC se reportaron en los meses de noviembre a mayo con una densidad promedio de 100 adultos por trampa (Velázquez-Monreal *et al.*, 2012) o de 21 a 33 generaciones por año (Miranda-Salcedo y López-Arroyo, 2011).

Esto sugiere que los procesos de dispersión y reinfección por inóculo secundario son de menor intensidad en la región de Puebla y Veracruz en comparación con Colima y Michoacán, lo que resulta en epidemias de baja intensidad o de bajo riesgo.

3.2. Caracterización de focos de infección de CLas asintomático

La caracterización de los focos de CLas-asintomático se realizó en seis fechas, en las cuales se amplió el radio de muestreo en función de la ocurrencia de nuevos positivos. En el Cuadro 2 se muestra el número de árboles positivos y plantas muestreadas por foco y fecha de muestreo.

Cuadro 1. Número de árboles positivos a CLas-asintomático y número de plantas muestreadas por fecha de evaluación.

Foco	Fechas de muestreo											
	Abril		Junio		Agosto		Octubre		Noviembre		Diciembre	
	^a Pos	^b n	Pos	N	Pos	n	Pos	n	Pos	n	Pos	n
1	3	8	9	24	0	48	0	48	0	48	0	48
2	0	8	6	24	6	48	1	48	1	48	1	48
3	0	8	0	8	0	8	0	8	0	8	1	8
4	0	8	9	24	0	24	0	24	0	24	2	24
5	0	8	7	24	0	24	0	24	0	24	1	24
6	0	8	17	24	4	48	8	48	0	48	0	48

^aPos= Número de árboles positivos a CLas-asintomático; ^bn=Número de árboles muestreados por fecha.

3.2.1. Análisis temporal

El seguimiento temporal de los focos de infección intraparcenarios indicó que junio fue el mes con mayor número de árboles positivos a CLas asintomático (48) y noviembre el menor (1), esta condición es la misma que se encontró en el estudio regional y difiere de los reportes de Brasil, en los cuales la aparición de plantas sintomáticas se redujo durante el verano, debido a las altas temperaturas (Bassanezi *et al.*, 2013a) y que la concentración de la bacteria es mayor durante el otoño (Sauer *et al.*, 2015).

Se encontró que el foco con mayor presencia de positivos fue el número seis (Figura 17), el cual tuvo ocurrencia de árboles positivos en junio, agosto y octubre. La ubicación de este foco se localizó en los límites del huerto por lo que la presencia del mayor número de positivos puede deberse a una presión de inóculo de huertos colindantes y al efecto de borde, el cual se ha reportado en diferentes regiones cítricas como San Pablo, Brasil y Florida, E. U. A. (Gottwald *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2005).

Los resultados evidencian que a pesar de la erradicación de los centroides de foco, existen plantas en proceso de infección complementando su periodo de latencia. Por lo tanto, CLas-asintomático tiene capacidad de dispersión por DC.

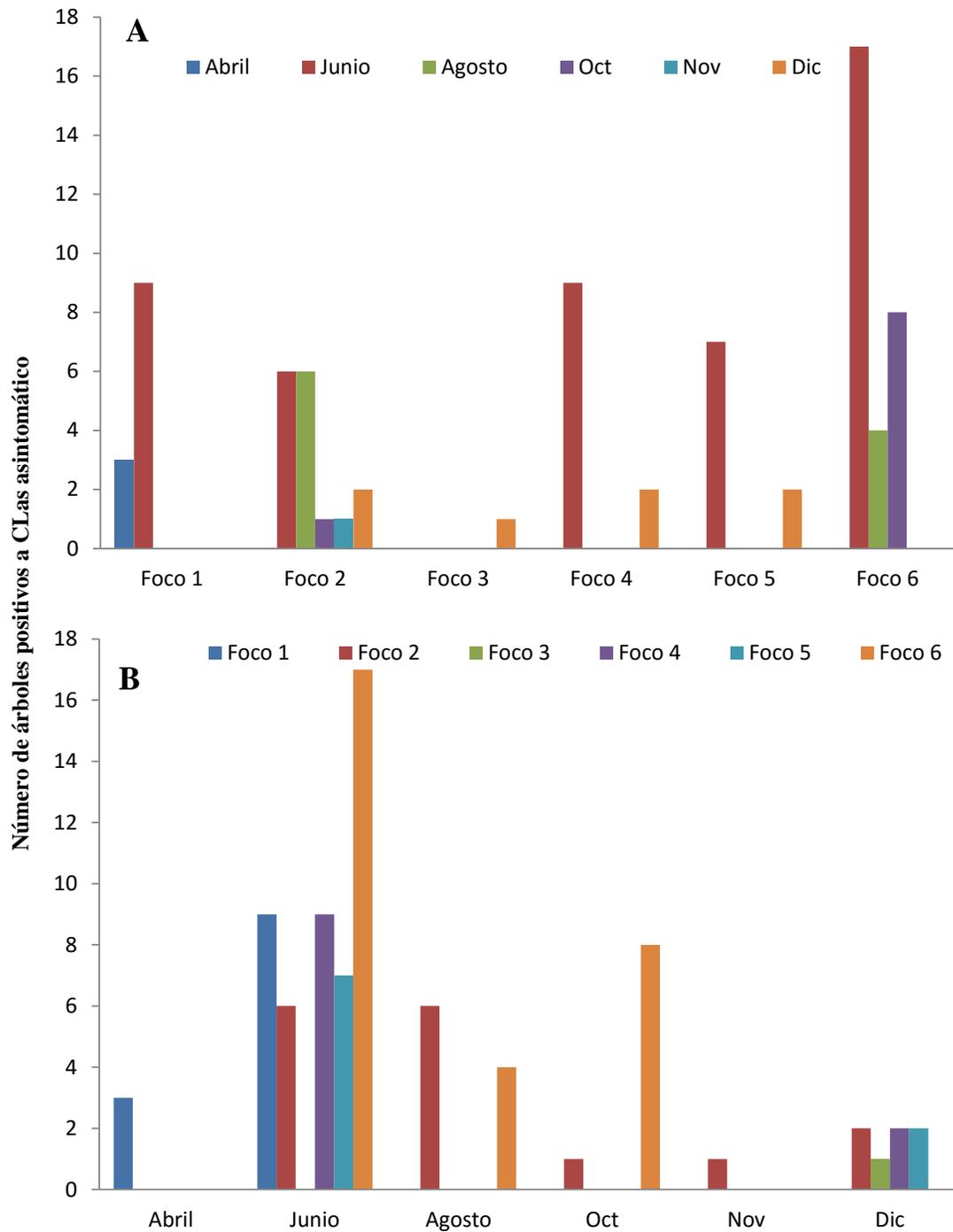


Figura 17. Número de árboles positivos a CLAs por foco (A) y por fecha (B) en el huerto El Ocotillo, San José Acateno, Puebla, primera detección de asintomáticos en la región.

El índice de positividad por foco (*IndPosF*) por mes de evaluación, se ajustaron con el modelo temporal Weibull para determinar la velocidad con la que los árboles colindantes podrían enfermarse, es decir, la tasa de dispersión de CLAs asintomático a nivel parcelario. Se logró el ajuste de los focos 2, 5 y 6 con $r^2 = 0.92, 0.89$ y 0.92 , respectivamente (Figura 18).

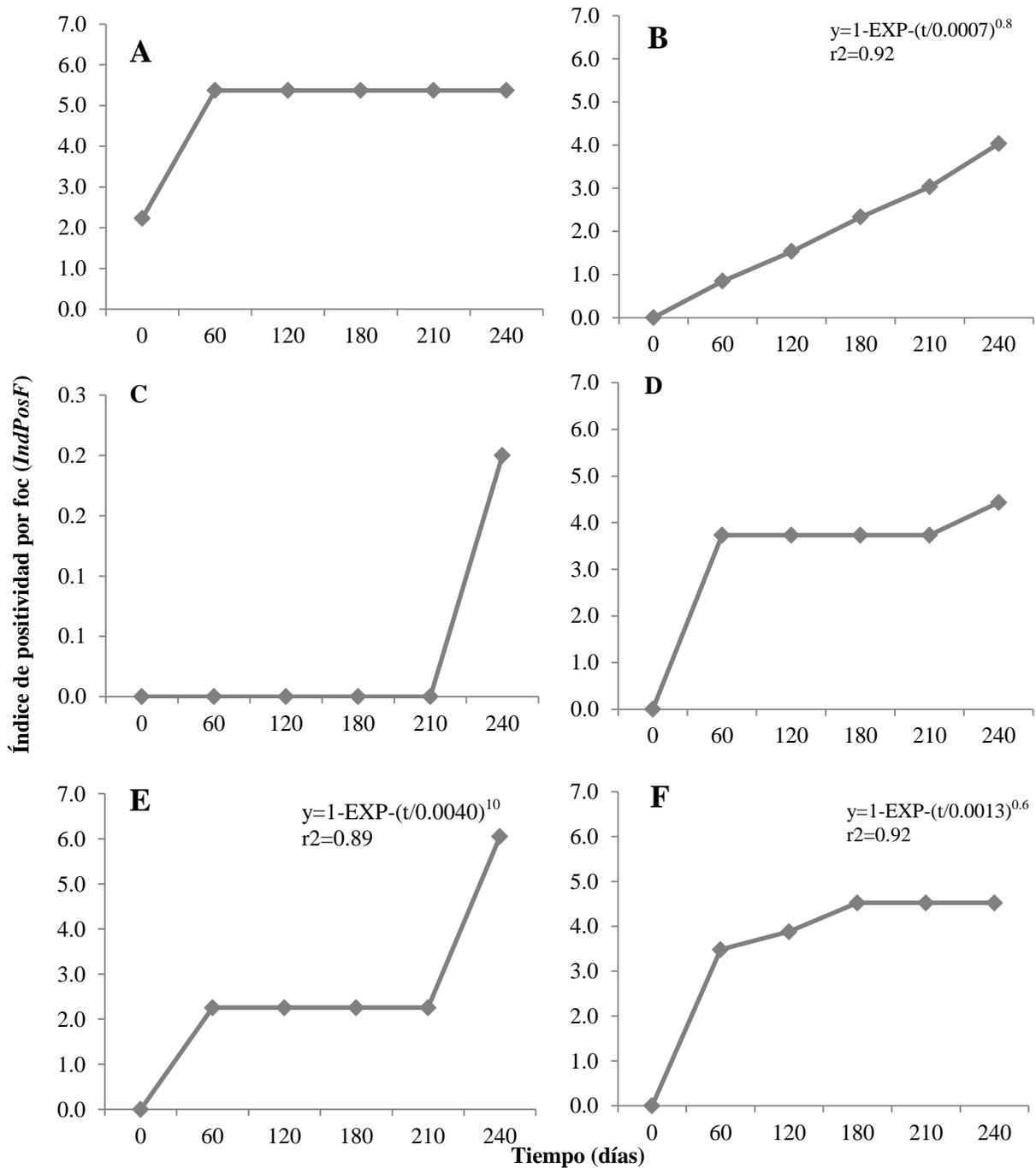


Figura 18. Gráficos temporales del número de positivos ajustados con el modelo Weibull para los focos A) 1, B) 2, C) 3, D) 4, E) 5 y F) 6. Las líneas y modelos para los focos 2, 5 y 6 representan el ajuste con el modelo Weibull.

Las tasas temporales obtenidas en el presente estudio fueron de $b= 0.0007, 0.0040,$ y $0.0013,$ para los focos 2, 5 y 6, respectivamente, las cuales se consideran bajas en comparación con la dispersión parcelaria del HLB sintomático que se reportaron para otras regiones cítricas del

país, como en dos huertos de limón mexicano de Colima, en los cuales las tasas de infección fueron de $b=0.17$ y 0.002 esto durante 7 y 10 meses de evaluación (Figura 19) (Robles-González *et al.*, 2013).

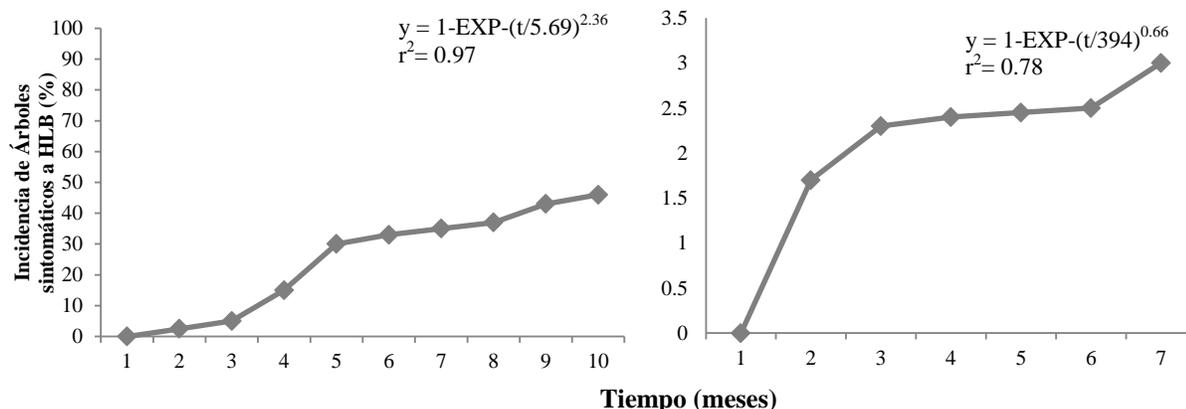


Figura 19. Comportamiento temporal del HLB en dos huertos de Tecomán, Colima y su ajuste con el modelo de Weibull. Análisis con datos de Robles-González *et al.*, 2013.

Los estudios en México que indican que el progreso temporal del HLB sintomático es mayor que el observado en el presente estudio, los cuales se describen a continuación en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características y parámetros de comportamiento temporal de CLas-sintomático en huertos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en Colima y limón persa (*Citrus latifolia*) en Nayarit y Yucatán, México.

Estado	Municipio	Huerto	Especie	N (ha)	Tiempo (meses)	1/b ^a	C ^b	r ^{2c}	Yf ^d (%)	Cita
Colima	Tecomán	Col1	L. mex	40	10	0.17	2.36	0.97	46	^e Robles-González <i>et al.</i> , 2013
Colima	Tecomán	Col2	L. mex	10	7	0.002	0.66	0.78	3	
Nayarit	Xalisco	Nay 1	L. persa	0.1	6	0.13	1.4	0.91	44	Márquez <i>et al.</i> , 2011
Nayarit	Xalisco	Nay 2	L. persa	0.1	6	0.19	1.62	0.99	65	
Nayarit	Xalisco	Nay 3	L. persa	0.1	6	0.32	2.17	0.94	70	

										(Continuación...)
Nayarit	Ahuacatlán	Alto	L. persa	0.3	6	0.02	0.83	0.88	18	°Esquivel-Chávez, 2011
Nayarit	Ahuacatlán	Mod	L. persa	0.3	6	0.01	4.36	0.99	85	
Nayarit	Ahuacatlán	Bajo	L. persa	0.3	6	0.001	0.53	0.91	34	
Yucatán	Tizimín	Moct	L. persa	0.3	8	0.04	2.2	0.95	44	°Loeza-Kuk <i>et al.</i> , 2010
Yucatán	Tizimín	SRosa	L. persa	0.1	8	0.02	1.3	0.91	19	

^aParámetro de tasa en su forma inversa, ésto es 1/b; ^bParámetro de forma de la curva; ^cCoefficiente de determinación del modelo. ^dFuente de datos para análisis propio.

En estos estudios las menores tasas se observaron en los huertos de Ahuacatlán, Nayarit y los dos de Yucatán, las cuales oscilaron entre 0.001 a 0.04 (Esquivel-Chávez, 2011; Loeza-Kuk *et al.*, 2010). En el resto de huertos de Nayarit las tasas oscilaron entre 0.13 a 0.32 (Márquez *et al.*, 2011), ambos estados para limón persa. Las diferencias entre los huertos de Nayarit podrían deberse al efecto de la población, ya que en los huertos de Ahuacatlán la superficie fue de 0.3 ha mientras que en Xalisco de 0.1. En el caso de limón mexicano de Colima el huerto Col1, en el cual se realizó la primera detección del HLB en dicho estado, presentó una tasa de 0.17 en 40 ha, lo cual coincide con el estatus actual de mayor intensidad epidémica de CLas en esta entidad (SENASICA, 2015; Capítulo II y Capítulo III). En el caso de Col2 tuvo una tasa de 0.002; sin embargo, se trata de un huerto dentro de las instalaciones del INIFAP, por lo que posiblemente las condiciones de manejo agronómico, control del vector influyeron en menor dispersión de CLas. Lo anterior sugiere que la dispersión del HLB sintomático es mayor a la del HLB asintomático en Puebla-Veracruz en naranja dulce.

Las causas de este comportamiento podrían ser la baja carga de inóculo en planta y vector, la baja población por disponibilidad de tejido (Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012; Miranda-Salcedo y López-Arroyo, 2011) y falta de reinfecciones exitosas, lo que tiene como consecuencia una baja dispersión regional y parcelaria de CLas asintomático.

Adicionalmente, existen otros factores de líneas de investigación complementarias que requieren considerarse para determinar el porqué de la condición asintomática como estudios de variabilidad genética de la bacteria, relación injerto-portainjerto y variabilidad estacional copa-raíz de la concentración de CLas.

3.2.2. Análisis espacial

Los resultados del análisis de focos intraparcenarios muestran que el comportamiento de CLas-asintomático es similar al reportado para CLas-sintomático, ya que se distribuye inicialmente en focos a partir del centroide y que posteriormente a plantas contiguas, las cuales se encuentran en proceso de infección completando su periodo de latencia (Figura 21 y 22) (Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011; Gottwald *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2005). Los focos que presentaron mayor presencia de positivos fueron el 1 y el 6 con 17 y 16 árboles positivos, respectivamente (Figura 21); en términos de dispersión espacial, estos focos representan la condición de mayor distancia de dispersión de CLas-asintomático, la cual fue en un diámetro de 7 x 8 árboles, lo que implica un área de 2,352 m² (Figura 21). Adicionalmente, se observó que la distribución de positivos es más consistente en dirección norte del centro de foco, probablemente por el factor viento el cual dispersa al vector DC (Figura 21) (Anexo 2).

En estudios realizados para el Virus de la tristeza de los cítricos (VTC) detectaron que la mayor dispersión del virus ocurrió en dirección de hileras dentro del huerto por (Ruíz-García *et al.*, 2009), comportamiento similar al que se reporta para otros patógenos de cítricos con presencia de un vector como el caso de Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC) (Laranjeira *et al.*, 2004).

Con estos datos parcelarios de la distribución espacio-temporal de CLas-asintomático se puede concluir que existe dispersión activa de CLas bajo esta condición (según tasas temporales), en adición a una baja concentración de esta bacteria en la mayoría de las muestras positivas (29.2-35.9 Ct).

Finalmente, tanto el estudio de dispersión regional como el estudio parcelario sugieren que la dispersión del HLB asintomático es baja, en consideración al número de árboles positivos y concentración de CLas.

Esta información podría ser empleada para definir tamaños de focos en un contexto de muestreo a nivel de huertos, lo cual permita definir el estatus del HLB bajo la condición asintomática y para efectuar acciones de mitigación de esta enfermedad como erradicación de plantas y control local y regional del vector.

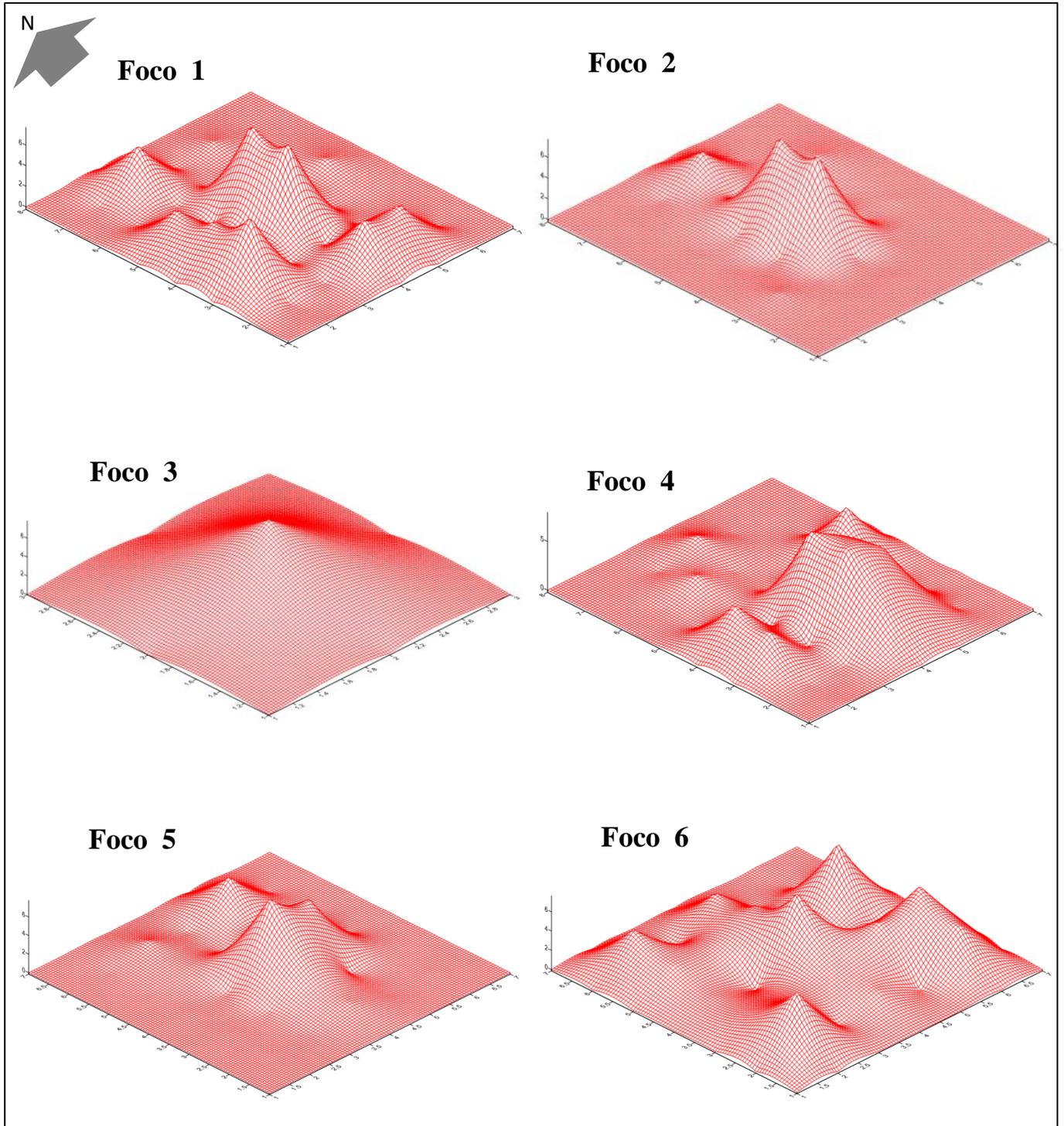


Figura 20. Mapas geostatísticos del índice de positivos (*IndPos*) (Umbral de Ct para determinar una muestra positiva (36 Ct) menos el valor del Ct de cada muestra) en el mes de junio (mayor presencia de positivos) por foco del huerto El Ocotillo, San José Acateno, Puebla.

4. CONCLUSIONES

Las evidencias del análisis de dispersión de CLas-asintomático a nivel regional y parcelario muestran que bajo esta condición en la región de Puebla-Veracruz está asociada a una baja concentración de la bacteria en planta y vector en comparación con otras regiones citrícolas como Colima. La baja carga de inóculo en el vector (285 copias de ADN de CLas) con respecto a muestras vegetales (8,846 copias de ADN de CLas), en complemento a la baja población de *D. citri* podría explicar la baja dispersión parcelaria y regional del HLB asintomático.

Las distancias de dispersión activa del HLB asintomático en la región oscilan entre 1 y 12 km. Sin embargo, debido a que la presión de inóculo ocurre en dirección de Veracruz hacia Puebla, y a que se encontraron 114 muestras con presencia de la bacteria, se sugiere realizar acciones de erradicación y control local y regional de DC bajo la estrategia ARCOs, en ambas entidades en un área de 3,927 km².

A nivel parcelario, el comportamiento espacio-temporal del HLB asintomático presentó una tasa de infección promedio de $1/b = 205$ a 1355 y en focos con un área de dispersión activa de 7 x 8 árboles (2,352 m²).

Se recomienda emplear los datos de distancias parcelarias y regionales de dispersión en un contexto de estrategia regional y nacional de muestreo y delimitación de focos de dispersión activa para efectuar acciones de erradicación de árboles asintomáticos (inóculo primario) y control del vector (inóculo secundario).

Adicionalmente, la información generada en este estudio no explica holísticamente la presencia de plantas asintomáticas, por lo que se requiere complementar con otras líneas de investigación como estudios de variabilidad genética de la bacteria y relación injerto-portainjerto.

5. REFERENCIAS

1. Allen, J. C. 1976. A modified sine wave method for calculating degree days. *Environmental Entomology* 5: 388-396.
2. Aubert B. 1987. *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42:149–62.
3. Bassanezi, R. B., Belaue, J. J. and Montesino, L. H. 2013a. Frequency of symptomatic trees removal in small citrus blocks on citrus huanglongbing epidemics. *Crop protection* 52: 72-77.
4. Bassanezi, R. B., Montesino. L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto. P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., Bergamin, Filho. A. 2013b. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796.
5. Bassanezi RB, Busato LA, Bergamin Filho A, Amorim L, Gottwald TR, 2005. Preliminary spatial pattern analysis of huanglongbing in São Paulo, Brazil. Pp: 341–55 *In Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA, USA: IOCV.
6. Díaz-Padilla, G., López-Arroyo, J. I., Sánchez-Cohen, I., Guajardo-Panes, R. A., Mora-Aguilera, G. y Quijano-Carranza, J. A. 2014. Áreas de abundancia potencial en México del vector del Huanglongbing, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(7): 1137-1153.
7. DGSV-SENASICA. 2010. Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing. 2ª Edición. Dirección General de Sanidad Vegetal Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), México, D. F. Disponible en <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364> (Consulta 15-07-2014).
8. Domínguez-Monge, S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 63 pp.
9. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.

10. Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J.J., Manzanilla-Ramírez, M.A., Flores-Sánchez, J.L. y López-Arroyo, J.I. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8):769-782.
11. Esquivel-Chávez, F. 2011. Análisis Histológico y Epidemiológico de limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 56 pp.
12. Felix-Portillo, M., Martínez-Quintana, J. A. y Arredondo-Bernal, H. 2011. Estacionalidad de la infectividad de CLas (Huanglongbing) en Colima. Pp: 17-21 *In: Memoria del 2do. Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 5 y 6 de Diciembre. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.*
13. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., Rivas-Valencia, P., Ruiz-García, N., López-Arroyo, J. I., Hernández-Chan, E., Novelo-Cocon, A., López-Sánchez, P., y Sánchez-Rebolledo, F. 2011. Gradientes de Dispersión del HLB a partir de Focos Iniciales de Infección en la Península de Yucatán. Pp: 83-87 *In: Memoria del 2do. Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 5 y 6 de Diciembre. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.*
14. Gottwald, T., Luo, W., Riley, T. and Parnell, S. 2014. Edge effect and Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology* 1: 126-127.
15. Laranjeira, F.F., Bergamin Filho, A., Amorim, L. & Gottwald, T.R. 2004. Dinâmica espacial da clorose variegada dos citros em três regiões do Estado de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 29: 056-065.
16. Lee, J. A., Halbert, S. E., Dawson, W. O., Robertson, C. J., Keesling, J. E. and Singer, B. H. 2015. Asymptomatic spread of Huanglongbing and implications for disease control. *Plant Health*:
www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1508253112/-/DCSupplemental

17. Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*. 66:104-115.
18. Liu, Y. H. and Tsai, J. H. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Annals of Applied Biology* 137:201-206.
19. Loeza-Kuk, E., Jasso-Argumedo, J., Lozano-Contreras, M., Hernandez-Chan, E. 2010. Dispersión *Candidatus Liberibacter* spp. en huertas cítricas de Yucatán, México. *In:* 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 8 y 9 de diciembre. Monterrey, N. L. pp:125-134.
20. Márquez, P. F., Márquez, G. J., Rodríguez, M. M. L., Esquivel, C. F., Mora, A. G. y Acevedo, S. G. 2011. Análisis espacial y temporal del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en el municipio de Xalisco, Nayarit. (Presentación en Poster) *In:* 2do. Taller Internacional de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. 1519 de agosto. Manzanillo, Col.
21. Medina, U. M., Zapiáin, E. G., Robles, G. M. M., Pérez, Z. O., Orozco, S. M., Williams, T. and Becerra, S. R. 2007. Fenología, eficiencia productiva y calidad de fruta de cultivares de naranjo en el trópico seco de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30:133-143.
22. Miranda-Salcedo, M. A. y López-Arroyo, J. I. 2011. Avances de investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* KUWAYAMA en Michoacán, México. Pp: 149-155 *In* Memorias del 2º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. 9-11, Diciembre. Texcoco, Edo. de México.
23. Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Velázquez-Monreal, J. J., Flores-Sánchez, J. L., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S. y González-Gómez, R. 2014. Situación Actual y Perspectivas de Manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108-119.
24. Mora-Aguilera, G., Nieto-Angel, D., Campbell, C. L., Téliz, D. and Garcia, E. 1996. Multivariate Comparison of Papaya Ringspot Epidemics. *Phytopathology* 86: 70-78.

25. Ortega-Arenas, L. D., Villegas-Monter, A., Ramírez-Reyes, A. J. y Mendoza-García, E. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazones, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana* 29(2): 317-333.
26. Pluke, R. W. H., Qureshi, J. A. and Stansly, P. A. 2008. Citrus flushing patterns, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. *Florida Entomologist* 91: 36-42.
27. Robles-González, M. M., Medina-Urrutia, V. M. y Manzanilla-Ramírez, M. A. 2014. Fenología y Poda. Pp: 135-154 *In* El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A. y Bermúdez-Guzmán, M. (eds.). SAGARPA, INIFAP, CIRPAC. Colima, México.
28. Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal. J. J., Manzanilla-Ramírez. M. A., Orozco-Sánchez. M., Medina-Urrutia. V. M., López-Arroyo, J. I. y Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19(1): 15-31.
29. Sauer, A. V., Zanutto, C. A., Requena, N. P. T., Machado, M. A., Bock, C. H. and Nunes, M. C. 2015. Seasonal variation in populations of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus trees in Paraná State, Brazil. *Plant Disease* 99(8): 1125-1132.
30. SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe Julio, 2015. Revisado el 27 de julio 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
31. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Cierre de la producción agrícola por estados. Revisado el 11 de diciembre de 2015. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
32. Torres-Pacheco, I., López-Arroyo, J. I., Aguirre-Gómez, J. A., Guevera-González, R. G., Yanez-López, R., Hernández-Zul, M. I. y Quijano-Carranza, J. A. 2013. Potential Distribution in Mexico of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of Huanglongbing pathogen. *Florida Entomologist* 96: 36-47.
33. Velázquez-Monreal, J. J., Robles-González, M. R., Manzanilla-Ramírez, M. A., Orozco-Santos, M., Carrillo-Medrano, S. H. y López-Arroyo, J. I. 2012. Dinámica

poblacional de *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) en cítricos ácidos en el estado de Colima. Pp: 116-125 *In* Memorias del 3° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.

CAPÍTULO V
ANÁLISIS EPIDEMIOLÓGICO REGIONAL DEL HUANGLONGBING EN
PARAGUAY

RESUMEN

El Huanglongbing de los cítricos (HLB) se detectó en Paraguay en enero de 2013 asociado a la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp. en planta y vector (*Diaphorina citri*) y desde esa fecha está presente en los departamentos de Itapúa, Caazapá, Alto Paraná, Cordillera y San Pedro. Las acciones de mitigación de esta enfermedad por parte del Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y Semillas (SENAVE) se basan en la erradicación de plantas y control de *D. citri*; sin embargo no existen estudios formales sobre el comportamiento epidémico del HLB para coadyuvar a su manejo, por lo anterior y en vinculación con el SENAVE se planteó: determinar el estatus epidémico del HLB a nivel regional y determinar el efecto de la erradicación en el proceso epidémico parcelario y el tipo de patrón espacial con fines de manejo del HLB en las regiones cítricas de Paraguay. Mediante un método ponderativo del sistema epidemiológico se seleccionaron 22 huertos en los cinco principales departamentos cítricos del País. A nivel parcelario se emplearon tres métodos de muestreo para determinar la intensidad e inductividad epidémica del HLB, mediante variables de la planta, enfermedad, vector y manejo. Con los datos se generó un índice multivariado (IM) y un análisis del patrón espacial. El IM indicó que el estatus epidémico del HLB en Paraguay es de baja intensidad con un gradiente de la región de Itapúa y Caazapá (IM=0.00031 y 0.00021, respectivamente), hacia la región de Boquerón (IM=0.0002), lo cual sugiere un mayor riesgo de establecimiento y dispersión del HLB en Itapúa y Caazapá. En siete de 22 huertos se encontró presencia del HLB. A nivel parcelario se comprobó que la erradicación tiene un efecto en la reducción de la dispersión del HLB al mantener una incidencia y severidad promedio del 29.2% (± 19.9) y 12% (± 7.9); y que el patrón espacial es agregado y con efecto de borde en la fase inicial de la epidemia, por lo que se recomienda mantener las acciones de erradicación con como base del manejo del HLB y control regional del vector para optimizar recursos humanos y económicos en un contexto de emergencia nacional para evitar la dispersión del HLB en Paraguay.

1. INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing de los cítricos (HLB) es la enfermedad de mayor distribución mundial (Bové, 2006). En Paraguay los estudios de prospección y monitoreo, con énfasis en la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) y su vector *Diaphorina citri* (DC) iniciaron desde 2006; sin embargo fue hasta enero de 2013 que se detectó al HLB en este país, y desde esa fecha ha mantenido un proceso de dispersión con detecciones en planta y vector en los departamentos de Itapúa, Caazapá, Cordillera, Amambay, Alto Paraná, San Pedro y Concepción (SENAVE, 2013a). Aparentemente, el inóculo proveniente de Brasil, que colinda con Paraguay en la región de Paraná influye en el riesgo y dispersión y establecimiento de CLas en Paraguay.

Estudios epidemiológicos regionales han permitido categorizar las zonas citrícolas por inductividad epidémica y niveles de riesgo como base para el manejo del HLB (Mora-Aguilera *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2013). Una novel propuesta es el uso del índice multivariado (IM), el cual se justifica al estudiar integralmente la inductividad y riesgo epidemiológico mediante el empleo de variables de los subsistemas del sistema epidemiológico: planta, enfermedad, vector, manejo y clima (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c; 2013b). Complementariamente, Gottwald *et al.* (2014) también mencionan que la predicción de áreas de riesgo debe incluir factores de riesgo como: susceptibilidad del cultivar, superficie del huerto, edad de plantas, cercanía de foco (distancia con plantas y vectores positivos). Sin embargo, en su estudio el método de estimación es restrictivo dado que carece del uso de un IM, el cual además de tener un sustento estadístico integra de manera racional el sistema epidemiológico magnificando variabilidad regional para la estimación de riesgos epidémicos e impactos productivos.

En México, existen algunos estudios de la aplicación del IM y otros enfoques multivariados para la definición de áreas de riesgo de los patosistemas: *Nacobus aberrans*-Tomate (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014), hongos causantes de marchitez-Fresa (Ceja *et al.*, 2014), riesgo fitosanitario-Papa (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a), *Hemileia vastatrix*-Café, HLB-Cítricos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; 2013b; Flores-Sánchez *et al.*, 2013) y VTC-Cítricos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; 2013; Domínguez-Monge, 2011; Góngora, 2004).

Clásicamente, en países como Brasil, EUA y México se inició el manejo del HLB con tres estrategias complementarias: 1) Erradicación de plantas enfermas; 2) Control regional de

Diaphorina citri (DC), vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal del HLB en México; y 3) Uso de plantas certificadas (Bassanezi *et al.*, 2013b; Mora-Aguilera *et al.*, 2014c; Rogers *et al.*, 2010). La evidencia del éxito de estas acciones es Brasil, ya que a la fecha la región de San Pablo se mantiene con una incidencia menor al 10% (Bassanezi *et al.*, 2013b). Sin embargo, en regiones citrícolas donde el escenario epidémico del HLB ya es endémico, la erradicación es una opción inviable (Belasque *et al.*, 2009) y se requiere enfatizar el control regional del vector y el uso de plantas certificadas, p.e. región Pacífico de México, Florida, EUA. Por otra parte la experiencia de México, sugiere la integración de un cuarto elemento, el manejo agronómico (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012; 2015; Flores-Sánchez *et al.*, 2014; Hernández-Chan *et al.*, 2014). Actualmente, el sector oficial utiliza a nivel nacional la estrategia de Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs) (SENASICA, 2012), la cual tiene un fuerte sustento epidemiológico regional para establecer las áreas de control.

En Paraguay, el Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y Semillas (SENAVE) ha implementado medidas de mitigación, las cuales se basan principalmente en la erradicación de plantas con HLB y control del DC (SENAVE, 2013a). Sin embargo, no existen estudios con enfoque epidemiológico que determinen si la estrategia de erradicación es una opción viable o el umbral de establecimiento de CLas ya superó esta condición. Mora-Aguilera *et al.* (2014c) mencionan que la erradicación debe realizarse en la fase inicial de la epidemia hasta un 20% de incidencia del HLB. Por debajo de este valor o umbral de endemicidad aún predomina inóculo primario mientras que por arriba de él opera principalmente inóculo secundario. Este valor sin embargo es denso-dependiente y puede variar en función de la población de plantas, compactación de zona citrícola e índice de abundancia citrícola (Capítulo II).

Por lo anterior, se propuso al SENAVE un proyecto colaborativo, en el cual se estudiara con enfoque epidemiológico regional, la inductividad del HLB para definir riesgos regionales de dispersión y establecimiento de CLas y con enfoque parcelario para determinar el comportamiento espacio-temporal con fines de manejo y de justificación biológica para el muestreo y monitoreo como estrategia preventiva de la dispersión de esta enfermedad en las regiones citrícolas de Paraguay. Los objetivos del presente estudio fueron:

1. Determinar el estatus epidémico del HLB a nivel regional y parcelario en las zonas cítricas de Paraguay para coadyuvar a la detección oportuna y control regional de *Diaphorina citri*.
2. Determinar el efecto de la erradicación en el proceso epidémico parcelario y el tipo de patrón espacial con fines de manejo del HLB en las regiones cítricas de Paraguay.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Fase de gabinete

Esta etapa consistió en el análisis de datos oficiales de registro del HLB en las regiones citrícolas de Paraguay durante el periodo de febrero 2013, primera detección del HLB en Paraguay, a septiembre de 2013 (SENAVE, 2013a), para obtener insumos que se aplicaran en la selección de sitios para muestreo y evaluación de variables. El análisis exploratorio inicial se basó en los enfoques epidemiológicos 1) *temporal*, con el cual se intentó determinar tasas regionales de dispersión; 2) *Espacial*, el cual permitió conocer preliminarmente la distribución y direccionalidad de la dispersión del HLB en este país, con el propósito de entender el comportamiento de esta enfermedad bajo estas condiciones.

2.2. Fase de campo

Para la fase de campo se contó con el equipo del SENAVE, Ing. Ana Vera e Ing. David Batte. El financiamiento de esta fase fue por el SENAVE, en campo y por CONACYT para la estancia académica. Esta etapa consistió en el uso de metodologías desarrolladas en México para determinar el estatus epidémico del HLB, a partir de la selección regional de huertos con base en criterios de riesgo para la ocurrencia de la enfermedad. El propósito fue realizar un diagnóstico epidemiológico en apoyo a las actividades del SENAVE y por otra parte, validar la aplicabilidad de la metodología previamente aplicada para las condiciones de México. Dicha metodología se describe a continuación:

2.2.1. Muestreo regional

El número de sitios de muestreo a nivel regional se determinó con base en la metodología Reg-N (LANREF, No Publicado), la cual se fundamenta en la estimación de un factor de riesgo integrado por unidad espacial (departamento/estado, distrito/municipio) a partir de un método ponderativo independiente aplicado a n -variables del sistema epidemiológico; esta metodología se empleó en diversos estudios para definir riesgos regionales en otros pato-sistemas (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Mora-Aguilera *et al.*, 2013; Domínguez-Monge, 2011; Góngora, 2004) y se describe ampliamente en esta tesis (ver Cap. VI. 2.3.1.). El cual se describe a continuación:

$$Fact_{riesgo-i} = (Sup_{Citri-i}) * (Ind_{suscep-i}) * (Carga_{clas-i}) * (Ind_{DC-i}) * (Ind_{Trasp-i}) \quad [E.1]$$

En este estudio el factor de riesgo se complementó con las variables: generaciones potenciales (GP) y días favorables (DF) para el desarrollo de *Diaphorina citri* (DC), por lo que se modificó de la siguiente manera:

$$Fact_{riesgo-i} = (Ind_{Citri-i}) * (Ind_{Suscep-i}) * (Carga_{CLas-i}) * (Ind_{DC-i}) * (Ind_{DF}) \quad [E.2]$$

Donde: $Ind_{Citri-i}$, $Ind_{Suscep-i}$, $Carga_{CLas-i}$ Se describe en Capítulo VI [E.8-10];

$$Ind_{DC} = ((T_{med} - 13.5)/211)/MAX(GP) \quad [E.3]$$

Donde: T_{med} = temperatura promedio diaria; 13.5=temperatura base para el desarrollo de DC (Nava *et al.*, 2007); 211=número de grados días desarrollo (GDD) que se requieren para obtener una generación potencial (GP) de DC (Nava *et al.*, 2007); $MAX(GP)$ = valor máximo de GP obtenido en un periodo de tiempo en n -unidades espaciales de interés. GP son las generaciones potenciales de DC que un ambiente dado puede sustentar exclusivamente por consideraciones térmicas.

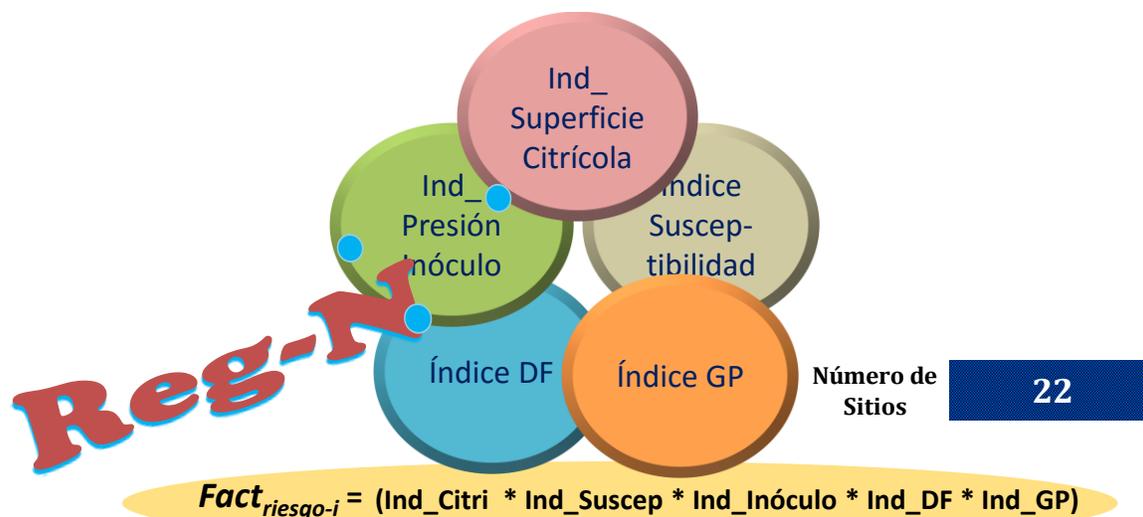
$$Ind_{DF} = (DF/MAX(DF)) \quad [E.4]$$

Donde: DF = días con temperaturas entre 15 a 32°C y con humedad relativa entre 43 y 85%; $MAX(DF)$ = valor máximo de DF obtenido en un periodo de tiempo. DF estima días que permiten la actividad del vector favoreciendo procesos de adquisición y transmisión de la bacteria.

La estimación del número de sitios para cada departamento citrícola de Paraguay se realizó con la siguiente ecuación (Figura 1):

$$Sitios - i = (Fact_{riesgo-i} * \Sigma Fact_{riesgo-i}) * N \quad [E.5]$$

Donde: $Sitios-i$ = unidad espacial de interés p.e. Departamento- x $i=1-n$ Departamento de estudio; $Fact_{riesgo-i}$ = Es el producto de las variables de inductividad epidémica del HLB; N = número de sitios que operativamente son factibles de muestrear o inspeccionar.



Departamento	Citricos_Total	Ind_Citricola	Cercania_Foco	Posit_Veg	Ind_PosVeg	Posit_Psil	Pond_Inóculo	Ind_Suscep	DiasFav	Ind_DF	GenPotencial	Ind_GP	Fact_Riesgo	No. Sitios
ALTO PARANA	1829.12	0.0943	4	56	0.4341	1	5.43	2.7	276.90	0.997	10.75	0.687	0.950	2
CANINDEYU	1082.7	0.0558	4	37	0.0992	1	5.10	1.7	245.28	0.883	11.29	0.721	0.314	1
AMAMBAY	197.85	0.0102	4	2	0.0054	1	5.01	2.0	245.62	0.884	13.77	0.880	0.077	0
CORDILLERA	1035.03	0.0533	4	5	0.0134	2	6.01	2.4	254.75	0.917	13.53	0.865	0.622	2
ITAPUA	6554.68	0.3378	4	129	0.3458	1	5.35	2.8	277.83	1.000	11.03	0.705	3.625	9
CAAZAPA	1632.97	0.0841	4	113	0.3029	2	6.30	2.9	277.36	0.998	10.89	0.696	1.071	3
PARAGUARI	304.52	0.0157	3	0	0.0000	1	4.00	2.9	258.33	0.930	13.19	0.843	0.144	0
MISSIONES	286.38	0.0148	3	0	0.0000	1	4.00	2.8	248.00	0.893	10.99	0.702	0.103	0
SAN PEDRO	5021.63	0.2588	4	0	0.0000	2	6.00	1.1	232.00	0.835	11.90	0.760	1.116	3
CAAGUAZU	838.48	0.0432	4	26	0.0697	1	5.07	1.7	239.16	0.861	11.22	0.717	0.236	1
CENTRAL	63.08	0.0033	3	0	0.0000	1	4.00	3.0	277.50	0.999	15.17	0.969	0.038	0
GUAIRA	108.92	0.0056	4	5	0.0134	1	5.01	2.8	156.00	0.561	5.62	0.359	0.016	0
NEEMBUCU	222.5	0.0115	1	0	0.0000	1	2.00	2.9	262.75	0.946	13.08	0.836	0.053	0
CONCEPCION	228.11	0.0118	3	0	0.0000	1	4.00	2.7	259.25	0.933	15.65	1.000	0.120	0

Figura 1. Interfase MS-Excel para el cálculo del número de sitios de muestreo por Departamento con cítricos cultivados en Paraguay, estimados con base en la metodología Reg-N, la cual se basa en un método ponderativo para estimar un factor de riesgo por cada unidad espacial.

2.2.2. Muestreo parcelario

Con base en los datos de positivos oficiales (SENAVE, 2013a) y acciones de erradicación de plantas se emplearon tres metodologías parcelarias para determinar 1) el efecto de la erradicación en la dispersión del HLB, 2) el tipo de patrón de distribución espacial y 3) la inductividad epidémica del HLB en las regiones cítricas de Paraguay. Estas metodologías se describen a continuación:

2.2.2.1. Método restrictivo a foco simple

Este método se utilizó en huertos con reportes de erradicación de plantas enfermas con HLB en foco simple (una planta infectada por foco) se aplicó para determinar el efecto de erradicación en el proceso de dispersión activa de esta enfermedad y se aplicó en los focos con las siguientes características (Figura 2):

- a. Se identificó el árbol enfermo o erradicado por parte del SENAVE y se consideró como centro de foco.
- b. Se seleccionaron 8 árboles entorno al centro de foco en sentido de las manecillas del reloj.
- c. Se evaluó visualmente la presencia de síntomas característicos del HLB en todos los árboles entorno al foco.

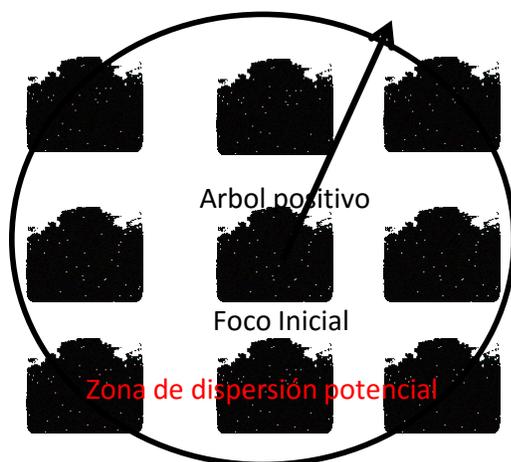


Figura 2. Evaluación de la putativa zona de dispersión activa mediante un censo restrictivo en foco simple. Fuente: Domínguez-Monge, 2011.

2.2.3. Método en censo

Este método se aplicó en dos huertos con antecedentes de inspección mediante censo (evaluación de todas las plantas del huerto) por parte del SENAVE y en los cuales se llevó a cabo erradicación de las plantas enfermas con HLB. Este método se basa en el supuesto de un proceso epidémico de mayor intensidad (más de una planta infectada o foco múltiple) y tiene como propósito determinar el efecto de erradicación y el tipo de patrón de distribución de esta enfermedad a nivel parcelario.

En el caso del muestreo en censo se realizó un análisis espacial para determinar la distribución y el tipo de patrón con el método estadístico de Morisita y Lloyd, con base en el tamaño óptimo de cuadrante estimado por el método de Greig-Smith a través del programa de Excel MorLloyd ver. 1.0 (Rivas-Valencia, *et al.*, 2010), previamente aplicado para estudios de efectos de la erradicación de plantas enfermas con el virus tristeza de los cítricos (CTV) en cítricos (Góngora, 2011) o en Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC)

para determinar áreas de erradicación (Pérez-Hernández *et al.*, 2014; Mora-Aguilera y Escamilla-Bencomo, 1991).

2.2.4. Método “T”

Este método parte del supuesto diferencial de ausencia del HLB y se empleó en 22 huertos seleccionados en los distintos departamentos para determinar el riesgo de dispersión y establecimiento del HLB en las regiones citrícolas de Paraguay. El método se basa en el efecto borde que se reportó ampliamente en la literatura, p.e. en Brasil, Florida (Gottwald *et al.*, 2008; Bassanezi *et al.*, 2005), y en México en Colima (Robles-González *et al.*, 2013) y Nayarit (Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011), pero también en efectos aleatorios dentro de parcela según se mostró previamente (SENASICA, 2008. Datos no publicados) (Figura 3); el cual tiene como justificación la infestación de vectores provenientes de fuente de inóculo externo que podrían inducir infecciones en estos árboles periféricos de los huertos citrícolas. Este muestreo consiste en seleccionar 20 plantas intercaladas 1 cada 3 (puede ampliarse según extensiones de huertos), mediante un recorrido transectual en “T” (Figura 3). Este es un método sistemático y de gran practicidad ampliamente usado en la Vigilancia Fitosanitaria. Se requiere seleccionar 10 plantas del borde del huerto y en la planta 5 y 6 seleccionar 5 plantas hacia el interior del huerto y retornar sobre el surco inmediato para seleccionar otras 5 plantas. El muestreo en “T”, tuvo como fin conocer el estatus epidemiológico fuera de la zona de dispersión activa del HLB asintomático.

El muestreo en “T” se aplicó en todos los huertos con la evaluación de variables de la planta (portainjerto, edad, vigor, brotación y productividad), de la enfermedad (incidencia y severidad), y del manejo (tipo de riego, número de plagas y nivel de tecnificación de los huertos). Los valores promedio por huerto se emplearon para generar la matriz multivariada que daría origen al índice multivariado previamente descrito.



Figura 3. Sistema de muestreo “T” para evaluar efecto de borde. Notar que se seleccionan 20 plantas en total, las cuales se intercalan 1 cada 3, seguir línea de muestreo.

2.3. Variables evaluadas

Las variables de evaluación se seleccionaron con el fin de determinar el estatus e inductividad epidémica del HLB a nivel parcelario y regional en Paraguay. Estas variables se evaluaron a nivel de planta con el propósito de estimar de manera indirecta el nivel de tecnificación de los huertos (nutrición, riego, manejo de plagas y enfermedades, etc) con base en una escala de 0 a 4, según la variable, excepto brotación y severidad que tuvieron su propio sistema de medición (Cuadro 1).

Cuadro 1. Escala nominal para la evaluación de las variables del sistema epidemiológico en los 22 huertos de estudio en las regiones cítricas de Paraguay durante noviembre, 2013.

Clases	Vigor	Edad (años)	Productividad	No. Plagas	Brotación ^b	Incidencia	Severidad (%) ^a
0	Muerto	2-4	Sin Producción	Sin plagas	Número de brotes del reciente periodo de brotación	Sin HLB	Sin HLB
1	Malo	4-8	Bajo	1-3		Con HLB	25
2	Bueno	8-10	Medio	4-8		50	
3	Muy Bueno	>10	Alto	>8		75	
4	Excelente					100	

^aPorcentaje de copa con síntomas de HLB (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). ^{a y b}Variables que tuvieron su propio sistema de medición directa.

2.4. Análisis de datos

2.4.1. Fase preliminar

El enfoque *temporal*, consistió en el análisis de la incidencia del HLB y tiempos de detección por Departamento con producción de cítricos, estos datos se ajustaron al modelo flexible Weibull con base en la siguiente ecuación de dos parámetros:

$$y = 1 - EXP\left(\frac{t}{b}\right)^c \quad [E.6]$$

Donde: y = incidencia de plantas positivas a HLB, t = tiempo, b = parámetro de tasa en su forma inversa y c =parámetro de forma de la curva.

La incidencia del HLB por huerto se calculó con la siguiente ecuación:

$$Inc = (n * 100)/N \quad [E.7]$$

Donde: Inc: es el porcentaje de incidencia del HLB a nivel de huerto; n : es el número de plantas con HLB; N : es el número total de plantas evaluadas.

En el enfoque *espacial* se generaron mapas de incidencia del HLB por fecha de muestreo para todo el país, con el fin de tener una proyección del estatus del HLB con datos del SENA y para obtener insumos para la selección de los huertos de estudio y tener un escenario comparativo con datos de campo obtenidos mediante el muestreo regional previamente indicado.

2.4.2. Fase de campo

Consistió en dos enfoques: *regional* y *parcelario*. En el enfoque regional se estimó un índice multivariado (IM) mediante componentes principales (Proc Princomp) y análisis de factores (Proc Fact), a partir de una matriz multivariada de valores promedio por huerto (Cuadro 2) (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). El IM se seleccionó adecuado cuando la varianza total y explicada fue mayor o igual al 70%, en dos o tres componentes principales, la ecuación empleada fue:

$$Indice_{Multi} = (nCp) + (P_{1-n})(Var-i) \lambda_i \quad [E.8]$$

Dónde: $n-C_p$ = Número de componentes principales con una varianza acumulada $\geq 70\%$; P_i = n -parámetros asociados al eigenvector- i ; λ_i = Eigenvalue asociado al eigenvector- i . Var_i = Variables seleccionadas a la unidad espacial- i .

Cuadro 2. Matriz multivariada de 22 huertos seleccionados considerando variables de los subsistemas del sistema epidemiológico evaluadas en 20 plantas por huerto.

DEPTO	DISTRIT	EDAD	ESP	PATR	VIG	PROD	DPLA	MAGR	MFIT	NBROT	NPLAG	INC	SEV
Itapúa	CALopez	2	1	1	2	2	2	3	1	5	1	0	0
Itapúa	CALopez	2	1	1	2	2	2	3	1	4	1	15	1
Itapúa	MOtaño	2	3	1	1	1	2	3	1	4	1	0	0
Itapúa	CALopez	2	1	1	2	1	4	3	1	5	1	0	0
Itapúa	AVera	2	1	1	2	2	2	3	1	5	1	51	21
Itapúa	AVera	2	1	1	2	1	4	3	1	4	1	0	0
Itapúa	Fram	2	1	1	2	1	3	2	1	6	1	0	0
Itapúa	SPParaná	2	2	1	2	2	4	3	3	5	1	27	11
Itapúa	SD	2	3	1	2	2	2	1	1	6	1	0	0
Itapúa	CBogado	2	1	1	1	1	3	2	1	10	1	0	0
Itapúa	CBogado	2	2	1	2	1	3	3	1	5	2	0	0
Itapúa	SD	2	1	1	1	0	2	3	1	6	1	0	0
Boqueron	Filadelf	1	3	1	2	0	1	3	1	2	1	0	0
Boqueron	LPlata	1	2	1	2	1	1	3	1	2	1	0	0
Caazapá	Bertoni	2	1	1	2	0	3	1	1	7	2	0	0
Caazapá	GMoranigo	2	1	1	2	1	3	3	3	9	2	0	0
Caazapá	SD	2	1	1	2	1	2	3	1	13	1	0	0
Caazapá	BVista	2	1	1	2	2	3	2	1	8	2	20	10
Caazapá	Tavai	2	1	1	2	1	3	2	1	9	1	19	13
A.Paraná	Mbaracayu	2	1	1	1	0	2	2	1	17	1	10	5
Cordille	Caraguat	2	4	1	2	2	1	3	3	14	1	63	23
Cordille	Caraguat	2	4	1	2	1	1	3	3	6	1	0	0

Todos las variables representan el valor promedio por huerto. **Edad (años):** 1=16-30, 2=1-15; **Esp:** Especie, 1= naranja, 2=toronja, 3=mandarina, 4=limón; **Patr:** patrón, 1=limón rugoso; **Vig:** vigor, 1=malo, 2=bueno; **Prod:** productividad, 1=baja, 2=moderada; **Dplan:** densidad de plantación (m^2) 1=50-64, 2=36-49, 3=32-48, 4=9-31; **Magr:** manejo agrónomo, 1= tecnificado, 2= moderado, 3= tradicional; **Mfit:** manejo fitosanitario, 1= químico, 2= biológico, 3= ninguno; **Nbrot:** número de brotes tiernos; **Nplag:** número de plagas, 1=1-3, 2=4-8; **Inc:** incidencia=($n*100$)/ N ; Donde: n : es el número de plantas con HLB; N : es el número total de plantas evaluadas (20 plantas); **Sev:** severidad; SD: Sin datos.

A partir del IM por Departamento se generó un mapa interpolado de Paraguay mediante la herramienta ARCGIS® V10.0, el cual determinó el riesgo de dispersión y condición epidémica del HLB en este país.

El enfoque parcelario tuvo como fin proporcionar bases para establecer criterios de manejo y coadyuvar a justificar que las acciones de mitigación y control regional de *D. citri* ejecutadas por organismos oficiales.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Fase de gabinete

3.1.1. Análisis temporal

La incidencia de Departamentos con HLB en Paraguay hasta septiembre 2013 fue del 57% y con distribución en ocho de 14 departamentos, de los cuales Itapúa, Caazapá y Alto Paraná presentaron las mayores incidencias con 53, 64 y 41%; respectivamente, y con presencia de nuevos positivos durante el periodo de febrero a septiembre 2013; lo cual sugiere un proceso de dispersión activa del HLB. Sin embargo, las tasas temporales (b) obtenidas a nivel país $b_{Paraguay}=0.004$ y a nivel departamento: $b_{Itapua}=0.004$, $b_{Caazapá}=0.005$, y $b_{AParaná}=0.003$, considerando ocurrencia de HLB y número de positivos por Departamento (Figura 4), sugieren que el proceso epidémico en esta región es de menor intensidad en comparación con la epidemia del HLB en algunas entidades de México como: Colima, Nayarit y Yucatán en donde las tasas fueron de $b=0.093$, 0.067 y 0.018 , respectivamente (ver Cap. VI 2.2.). Las formas de curva en general corresponde con las encontradas en México por efecto principal de inóculo primario (Figura 4A y 4B). Adicionalmente, las curvas muestran el posible efecto de la erradicación con fases estacionales en la curva, particularmente en Alto Paraná (Figura 4C y 4D).

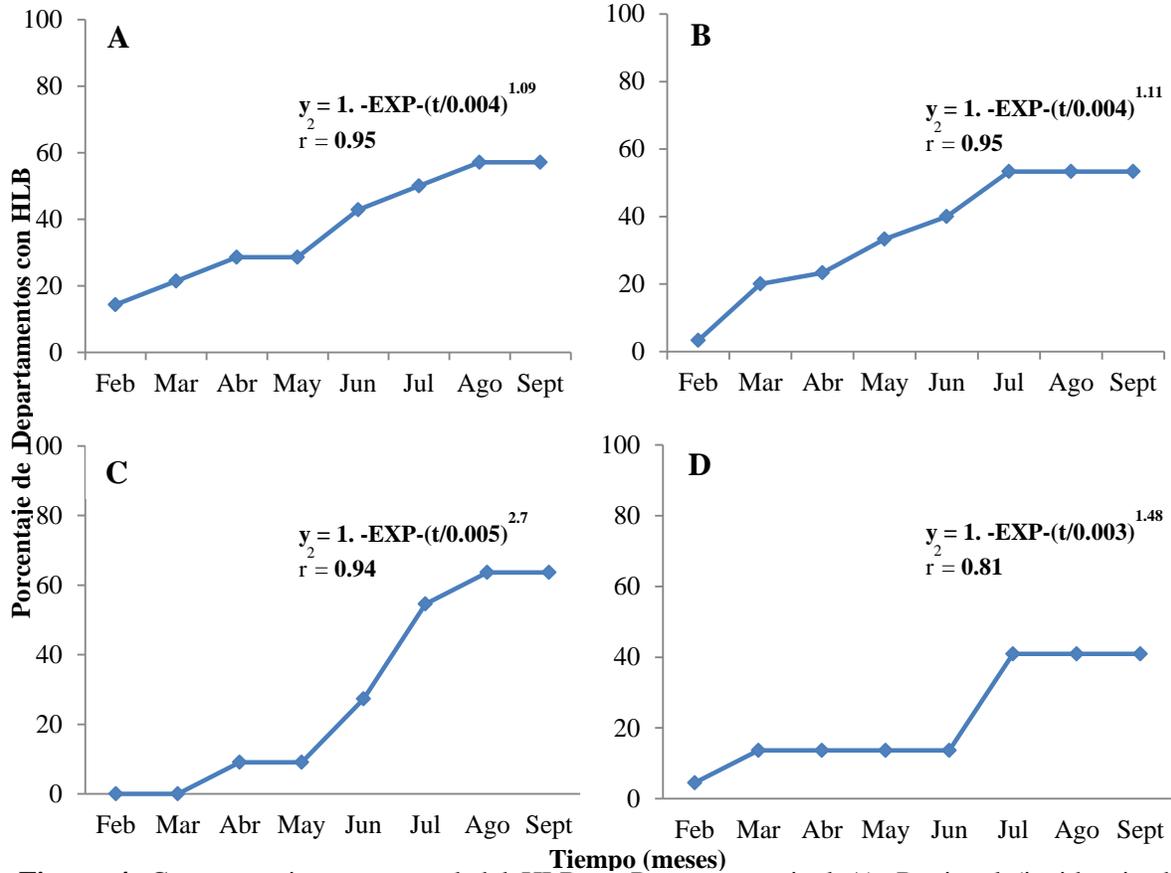


Figura 4. Comportamiento temporal del HLB en Paraguay a nivel A): Regional (incidencia del HLB en Departamentos con producción de cítricos) y a nivel subregional (incidencia del HLB en distritos cítricos) en: B) Itapúa, C) Caazapá, y D) Alto Paraná. Análisis con datos oficiales del SENAVE, 2013a.

3.1.2. Análisis espacial

La distribución del HLB en ocho de los 14 departamentos cítricos de Paraguay y en 32 de 63 municipios de los Departamentos con producción de cítricos de mayor importancia: Itapúa, Caazapá y Alto Paraná a septiembre de 2013, sugiere una fase de dispersión activa y establecimiento de este patógeno en Paraguay, a partir de su detección en febrero 2013.

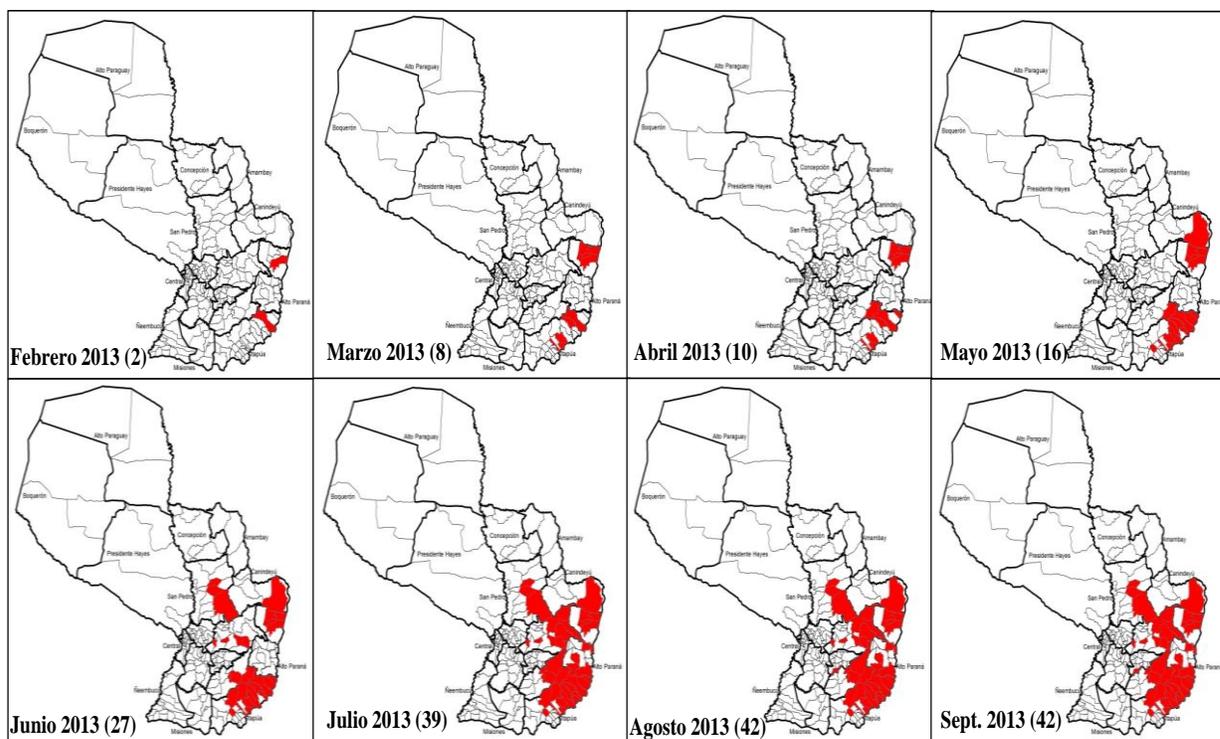


Figura 5. Ocurriencia y distribución del HLB por fecha de detección durante el periodo de febrero (primera detección) a septiembre 2013. Análisis con datos del SENAVE, 2013a.

Los datos oficiales muestran una tendencia similar a otros países en cuanto a la velocidad de dispersión y ocurrencia a nivel departamento y municipios cuando existen condiciones ambientales y agronómicas favorables como el caso de San Pablo, Brasil, Florida, E.U.A. y Colima, México. En estos casos la tasa de dispersión espacial mensual fue 12.5, 34 y 12.6, respectivamente. En Paraguay fue de 10.5. El análisis temporal y espacial indica que el HLB se encuentra en un proceso epidémico inicial, el cual a pesar de presentar tasas epidémicas bajas está presente en ocho departamentos con una incidencia del 57% a nivel país. Esta condición se contrastó con datos de campo mediante el muestreo regional del estatus epidémico del HLB ya que la estimación el riesgo de dispersión y establecimiento de CLas requiere la integración de modelos espacio-temporales en el contexto del sistema productivo citrícola y un enfoque que considere que la dispersión y el incremento de la incidencia del HLB de manera gradual, no lineal, y con una tasa dependiente de factores climáticos, varietales, manejo productivo y biológicos (asociados al vector *Diaphorina citri* y CLas) (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c; Mora-Aguilera *et al.*, 2013; Bassanezi *et al.*, 2013b; Salcedo *et al.*, 2010).

3.2. Fase de campo

3.2.1. Análisis regional

En total se evaluaron 22 huertos distribuidos en los cinco principales Departamentos con producción citrícola de Paraguay: Itapúa, Caazapá, Alto Paraná, Coordillera y Boqueron, los cuales representan el 57% de la superficie citrícola de este país (SENAVE, 2013a). Durante el mes de noviembre, periodo que representa en esta latitud el fin de la primavera y alta brotación vegetativa. Esto es similar a Brasil donde esta fase fenológica se produce a mediados de primavera y hasta finales del verano (Septiembre-Marzo), con énfasis en septiembre-Diciembre. En este periodo se aumenta la frecuencia de los monitoreos de *D. citri*, especialmente en las huertas y regiones con mayor incidencia de HLB (Beloti *et al.*, 2013; Yamamoto y Miranda, 2009) (Figura 4).

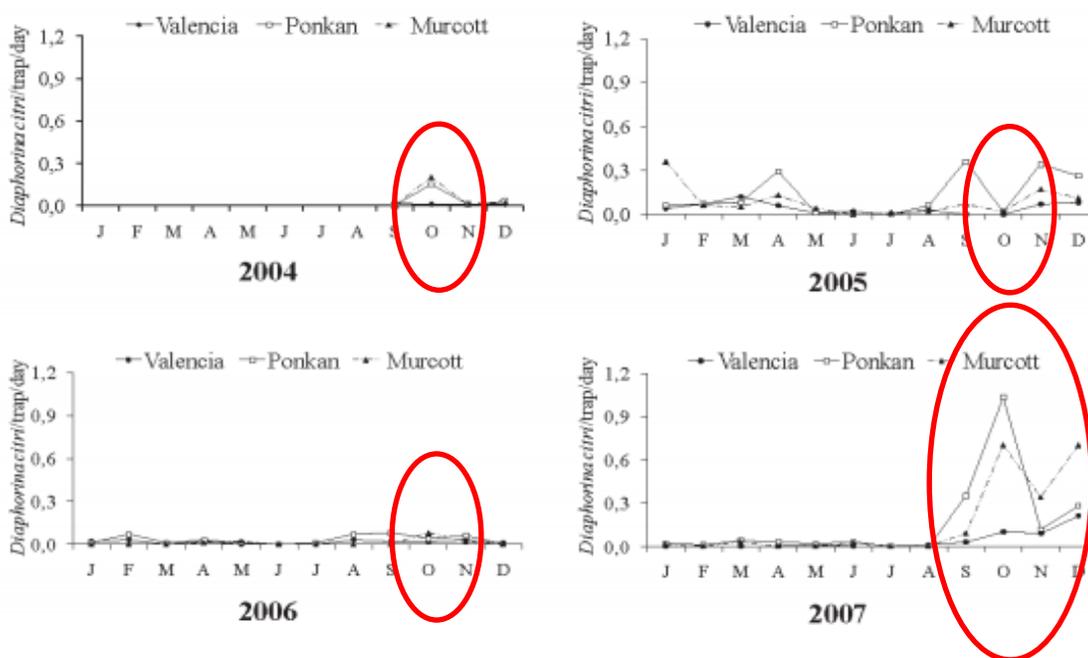


Figura 6. Promedio de adultos de *D. citri* capturados en trampas amarillas en huertas de naranja Valencia, mandarina `Ponkan` y Tangor `Murcott` en Taquaritinga, SP, Brasil. Fuente: Beloti *et al.* 2013.

El muestreo regional permitió identificar que la condición citrícola de Paraguay es de pequeños productores con huertos en promedio de 5 ha, principalmente de naranja dulce (*Citrus sinensis*), el cual representa el 48% de la superficie sembrada en el país, naranja agrio (*Citrus aurantium*) con 36%, mandarina (*Citrus reticulata*) 9%, toronjo (*Citrus paradisi*) 5% y lima tahiti (*Citrus latifolia*) 2%. En total Paraguay registra 19,405 ha.

Complementariamente, este muestreo incluyó algunos huertos de la región de Itapúa en donde existen empresas que industrializan jugo con predios de un tamaño promedio de 50 ha, las cuales concentran la producción, principalmente de naranja dulce.

Adicionalmente, se muestrearon huertos de naranjo agrio, los cuales aparentemente no representan un riesgo directo en producción de fruta por efecto del HLB, debido a que el órgano cosechado de este cultivo es el follaje, el cual se usa para extracción de aceites en periodos de 6 a 8 meses. Si bien este tiempo cumple con el periodo de incubación de la bacteria, para la aparición de síntomas del HLB, en condiciones de campo y con transmisión por vectores (Aubert, 1987). La fuente de inóculo primario se eliminaría constantemente debido a las cosechas periódicas del tejido foliar; sin embargo, como medida preventiva se recomienda el monitoreo de *Diaphorina citri* con énfasis en población infectiva, para establecer áreas de control regional de este vector.

En México, estudios en condiciones controladas sugieren que el naranjo agrio, como portainjerto, permite la multiplicación de la bacteria, no así la expresión de síntomas en naranja dulce (Mora-Aguilera et al., 2014. Proyecto Asintomáticos SENASICA-COLPOS). El principal factor por el que la producción se industrializa es debido a que en el país están presentes la mayoría de plagas cuarentenarias de los cítricos como lo son: cancro de los cítricos (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) (Figura 2A y 2B), Leprosis de los cítricos (Citrus leprosis virus) (Figura 2C y 2D), pulgón café (*Toxoptera citricida*) (Figura 2E) y mancha negra (*Guignardia citricarpa*) (Figura 2F), por lo que normativamente es imposible exportar fruta fresca (SENAVE, 2013b).



Figura 7. Plagas cuarentenarias de los cítricos: A y B) Cancro cítrico, C y D) Leprosis de los cítricos, E) Pulgón café y F) Mancha negra, presentes en las regiones cítricas de Paraguay, evaluadas en el muestreo regional del HLB durante noviembre, 2013.

En cuanto a la presencia de HLB, solo siete de los 22 huertos bajo estudio tuvieron presencia de esta enfermedad con mayor ocurrencia en Itapúa y predominancia en naranja dulce; esta condición es congruente con la hipótesis de que el incremento de la incidencia del HLB presenta fases dependientes de inóculo primario (curvas monomoleculares-regionales) y de inóculo secundario (curvas sigmoidales), por lo que se lleva a cabo de manera gradual, no lineal o exponencial (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c; 2013). A pesar de que la incidencia a nivel país fue del 57%, el proceso epidémico a nivel de departamentos y municipios se encuentra en una fase inicial, es decir la invasividad tiene un efecto regionalmente amplio pero la reinfección parcelaria requiere n -ciclos de generación de DC para constituir la epidemia a nivel parcelario por efecto de vector migrante e inóculo primario. Esto se comprobó con datos de campo de 22 huertos en donde se obtuvo una incidencia promedio del HLB del 9.3% (± 21.1) con una severidad promedio del 3.8% (± 8.4); este resultado se considera robusto y confiable debido a que los huertos de estudio se distribuyeron en los cinco principales departamentos cítricos y con base en criterios de riesgo. Complementariamente, la presencia de adultos de *D. citri* se encontró restrictiva a

los departamentos de Itapúa (5 adultos) y Caazapá (48 adultos) sugiriendo procesos de reinfección potencialmente bajos. Los mapas de detecciones oficiales fueron congruentes con la historicidad de ocurrencia de plantas enfermas, esto significa que la mayor incidencia parcelaria se encontró en los departamentos con presencia inicial del HLB en Paraguay.

Por lo anterior, el comportamiento del HLB en Paraguay se considera de baja intensidad epidémica, esto en referencia a otras regiones cítricas que presentaron epidemias de esta enfermedad como Colima, México, donde en el mismo periodo de tiempo (7 meses) se observó una incidencia regional del 57% y en 25 meses el 100% de la superficie cítrica tuvo presencia del HLB (Robles-González *et al.*, 2013; SENASICA, 2015). En este caso, sin embargo, la especie predominante es limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), la especie cítrica más vulnerable hasta el presente para las condiciones de México (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Capítulo III).

El uso de un índice multivariado (IM) en estudios epidemiológicos regionales se justifica debido a que integra la inductividad y riesgo epidemiológico al emplear variables de los subsistemas del sistema epidemiológico: planta, enfermedad, vector, manejo y clima (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c). Complementariamente, Gottwald *et al.* (2014) también mencionan que la predicción de áreas de riesgo debe incluir factores de riesgo como: susceptibilidad del cultivar, superficie del huerto, edad de plantas, cercanía de foco (distancia con plantas y vectores positivos); sin embargo, en su estudio el método de estimación es restrictivo en comparación con un IM, el cual tiene solides estadística.

En México, existen algunos estudios de la aplicación del IM para la definición de áreas de riesgo como lo son los patosistemas: *Nacobus aberrans*-Tomate (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014), hongos causantes de marchitez-Fresa (Ceja *et al.*, 2014), riesgo fitosanitario-Papa (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a), *Hemileia vastatrix*-Café, HLB-Cítricos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2013) y VTC-Cítricos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; 2013; Domínguez-Monge, 2011; Góngora, 2004).

En Paraguay, el índice multivariado (IM) mostró un gradiente de intensidad de la región de Itapúa y Caazapá (IM=0.00031 y 0.00021, respectivamente), Departamentos donde se detectaron los primeros positivos de esta enfermedad (SENAVE, 2013a), hacia la región del Chaco Paraguayo, en el departamento Boquerón (IM=0.0002) (Figura 3), lo cual

sugiere que el riesgo de establecimiento y dispersión del HLB será mayor en Itapúa y Caazapá. Aunque, se requieren acciones preventivas en todas las regiones cítricas de este país. Estos resultados permiten ponderar acciones operativas oficiales ante eventual restricción de recursos financieros y humanos.

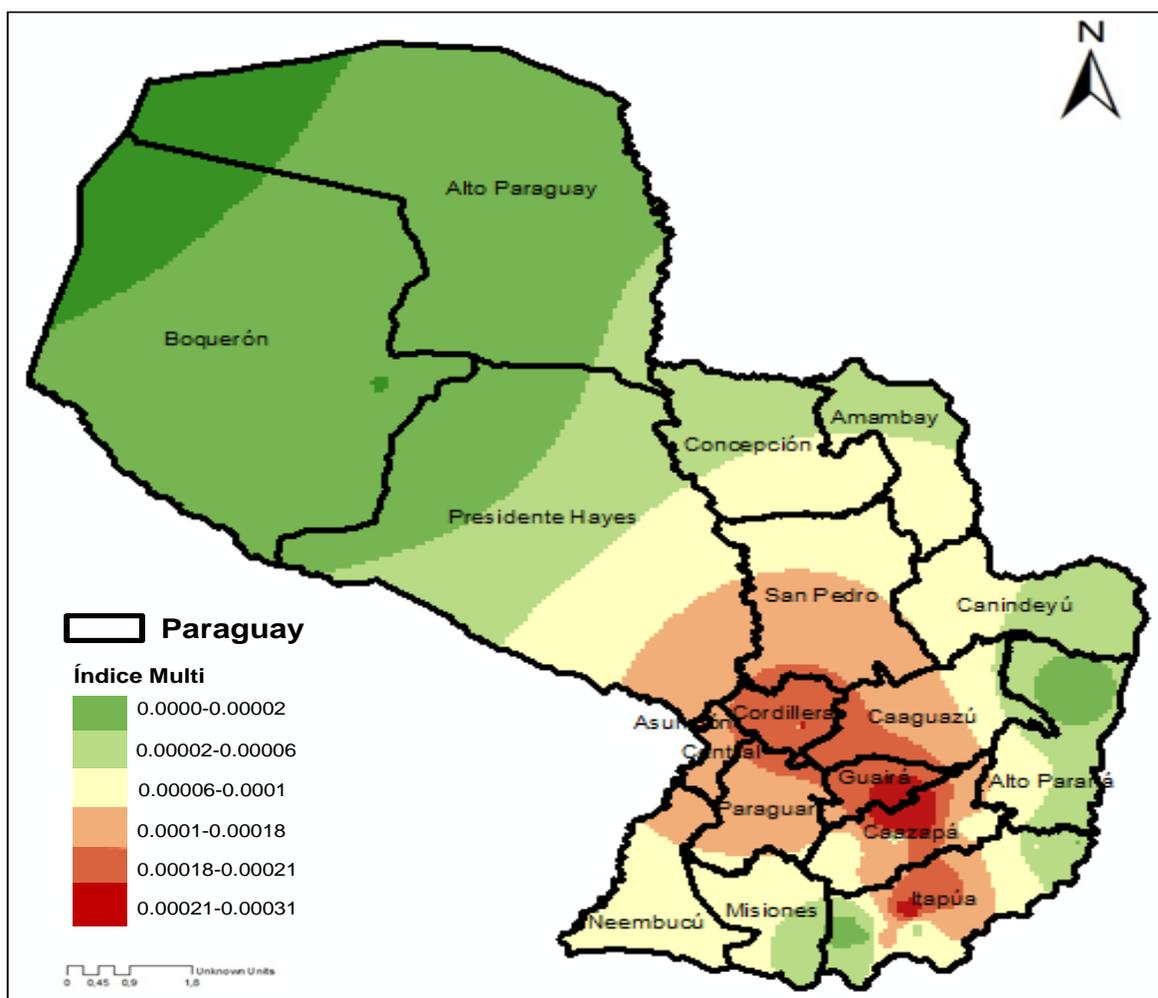


Figura 8. Mapa interpolado del índice multivariado estimado con el análisis de componentes principales y factores a partir de variables del sistema epidemiológico.

Por lo tanto, esta información tiene gran relevancia y potencial de uso en un esquema de priorización de recursos en Paraguay, el cual tendría que enfatizar la región de Itapúa y Caazapá (4,000 ha) con acciones de erradicación de plantas con HLB (inóculo primario) y control de *D. citri* (DC) (inóculo secundario) (Mora-Aguilera et al., 2014c; SENASICA, 2012; Belasque et al., 2009; Bassanezi et al., 2013a), con el fin de reducir el riesgo de dispersión y establecimiento en las regiones cítricas colindantes como Cordillera y San Pedro. Adicionalmente, se puede establecer una zona de monitoreo intensivo en la

proximidad de Alto Paraná y Boquerón. En relación al concepto de ARCOs (SENASICA, 2012), otra opción es la definición de al menos dos ARCOs regionales de manejo: Itapúa-Caazapa y Alto Paraná. Las empresas que concentran la producción cítrica en Itapúa y Caazapá podrían tener un rol importante en impulsar estrategias de manejo regional al contar con un gran número de productores agremiados a los que podrían incentivar para el control de DC, como la que actualmente se emplea o sugiere en Brasil, Florida y México (Bassanezi *et al.*, 2013b; Gottwald *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2010; Mora-Aguilera *et al.*, 2013a; Robles, 2012). De estos países, México es el único que coordina un esfuerzo nacional articulando ARCOs con comités técnico-científicos para la definición y validación de productos, dosis y épocas de aplicación, producción y liberación de organismos de control biológico, y erradicación de áreas de detección de insectos o plantas positivas a CLas. La entidad que coordina estas acciones es el SENASICA, una similar al SENA VE en Paraguay (SENASICA, 2010, 2012).

3.2.2. Análisis parcelario

Mediante el muestreo parcelario se identificaron siete de 22 huertos con presencia de plantas con síntomas característicos del HLB (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características de los siete huertos con presencia del HLB evaluados para determinar el efecto de la erradicación y el tipo de patrón espacial en Paraguay.

Departamento	Distrito	Especie	Edad	Dens. Plant.	Tipo de muestreo ^a	Plantas evaluadas	Incidencia del HLB (%)
Itapúa	C. A. Lopez	Naranja	10	6X8	FS	20	15
Itapúa	Alto Vera	Pomelo y Naranja	7	7X7	FS	49	51
Itapúa	S. P del Paraná	Pomelo	8	4X5	Censo	100	27
Caazapá	Buena Vista	Naranja	8	7X5	Censo	100	20
Caazapá	Tavai	Naranja	15	7X5	FS	15	19
Alto Paraná	Mbaracayu	Naranja	6	8X6	FS	20	10
Cordillera	Caragatay	Limón	8	8X8	FS	35	63

^aFS= Foco simple, evaluación de 8 plantas en torno al foco de infección en el sentido de las manecillas del reloj.

En todos los huertos se encontraron plantas con HLB adicionales a las reportadas y erradicadas por el SENAVE; sin embargo se evidencia un efecto positivo de la erradicación al reducir la intensidad epidémica del HLB; si bien existe dispersión activa esta es de baja intensidad, esto con base en la incidencia y severidad obtenida en los siete huertos, los cuales fueron en promedio de 29.2% (± 19.9) y 12% (± 7.9), respectivamente, en 9 meses del proceso epidémico. Este porcentaje de incidencia es denso-dependiente, lo que implica que depende de la superficie de los huertos. En el caso del huerto de Cordillera la susceptibilidad de la especie (limón tahiti) podría ser un factor que potencializa el proceso epidémico por brotación y atractabilidad de *D. citri* (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013; Beloti *et al.*, 2013), por lo que la erradicación debe mantenerse como base del manejo del HLB en complemento del control regional del vector. La erradicación sin embargo debe detenerse cuando se observe el umbral de endemicidad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c). Los resultados confirman que la disponibilidad del inóculo, actividad del vector y especie citrícola tienen implicación en el comportamiento temporal (velocidad epidémica) y espacial (distancia de dispersión) de la epidemia (Figura 2) y determina los umbrales bajo los cuales se podría actuar sobre el inóculo primario, predominantemente través de erradicación, y sobre el inóculo secundario a través del control del vector (Belasque *et al.*, 2009; Mora-Aguilera *et al.*, 2014c). Este último aspecto es importante para evitar o retrasar el contagio y establecimiento del patógeno al afectar los procesos de enfermedad y dispersión.

Comparativamente en México, huertos en áreas altamente inductivas y con limón mexicano con HLB mostraron incidencias de 47.2% (± 22.6) en procesos epidémicos de 6 a 10 meses; sin embargo la población estudiada fue mucho mayor a la de los huertos de Paraguay con 1 a 10 ha (400-4000 plantas) por lo que no necesariamente es una comparación deseable. Por otro lado, existen regiones con presencia de naranja dulce muy importantes (p.e. Veracruz > 200,000 ha) donde la enfermedad está a nivel de focos aislados o en condición de baja prevalencia como en la Península de Yucatán, región donde CLas se detectó en 2009 (Capítulo II). La intensidad epidémica del HLB en Paraguay podría ser mayor y evidencia el éxito de la erradicación de plantas, las cuales se demuestran con las curvas del comportamiento temporal en fases estacionales, particularmente en Alto Paraná (Figura 4C y 4D). La erradicación es una estrategia de control que funciona en procesos

epidémicos iniciales hasta el umbral de endemicidad, lo cual también se mencionó para las condiciones de Brasil, donde las incidencias en algunas regiones se mantienen por debajo del 10%, con base en erradicación de plantas y control regional de *D. citri* (Bassanezi *et al.*, 2013b).

Complementariamente, en dos de los siete huertos de estudio se realizó una comparación del incremento de la incidencia del HLB, con datos de un censo preliminar realizado por el SENAVE en junio 2013 y de la evaluación de la presente investigación en noviembre 2013 (Cuadro 4); a pesar de no ser un análisis formal por ausencia de datos esta comparación sugiere que la tasa de infección (*b*) es baja considerando que ambos huertos tienen una población de 100 plantas (0.25 ha) y que la incidencia aumentó 13%. Esquivel-Chávez (2011) reportó que en Nayarit, México, el incremento de la incidencia, en el mismo periodo de tiempo (cinco meses) fue de 15 a 34, de 7 a 85 y de 11 a 18 (porcentaje de incidencia), en huertos con alto, bajo y moderado manejo agronómico.

Cuadro 4. Incidencia temporal restrictiva a un área de 1 ha en dos huertos de San Pedro del Paraná en Itapúa y Buena Vista, Caazapá, Paraguay.

Huertos	Fecha de evaluación			
	Junio 2013		Noviembre 2013	
	Positivos ^a	Incidencia HLB ^b	Positivos	Incidencia HLB
S. P. Paraná, Itapúa	14	14	27	27
Buena Vista, Caazapá	7	7	20	20

^aÁrboles con síntomas de HLB observados durante cada fecha de evaluación; ^bPorcentaje de incidencia del HLB.

El observar una tasa de infección, a nivel parcelario, menor a las encontradas a nivel regional y subregional ($b=0.003-0.005$) es congruente con lo que se reporta para un proceso epidémico integral, en el cual la intensidad epidémica del HLB es variable, gradual y no lineal según susceptibilidad de especies cítricas prevalentes, compactación cítrica y principalmente a la carga de inóculo en la región (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c).

Adicionalmente, el análisis espacial de la distribución de plantas enfermas con HLB en estos huertos indicó una condición agregada en torno al foco de infección, con índices de dispersión de Morisita y Lloyd entre 1.5 a 1.6 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Patrón espacial del HLB determinado mediante los índices de dispersión de Morisita y Lloyd de dos huertos con antecedentes de erradicación en los Departamentos de mayor intensidad epidémica del HLB: Itapúa y Caazapá, Paraguay, con datos de la evaluación realizada en la presente investigación en noviembre, 2013.

Departamento	Municipio	^a Fecha	^b TOC	Índices de dispersión		Tipo de patrón
				Morisita	Lloyd	
Itapúa	S. P. Paraná, Itapúa	2	4	1.60	1.63	Agregado
Caazapá	Buena Vista, Caazapá	2	4	1.50	1.52	Agregado

^aMuestreo realizado en noviembre de 2013. ^bTamaño Óptimo de Cuadrante.

En apoyo al tipo de patrón espacial, se generaron mapas parcelarios para visualizar la distribución de las plantas con HLB, con lo cual interesantemente se observó que en complemento de la agregación también existe un efecto de borde, el cual se observó con mayor intensidad en el huerto de Buena Vista en Caazapá, posiblemente por deberse a un proceso epidémico de menor tiempo que el que ocurrió en el huerto de San Pedro Paraná en Itapúa (Figura 4), según datos de incidencia (Cuadro 3).

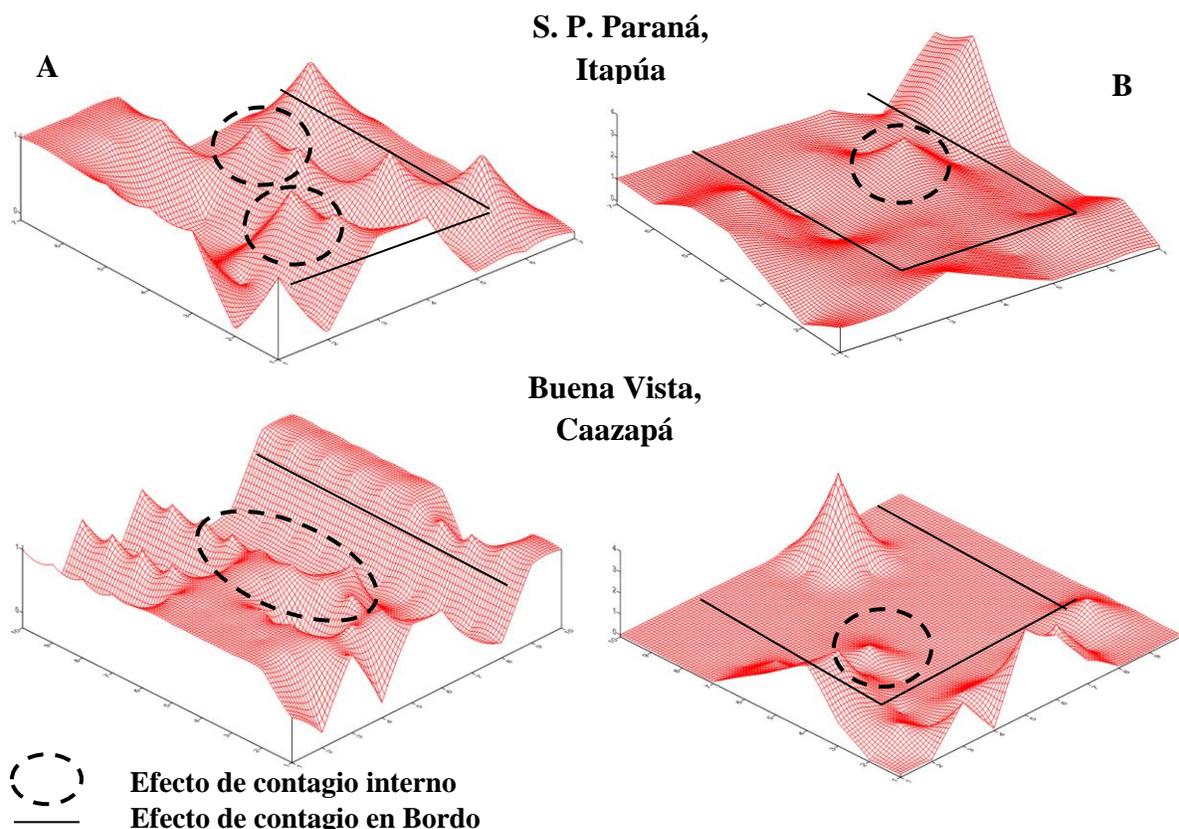


Figura 9. Mapas geoestadísticos de A) incidencia (presencia/ausencia) y B) severidad del HLB en los huertos S. P. Paraná en Itapúa y Buena Vista en Caazapá, Paraguay; evaluado durante noviembre de 2013.

Este resultado debe enfatizarse ya que la literatura reporta ampliamente efectos de bordo (Gottwald *et al.*, 2008; Bassanezi *et al.*, 2005). Esto es válido para una citricultura extensiva con predio de cientos a miles de hectáreas, pero en predios pequeños <10 ha como en Paraguay y México, claramente se ha observado efecto de bordo en adición a efectos internos. Por lo anterior, recomendaciones de muestreos de vectores a nivel de bordo o aplicaciones químicas dirigidas a la periferia deben ser reconsideradas para una citricultura no extensiva (Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011; SENASICA, 2008. Datos no publicados)

Con fines de prevención y detección del HLB el muestreo en “T” puede aplicarse en regiones como San Pedro, Canindeyú, Amambay y Boquerón, con precisión y optimizar recursos humanos y económicos en un contexto de emergencia nacional para evitar la dispersión del HLB a nivel Paraguay. Por otro lado, de detección en vector puede mejorar la erradicación (SENASICA, 2012).

4. CONCLUSIONES

A nueve meses de la detección de *Candidatus Liberibacter* spp. en Paraguay y con base en el diagnóstico de campo conducido en la presente investigación, en complemento de las detecciones históricas del HLB por parte del SENAVE, se considera que el estatus epidémico del HLB en Paraguay es de baja intensidad con un gradiente de la región de Itapúa y Caazapá (IM=0.00031 y 0.00021, respectivamente), hacia la región de Boquerón (IM=0.0002), lo cual sugiere que el riesgo de establecimiento y dispersión del HLB será mayor en Itapúa y Caazapá. Sin embargo, se requieren acciones preventivas en todas las regiones cítrícolas de este país. En el muestreo regional se detectó la presencia del HLB en 7 de 22 huertos evaluados, lo cual implica una incidencia de huertos promedio del 9.3% (± 21.1) y severidad promedio del 3.8% (± 8.4), con una incidencia y severidad del 29.2% (± 19.9) y 12% (± 7.9), respectivamente, si se considera únicamente los huertos con HLB. La mayor ocurrencia se observó en Itapúa con énfasis en naranja dulce con respecto a otros cítricos con superficie significativa como limón Tahití (*Citrus latifolia*); sin embargo, la mayor incidencia y severidad se observó en un huerto del departamento de Coordillera con 63% y 23%, respectivamente, lo cual sugiere que existen condiciones inductivas como mayor vulnerabilidad de la especie por brotación y atractabilidad de *D. citri*. Por otra parte, existe evidencia que el manejo tecnológico influye en la cronicidad de la bacteria y por tanto en el impacto productivo (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Capítulo II y Capítulo III). Por lo que es necesario evaluar este componente para las condiciones de Paraguay.

Se comprobó un efecto positivo de la erradicación de plantas enfermas con HLB en la baja dispersión a nivel de focos, parcelaria y regional con tasas de ($b= 0.003$ a 0.005) y con incidencias menores al 30%, por lo que se recomienda mantener las acciones de erradicación como base del manejo del HLB y control regional del vector.

A nivel parcelario, el patrón espacial fue predominantemente agregado dependiente de la carga de inóculo, el cual tiene implicación en el comportamiento temporal y espacial de la epidemia y determina los umbrales bajo los cuales se podría actuar sobre el inóculo primario, a través de erradicación y sobre el inóculo secundario a través del control del vector. Adicionalmente, se observó que existe un efecto de borde e interno típico de citricultura no extensiva, por lo que se recomienda considerarlo dentro de las acciones de muestreos y monitoreo de *D. citri* con fines de prevención y detección del HLB en regiones

como San Pedro, Canindeyú, Amambay y Boquerón, para optimizar recursos humanos y económicos en un contexto de emergencia nacional para evitar la dispersión del HLB a nivel Paraguay.

5. REFERENCIAS

34. Aubert B. 1987. *Trioza erythrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidae), the two vectors of citrus greening disease: biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42:149–62.
35. Bassanezi RB, Busato LA, Bergamin Filho A, Amorim L, Gottwald TR, 2005. Preliminary spatial pattern analysis of huanglongbing in São Paulo, Brazil. In: *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA, USA: IOCV, 341–55.
36. Bassanezi, R. B., Belaque, J. J. and Montesino, L. H. 2013a. Frequency of symptomatic trees removal in small citrus blocks on citrus huanglongbing epidemics. *Crop protection* 52: 72-77.
37. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., Bergamin-Filho, A. 2013b. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97, 789-796.
38. Belasque, J. J., Filho, B. A., Bassanezi, B. R., Barbosa, J. C., Fernandes G. N., Yamamoto, T. P., Lopes, A. S., Machado, M. A., Pereira Leite, J. R. Ayres, J. A. & Massari, C. A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*. 34(3): 137-145.
39. Beloti, V. H., Rugno, G. R., Felipe, M. R., Do Carmo-Uehara, A., Garbim, L. F., Godoy, W. A. C. and Yamamoto, P. T. 2013. Population Dynamics of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in orchards of ‘Valencia’ orange, ‘Ponkan’ Mandarin and ‘Murcott’ tangor trees. *Florida Entomologist*: 96(1): 173-179.
40. Bove, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
41. Cabrera-Hidalgo, A., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Rebollar-Alviter, A. y Marbán-Mendoza, N. 2014. Ocurrencia de *Nacobus aberrans* en Cultivos Hortícolas del Noroeste de Michoacán, México. *Nematropica* 44: 107-117.

42. Ceja-Torres, L. F., Mora-Aguilera, G. and Mora-Aguilera, A. 2014. Agronomical management influence on the spatiotemporal progress of strawberry dry wilt in Michoacan, Mexico. *African Journal of Agricultural Research* 9: 513-520.
43. Domínguez-Monge, S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 63 pp.
44. Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J.J., Manzanilla-Ramírez, M.A., Flores-Sánchez, J.L. y López-Arroyo, J.I. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8):769-782.
45. Esquivel-Chávez, F. 2011. Análisis Histológico y Epidemiológico de limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 56 pp.
46. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., López-Arroyo, J. I. y Robles-García, P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.
47. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Velázquez-Monreal, J. J., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J. I. y Acevedo-Sánchez, G. 2013. Caracterización Epidemiológica del HLB en Colima con énfasis en el subsistema manejo. *In Memoria: Avances de Investigación del Instituto de Fitosanidad-Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos*. Texcoco, Edo. de México. 6 de Diciembre.
48. Góngora, K. C. 2004. Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del Citrus Tristeza Closterovirus en Tamaulipas, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 90 pp.
49. Gottwald T, Ireya M, Gast T. 2008. The plantation edge effect of HLB: a geostatistical analysis. *Proc. Int. Res. Conf. Huanglongbing*, pp. 305–8. <http://www.plantmanagementnetwork.org/proceedings/irchlb/2008/>
50. Gottwald, T., Luo, W., Riley, T. and Parnell, S. 2014. Commercial risk-based survey for HLB and implications for efficacy of Citrus Health Management Areas (CHMAs). *Journal of Citrus Pathology* 1: 110-11.

51. Márquez, P. F., Márquez, G. J., Rodríguez, M. M. L., Esquivel, C. F., Mora, A. G. y Acevedo, S. G. 2011. Análisis espacial y temporal del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en el municipio de Xalisco, Nayarit. *In*: 2do. Taller Internacional de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. 1519 de agosto. Manzanillo, Col.
52. Mora-Aguilera, G., Acevedo, G., Flores, J., Domínguez, S., Coria, J., Hernandez, A., González, R., López, A., Sánchez, H., Feria, J., Trujillo, J., López, E., Méndez, A., Matuz, J. and Martínez, M. 2014a. Epidemiological Surveillance System for Coffee Rust Disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: a Regional Approach. *In*: The 25th International Conference on Coffee Science. 42-47 pp. September 8-14. Armenia, Colombia.
53. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Flores-Sánchez, J., Hernández, R., González- Gómez R. and Robles-García P. 2014b. Regional Epidemiology: A new frontier and challenge in plant pathology. Pp: 6 *In*: 47^o Congreso Brasileiro de Fitopatología. Del 17 al 22 de Agosto. Londrina, Paraná. Brasil.
54. Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López Arroyo, J. I., Velázquez Monreal, J., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S. y González-Gómez, R. 2014c. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108-119.
55. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Flores-Sánchez, J. L., González-Gómez, R. and Robles-García, P. 2013. Applied Epidemiology to Plant Disease Risk Analyses. Pp. 27-29 *In*: IV Brazilian Workshop of Plant Disease Epidemiology. December 2nd-4th. Curitiba-Parana, Brazil.
56. Nava, D. E., Torres, M. L. G., Rodrigues, M. D. L., Bento, J. M. S. y Parra, J. R. P. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. *Journal of Applied Entomology* 131: 709-715.
57. Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G., Ruiz-García, N., Ochoa-Martínez, D., Gutiérrez-Espinosa, A. y Febres V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(4): 493-507.

58. Robles, G. P. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>.
59. Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal. J. J., Manzanilla-Ramírez. M. A., Orozco-Sánchez. M., Medina-Urrutia. V. M., López-Arroyo, J. I. y Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1): 15-31.
60. Rogers, M. E., P. A. Stansly and L. L. Stelinski. 2010. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a Psyllid Management Plan. University of Florida, IFAS Extension, Gainesville, FL. <http://www.crec.ifas.ufl.edu/chma/>
61. Ruiz-García, N.; Mora-Aguilera, G.; Rivas-Valencia, P.; Góngora-Canul, C.; Loeza-Kuk, E.; Ochoa-Martínez, D.; Ramírez-Valverde, G.; Gutiérrez-Espinosa, M. A.; Álvarez-Ramos, R. 2009. Sensibilidad de Inmunoimpresión-Elisa y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del Virus de la Tristeza de los Cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, México. Revista Chapingo Serie Horticultura, Enero-Abril, 41-47.
62. Salcedo, B. D., Hinojosa, R., Mora-Aguilera, G., Covarrubias, I., De Paolis, J.R F., Mora, S., Cíntora, C. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p.
63. SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe Julio, 2015. Revisado en web el 27 de julio 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
64. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (SENAVE). 2013a. <http://www.senave.gov.py/docs/resoluciones/senave/Res80-13.pdf>
65. SENAVE. 2013b. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas. Lista de plagas cuarentenarias del Paraguay. Revisado en web el 1 de febrero de 2016. <http://www.senave.gov.py/docs/servicios/cuarentena/lista-de-plagas-cuarentenarias-para-paraguay.pdf>
66. Yamamoto P. T. y Miranda, M. P. 2009. Controle do psíldeo *Diaphorina citri*. Ciência & Prática. 33: 10-12.

CAPÍTULO VI
ÁREAS REGIONALES DE CONTROL DE *Diaphorina citri* (ARCOs) PARA EL
MANEJO DEL HLB EN MÉXICO

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB) se detectó en México en julio 2009 y es actualmente la enfermedad más importante que a los cítricos afecta debido a las múltiples implicaciones económicas y sociales. El estado del arte sobre el manejo de esta enfermedad ubica al control regional de *Diaphorina citri* (DC) como la mejor estrategia para mantener la productividad citrícola mundial en complemento a prácticas agronómicas básicas como niveles adecuados de riego y nutrición. En México las acciones de control regional se realizan mediante la estrategia: Áreas Regionales de Control de *Diaphorina citri* (ARCOs). Sin embargo, estos planteamientos carecen de criterios epidemiológicos claros para determinar el tamaño y localización de las áreas regionales y no consideran la dirección y velocidad de dispersión de CLas. Este estudio tuvo como objetivos: estimar la superficie en hectáreas a ser manejadas en ARCOs mediante: a) *enfoque temporal (ET)* y b) *enfoque espacial (EE)*. Con *ET* se emplearon datos de incidencia y tiempos de evaluación, a tres niveles espaciales: regional, subregional y parcelario, los cuales permitieron generar un modelo integrativo multidimensional para estimar las ARCOs en un horizonte de tiempo. Con *EE* se generó un modelo integrado por un *factor de riesgo* con las variables: susceptibilidad de la especie, superficie citrícola, carga de inóculo en planta y vector, índice de abundancia de DC e índice de traspatio; y tasa de dispersión espacial estimada con datos de Sao Pablo-Brasil, Florida-EUA, Yucatán y Colima-México. Con este modelo se generó la aplicación @RCOs HLB v 1.0 con simulación Monte Carlo para fines de estimar las ARCOs. Ambos enfoques resultaron ser adecuados para la estimación de las ARCOs por su justificación epidemiológica, donde *ET* podría ser empleado como un escenario agresivo, ya que estimó 337,828 ha y con *EE* 243,919 ha, lo que representa el 67.5% y 48.7% de la superficie citrícola del país, respectivamente. Esta propuesta permite priorizar la superficie de ARCOs para optimizar los recursos económicos y humanos disponibles.

1. INTRODUCCIÓN

En México, se han definido dos escenarios epidémicos del Huanglongbing (HLB): 1) Región del Pacífico, con mayor intensidad y con prevalencia en huertos comerciales y 2) Península de Yucatán, con menor intensidad y con prevalencia en traspatios a pesar de ser la región donde se detectó al HLB por primera vez en el 2009 (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Actualmente, países como Brasil, EUA y México realizan el manejo del HLB a través de tres estrategias complementarias: 1) Erradicación de plantas enfermas; 2) Control regional de *Diaphorina citri* (DC), vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), agente causal del HLB en México; y 3) Uso de plantas certificadas (Bassanezi *et al.*, 2013; Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2011). Este último es el más complicado de realizar debido a la problemática social que implica. Con este fin, la OIRSA desarrolló para sus países miembros, los lineamientos de armonización normativa regional de certificación fitosanitaria de material propagativo de cítricos, documento en el cual se establecen los procedimientos y requisitos fitosanitarios para la regulación de material de propagación de cítricos (OIRSA, 2013).

La evidencia del éxito de la aplicación de estas tres acciones complementarias es Brasil, ya que a la fecha la región de San Pablo, se mantiene con una incidencia menor al 10% (Bassanezi *et al.*, 2012). Sin embargo, en regiones cítricas donde el escenario epidémico del HLB es endémico, la erradicación de plantas es una opción inviable (Belasque *et al.*, 2009) y se requiere enfatizar el control regional del vector y el uso de plantas certificadas, p.e. región Pacífico de México, o Florida, EUA.

El control del vector se realiza principalmente mediante productos químicos y en menor medida con técnicas o enfoques biológicos mediante parasitoides, depredadores y entomopatógenos (Ruiz-Cancino *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2012). En la actualidad, existen varias líneas de investigación de control biológico con resultados promisorios cuya aplicación, en corto plazo, podría dirigirse en áreas rurales y urbanas de traspatio y zonas cítricas específicas con bajo nivel tecnológico (López-Arroyo y Rocha-Peña, 2012). En México, el control biológico del DC se realiza en algunas regiones mediante la liberación de *Tamarixia radiata* y a la fecha se cuenta con dos laboratorios de reproducción masiva que permiten la liberación coordinada en los diferentes estados cítricos del país (Arredondo-Bernal, 2013).

Con respecto al control químico, en México, los insecticidas aprobados por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) fueron validados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) mediante una evaluación de insecticidas convencionales y alternativos recomendados para el control del DC, en cuanto a efectividad e inducción de resistencia (IRAC, 2012).

El enfoque de *control regional* del DC fue desarrollado experimentalmente en Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS) y aplicado comercialmente por empresas, principalmente de San Pablo, Brasil (Bassanezi *et al.*, 2013). Sin embargo, la producción extensiva de Brasil ha favorecido esta estrategia por rapidez en la toma de decisiones y la amplia cobertura asociada a pocos productores. Su adecuación para otras condiciones, ha implicado la cuidadosa definición de criterios para el establecimiento de áreas de manejo regional optimizando los recursos humanos y económicos para el caso donde se han diseñado estrategias con apoyo oficial como México. Las razones técnicas para implementar y mantener áreas regionales de control de DC, sobre todo con la presencia de HLB en una región, son las siguientes: 1) retrasar el inicio de la epidemia en 299 días aproximadamente, 2) reducir la infección de manera efectiva al disminuir la población de psílidos de huertas adyacentes, tiene un gran efecto en reducir la incidencia (90%) y la tasa de progreso (75%) del HLB; la incidencia inicia más tarde y es más lenta, 3) reducir la población de psílidos locales (de 76 a 97%), aún en huertos abandonados, permite el uso de un programa menos intensivo de control local del vector, y 4) reduce los costos de manejo del HLB, porque las aplicaciones son menos intensivas y más eficientes (Bassanezi *et al.*, 2013).

Bové (2012), señala que en el caso de los pequeños productores que se localizan en áreas con baja incidencia de HLB, deben formar áreas compactas de manejo regional de al menos 500 ha, en las cuales se realice el control del vector y la eliminación de plantas enfermas. Si bien esta aseveración carece de un sustento epidemiológico sí puntualiza un problema central relativo al tamaño del área que debe considerar un control regional.

En Florida, se recomienda la creación de CHMAs por sus siglas en inglés (Citrus Health Management Areas) para coordinar las acciones de manejo del HLB, las cuales tengan una incidencia del HLB relativamente baja y de un tamaño de 4,000 a 20,000 ha (Rogers *et al.*, 2010). En este caso Gottwald *et al.* (2014) señala que existen factores de riesgo que deben

considerarse como: susceptibilidad del cultivar, superficie del huerto, edad de plantas, cercanía de foco (distancia con plantas y vectores positivos), entre otros; para así realizar una mejor predicción de las áreas con mayor riesgo que deben ser manejadas con CHMAs. Adicionalmente, este autor señala que con un número suficiente de evaluaciones se puede optimizar el tamaño, localización y número; complementariamente se puede determinar la eficacia de esta estrategia con fines de validar su uso. Sin embargo, esta propuesta carece de otros criterios como la dirección y velocidad de dispersión del HLB.

En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) mediante la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) implementó un programa piloto de control de *D. citri*, en los estados de Colima, Michoacán y Yucatán, en el cual se realizó la aplicación de aceites minerales, sales potásicas y productos químicos en una superficie estimada de 20,000 ha (Robles, 2012). Adicionalmente, Robles (2012) menciona que el SENASICA, en colaboración con el INIFAP, investigadores de otras instituciones y técnicos de los Organismos Auxiliares de Sanidad Vegetal (OASV) elaboraron un protocolo para establecer áreas regionales de control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs).

La aplicación de enfoques epidemiológicos para estimar el riesgo de dispersión y establecimiento de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) requiere la integración de modelos espacio-temporales en el contexto del sistema productivo citrícola (Mora-Aguilera *et al.*, 2013; 2014; Bassanezi *et al.*, 2013; Salcedo *et al.*, 2010); y con excepción de la propuesta de Gottwald *et al.* (2014), los planteamientos para el control regional de DC carecen de criterios epidemiológicos claros para la estimación del riesgo del HLB y todos desdeñan la dirección y velocidad de dispersión de CLas, así como la gradualidad del proceso epidémico por lo que este estudio se planteó con los objetivos de:

6. Estimar la superficie (hectáreas) de operatividad para la estrategia de Control Regional de *Diaphorina citri* (ARCOs) mediante un *enfoque temporal y espacial* para el manejo del HLB en México.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Regionalización del HLB en México

A partir de los reportes oficiales de positivos de CLAs en planta y vector hasta octubre de 2015 en México (SENASICA, 2015) se regionalizó el país en tres escenarios epidémicos del HLB, los cuales consideraron los siguientes criterios: superficie citrícola, número y distribución de positivos, e intensidad epidémica del HLB con base en análisis regionales. Esta metodología se empleó en diversos estudios para regionalización de áreas de estudio y para definir riesgos regionales con base en variables del sistema epidemiológico (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Mora-Aguilera *et al.*, 2013; Domínguez-Monge, 2011; Góngora, 2004). En el presente estudio los escenarios se clasificaron de la siguiente manera (Figura 1):

- a) Escenario 1. Condición epidémica de baja intensidad en la Península de Yucatán, con prevalencia de positivos a CLAs en traspatio.
- b) Escenario 2. Condición de endemidad en la región del Pacífico (Colima, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Sinaloa y BCS) con mayor intensidad de la enfermedad.
- c) Escenario 3. Condición de *focos de infección* en el Golfo de México.

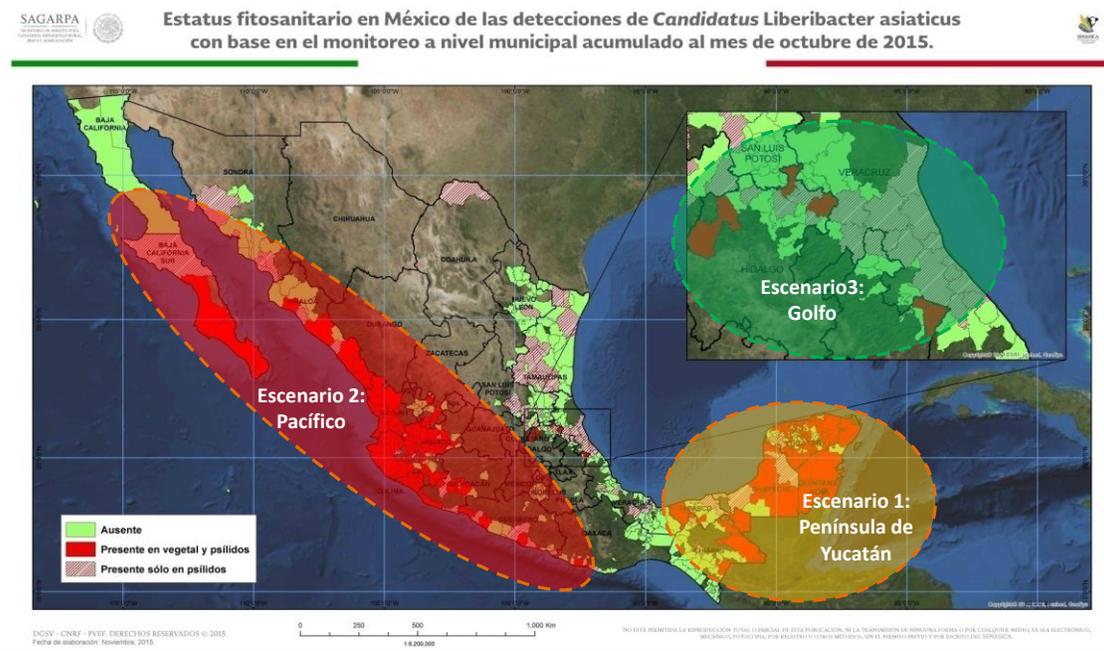


Figura 1. Distribución actual del HLB en México y regionalización en tres escenarios epidémicos empleados para el estudio de estimación de ARCOs. Fuente: Con edición de imagen SENASICA, 2015.

Con base en la regionalización del HLB en México se realizó la estimación de las áreas en riesgo que requieren ser controladas mediante la estrategia ARCOs, con el uso de dos enfoques con justificación epidemiológica (Figura 2):

- a) *Enfoque temporal (ET)*: se basa en el principio de prevención de la dispersión al tener para reducir la velocidad epidémica del HLB, con el uso de datos de epidemias de México, como prototipo representativo del comportamiento de esta enfermedad en cada región.
- b) *Enfoque espacial (EE)*: considera la estimación de riesgo por HLB a partir de un método ponderado de variables del sistema epidemiológico (planta-patógeno-vector-clima-manejo) a nivel municipal para los 24 estados citrícolas del país; complementariamente se basa en tasas de dispersión del HLB obtenidas a partir de análisis de distancias (km) y tiempos de detección (meses) del HLB en Florida, E.U.A. (Irey, 2009); San Pablo, Brasil (Bassanezi *et al.*, 2005); Yucatán (Flores-Sánchez *et al.*, 2011) y Colima (Robles-González *et al.*, 2013), México, los cuales se integran a un modelo general de dispersión, donde Florida, E.U.A., representa el escenario de mayor intensidad y Yucatán, representa el escenario de menor intensidad.

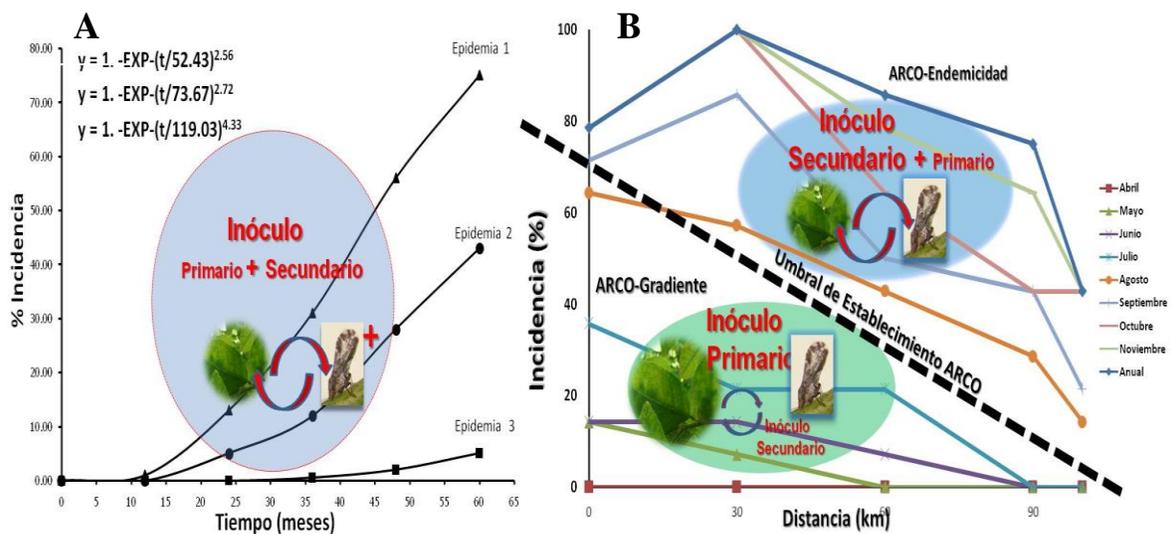


Figura 2. Enfoques epidemiológicos para la estimación de Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs) con base en el tipo de inóculo: **A)** Enfoque temporal: evalúa el efecto de estrategias preventivas y protectivas a nivel parcela con el fin de reducir la velocidad epidémica y **B)** Enfoque espacial: emplea riesgo regional con base en método ponderado variables del sistema epidemiológico y tasas de dispersión del HLB. Fuente: Mora-Aguilera *et al.*, 2014.

2.2 Enfoque temporal (ET)

A partir de la regionalización del HLB en México, se obtuvieron datos de incidencia del HLB y fechas de evaluación a nivel regional (municipios), municipal (hectáreas) y parcelario (número de plantas), los cuales se emplearon como dimensiones espaciales representativas de cada uno de los escenarios epidémicos del HLB en el país, para estimar las ARCOs por asociación. Por lo anterior, los datos de incidencia y tiempo de epidemias del HLB en Colima, Yucatán, Campeche, y Nayarit se ajustaron con el modelo Weibull (Cuadro 1 y Figura 6).

Cuadro 1. Modelos epidémicos espacio-temporales por región, especie citrícola y escenario epidémico.

¹ Región	² Especie Citrícola	³ Regional		³ Municipal		³ Parcelario		⁴ Tiempo		
		Parm_ b	Parm_ c	Parm_ b	Parm_ c	Parm_ b	Parm_ c	t ₁	t ₂	t ₃
PCO	LI	-	-	-	-	-	-	33	69	93
	LM	10.84	1.41	16.66	2.46	13.02	1.13			
	LP	14.91	0.66			41.23	0.51			
	M, T, NA, NV	10.84	1.41			18.70	1.79			
PEN	Todas	56.90	1.21			37.2	0.72	18.70	1.79	39
BCS y CHI				20	56					80
Resto				6	42					66

¹PAC= Pacífico, PEN= Península, BCS= Baja California Sur, CHI= Chiapas y Resto= Todos los estados fuera de las categorías previas. ²LI= Limón italiano, LM= Limón mexicano, LP= Limón persa, M= Mandarina, T= Toronja, NA= Naranja agria y NV= Naranja Valencia. ³Parm_b y Parm_c en los niveles de análisis espacial corresponden a parámetros b y c de las epidemias ajustadas con el Modelo Weibull. ⁴t=1, 2 y 3 corresponden a escenarios de proyección a 2012, 2015 y 2017, respectivamente.

El escenario de la Península de Yucatán (*PEN*) consideró como modelo multidimensional epidemias documentadas en Yucatán, y Campeche, a nivel regional y municipal, respectivamente (DGSV, 2011), así como epidemias de Yucatán a nivel parcelario (Loeza-

Kuk *et al.*, 2010) en un huerto de limón persa (*Citrus latifolia*) del municipio de Tizimin de enero, 2009 a julio, 2011 (Figura 2). Las consideraciones epidemiológicas para definición de *PEN* fueron principalmente la primera detección oficial en México en julio de 2009 (SENASICA, 2009), detecciones positivas en traspatios, homogeneidad tecnológico-productiva regional, hospedantes disponibles, entre otros. Los estados que se consideran dentro de este escenario son: Yucatán, Campeche, y Quintana Roo (Figura 6), a un horizonte de tiempo (promedio para los 3 estados) de 39 meses a partir de la detección de HLB hasta 2012. Los estados de Baja California Sur, y Chiapas, se integran a este escenario a un horizonte de tiempo de 20 meses con el mismo criterio de tiempo.

El escenario de la región GOLFO y resto de los estados: Baja California, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, y Zacatecas se incluyó a la región *PEN* (Figura 6) con un horizonte de 6 meses, para lo anterior se consideró ausencia de informes oficiales de la enfermedad durante 2012. Sin embargo, existían condiciones de riesgo debido a la disponibilidad de hospedante y presión de inóculo por otros estados con detecciones positivas como San Luis Potosí y cercanía con Tabasco (SENASICA, 2015).

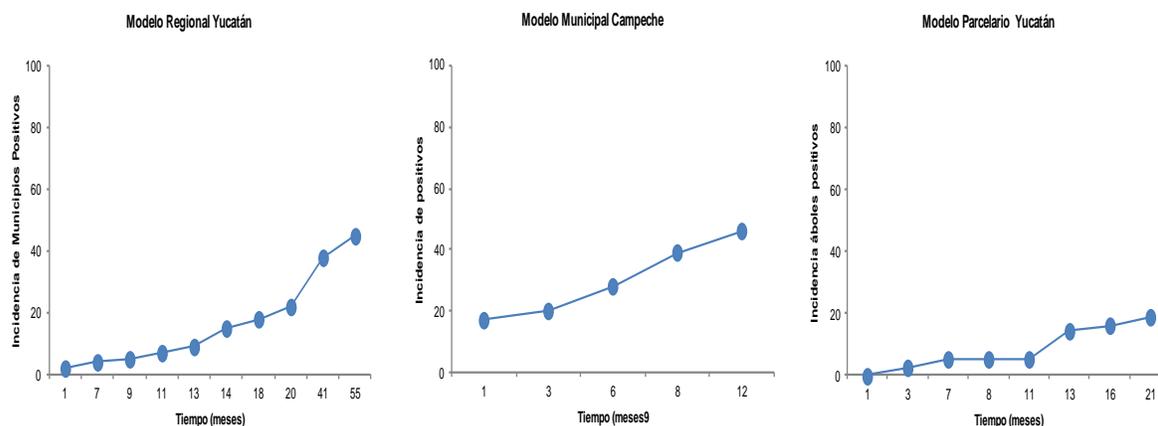


Figura 3. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario Región Península de Yucatán y Golfo de México aplicado a todas las especies cítricas.

El escenario del Pacífico (*PCO*) considera como modelo multidimensional un diversidad de epidemias reportadas o estudiadas en Colima a nivel regional y municipal, así como Nayarit y Yucatán a nivel parcelario (Figura 3-5). La necesidad de contar con variaciones en la dimensión espacial fue importante para caracterizar el incremento temporal de las

epidemias en diferentes especies cítricas, p.e. para limón mexicano en Colima, se emplearon epidemias regionales, municipales y parcelarias estudiadas dentro del estado (SENASICA, 2015; Robles-González *et al.*, 2013), a diferencia de limón persa en Nayarit, donde se determinó emplear escenarios regionales y municipales con datos de Colima y parcelarios de Nayarit (Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011) para garantizar resultados más acordes a las condiciones regionales de la especie. Las consideraciones epidemiológicas para definición de *PCO* fueron principalmente homogeneidad tecnológico-productiva regional, hospedantes susceptibles y alta incidencia del HLB, la cual se refiere a la distribución homogénea del HLB en una región. Los estados que se consideran dentro de este escenario son: Colima, Jalisco, Nayarit, Michoacán y Sinaloa (Figura 6).

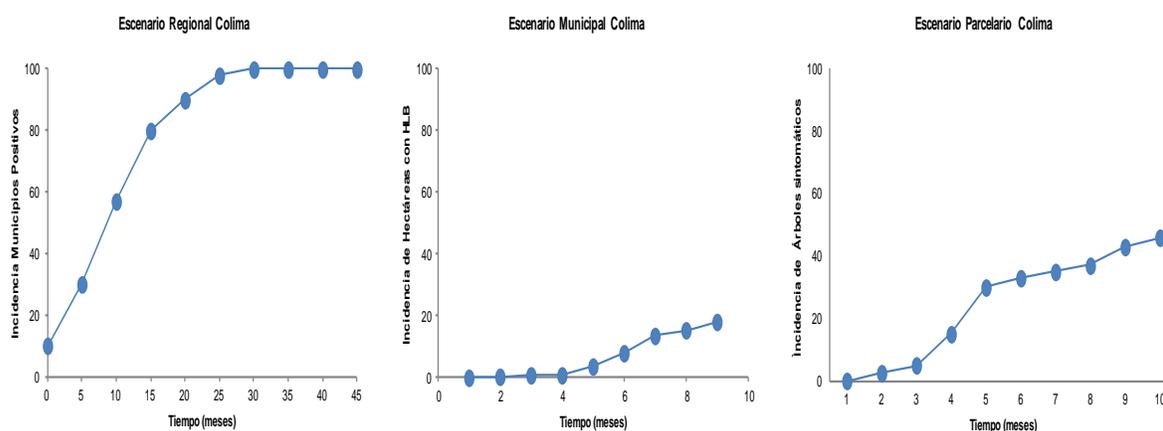


Figura 4. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario Región Pacífico. Caso Limón mexicano.

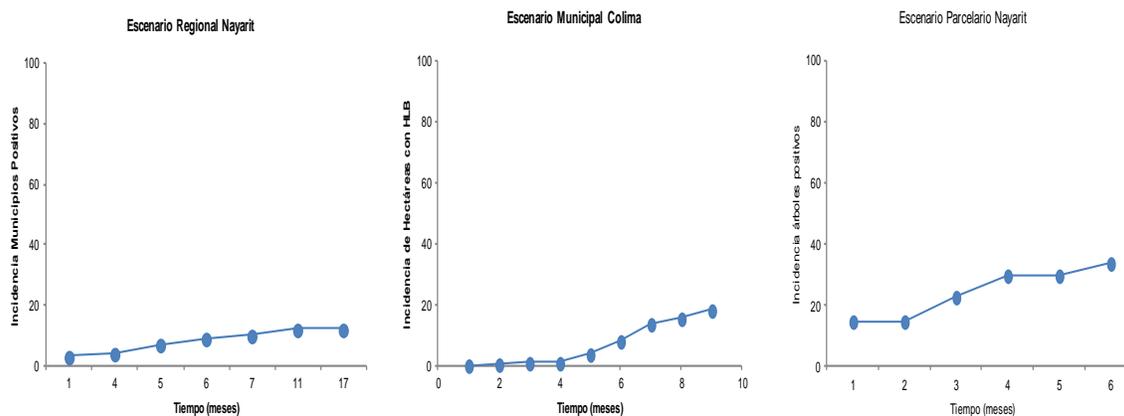


Figura 5. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario Región Pacífico. Caso Limón persa.

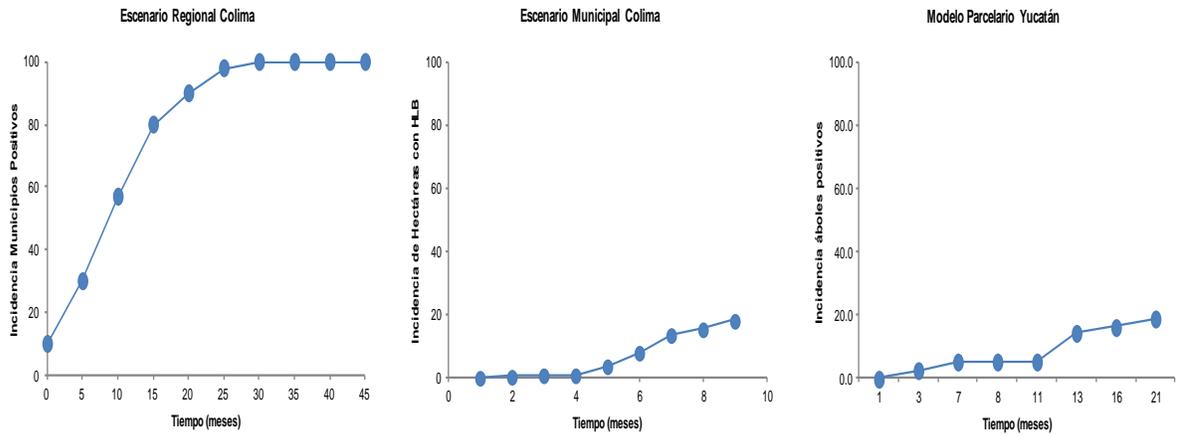


Figura 6. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario Región Pacífico. Caso Cítricos dulces.



Figura 7. Mapa de selección de estados por escenario epidémico del HLB en México. La figura muestra las tres zonas en las cuales se regionalizó epidemiológicamente.

2.2.1 Análisis de datos

La incidencia del HLB a nivel regional (municipios), municipal (hectáreas) y parcelario (plantas de cítricos) se calculó con la siguiente ecuación:

$$Inc = (n * 100)/N \quad [E.1]$$

Donde: Inc: es el porcentaje de incidencia de municipios, hectáreas (ha) y plantas con HLB; n : es el número de municipios, ha y plantas con HLB; N : es el número total de municipios, ha y plantas.

Los datos de incidencia y tiempos de evaluación se ajustaron mediante el modelo flexible *Weibull* (E.2) de dos parámetros (b =tasa y c =forma), mediante los procedimientos PROC MODEL y PROC NLIN (Jesús Junior *et al.*, 2005). Este último se empleó para la determinación de los límites superiores e inferiores de “ b ” y “ c ”. El modelo *Weibull* se seleccionó por su capacidad flexible para ajustarse a distintas formas e intensidades epidémicas, evitando el uso de más de un modelo temporal que pudiera requerir factores de corrección con fines comparativos.

El modelo *Weibull* se basó en la siguiente ecuación de dos parámetros:

$$y = 1 - EXP\left(\frac{t}{b}\right)^c \quad [E.2]$$

Donde: y = incidencia de plantas positivas a HLB, t = tiempo, b = parámetro de tasa en su forma inversa y c =parámetro de forma de la curva.

La ecuación general de estimación de incidencia *multidimensional* del HLB se expresa en E.3, la cual calcula las áreas regionales de control o unidades de operatividad (número hectáreas) a ser controladas dentro de N -parcelas a nivel regional (en este caso estatal) con presencia del HLB (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Salcedo *et al.*, 2010).

$$ARCO = \left\{ Mun * \left[\left(1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} * \left\{ Has * \left[\left(1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} * \left\{ Arb * \left[\left(1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} \quad [E.3]$$

Donde, Mun = Número total de municipios citrícolas por estado; Has = Número total hectáreas-parcelas por municipio citrícola; Arb = Número total de árboles por hectáreas-parcelas; t = horizonte de tiempo para el pronóstico de incidencia; b = parámetro de tasa en forma inversa; c = parámetro de forma de la curva de epidemia.

Adicionalmente el ajuste por el modelo Weibull se llevó a cabo de forma desagregada por dimensión espacial:

a) Incidencia de municipios con HLB

Corresponde a la primera dimensión espacial, y se refiere al número total de municipios con incidencia de HLB. Se representa con la siguiente ecuación:

$$Inc_Mun = \left\{ Mun * \left[\left(1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} \quad [E.4]$$

b) Incidencia de predios/parcela/hectárea

Es el segundo nivel de análisis espacial, en éste se calculó el número total de predios o parcelas dentro de un municipio con presencia de HLB. La unidad espacial es el predio. Se calcula de la siguiente forma:

$$Inc_Has = \left\{ Has * \left[\left(1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} \quad [E.5]$$

c) Incidencia de árboles

Es el tercer nivel de análisis espacial que calculó el número total de árboles positivos dentro de una parcela. Se calcula de la siguiente forma:

$$y = \left\{ Arb * \left[\left(1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} \quad [E.6]$$

Para presentación de resultados, este documento usará la estimación de las unidades de operación (ha) a ser controladas bajo ARCOs para el manejo regional del HLB.

2.2.2 Representación de las estimaciones generadas

Para este fin, se generó una aplicación en MS-Excel, la cual permite visualizar la estimación del riesgo regional (municipios con HLB), municipal (hectáreas con HLB) y parcelario (número de plantas con HLB) a partir de un menú de selección multi-criterio: 1) *escenario epidémico*, 2) *estado* y 3) *especie citrícola* (Figura 7), lo cual permite al usuario obtener la información por un proceso racional de selección.

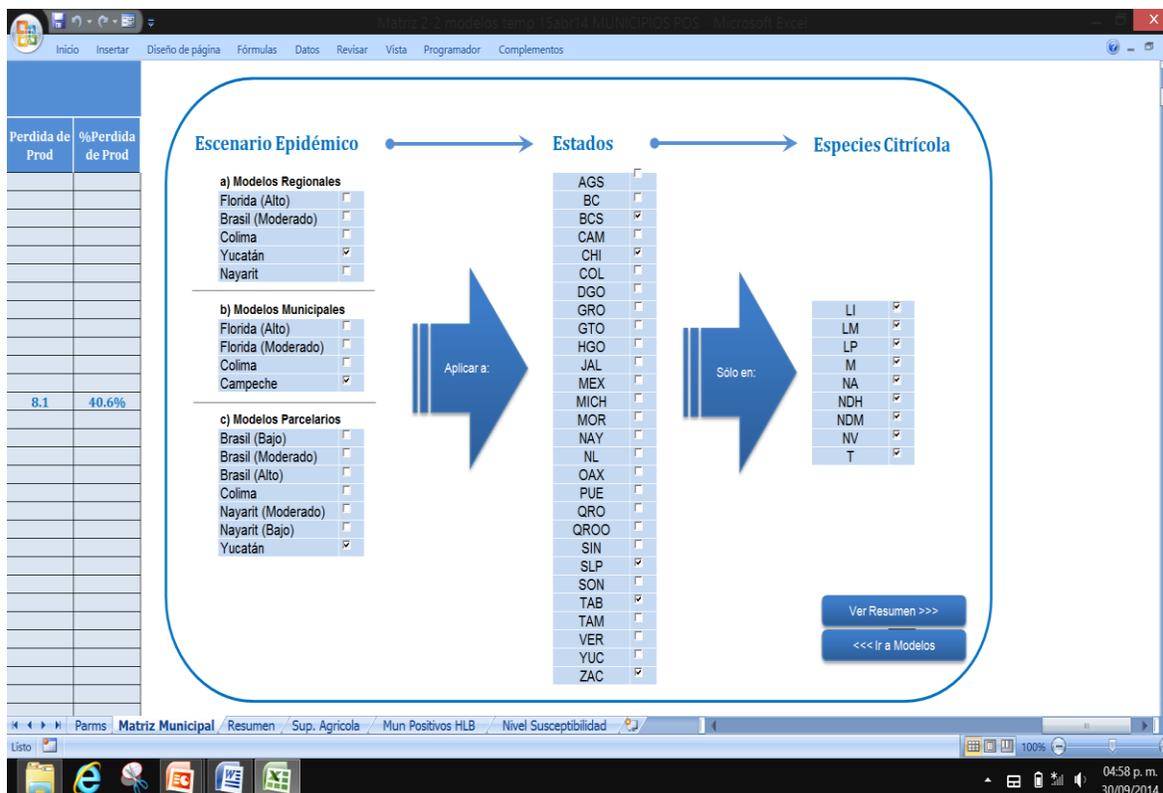


Figura 8. Aplicación desarrollada en MS-Excel para visualizar las estimaciones de riesgo regional a partir de la selección de multicriterios.

2.3 Enfoque espacial (EE)

2.3.1 Método ponderativo de variables de inductividad epidémica del HLB

Este método utiliza valores ponderados e índices a partir de las variables de inductividad epidémica asociadas al sistema epidemiológico (hospedante-patógeno-vector-clima-manejo).

Se requirió el desarrollo de una aplicación en MS-Excel llamada Reg-N (Figura 8), la cual integra variables del sistema epidemiológico, del *Hospedante*: superficie sembrada, índice cítrica, susceptibilidad de especies a CLas. *Del patógeno*: carga de inóculo, número de positivos vegetales e insectos, cercanía de foco. *Del vector*: índice de abundancia, generaciones potenciales, datos de monitoreo a nivel nacional. *Del clima*: inductividad climática.

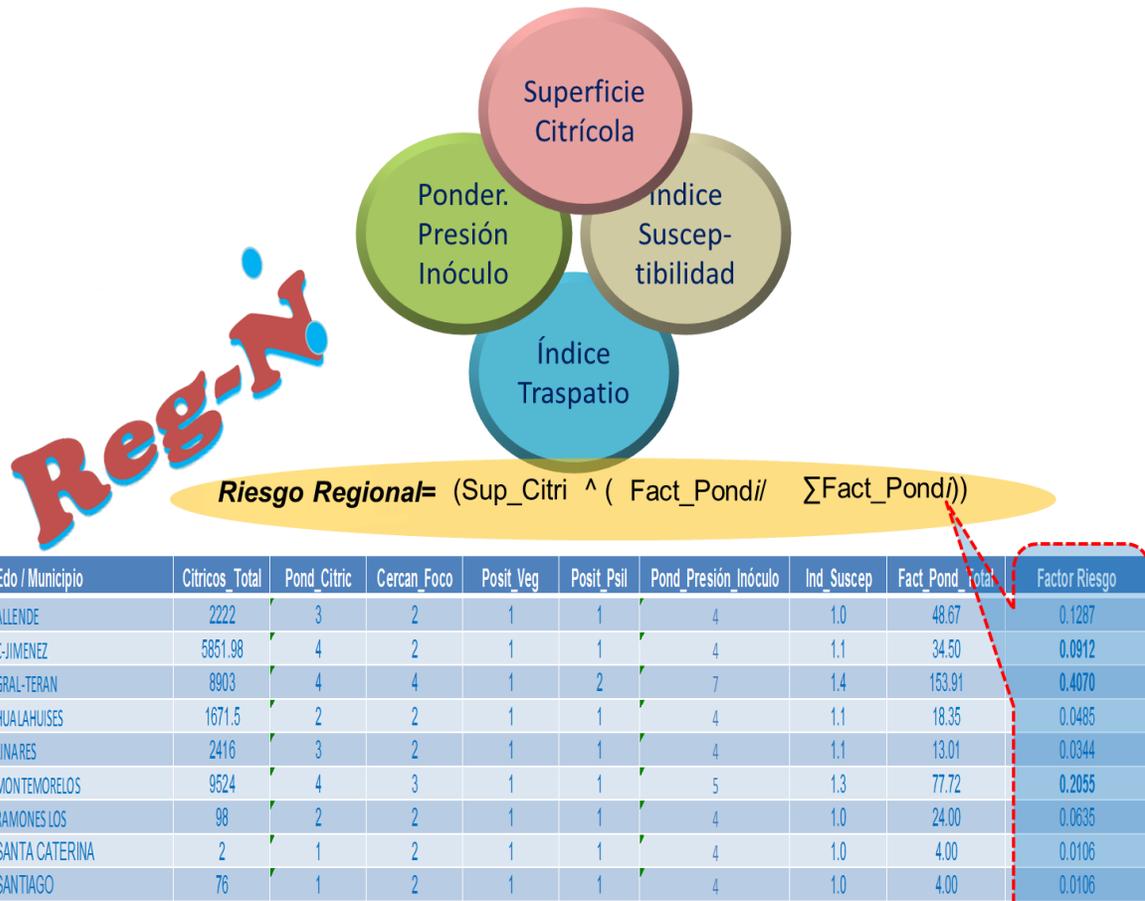


Figura 9. Aplicación Reg-N desarrollada en MS-Excel para la estimación del riesgo regional a partir de variables de inductividad epidémica.

La estimación del riesgo regional por subregión se realizará calculando el factor de ponderación de cada subregión entre la suma de todos los factores de ponderación de la región, como se describe en la siguiente ecuación:

$$Riesgo_{Regional} = (Sup_{Citri}^{Fact_pondi} / \sum Fact_pondi) \quad [E.7]$$

Donde: $Riesgo_{Regional}$ = Nivel de riesgo por región; Sup_{Citri} = Superficie cítrica por región.

El factor de ponderación es calculado con la multiplicación de cada valor ponderado e índice de las variables de inductividad. El factor de ponderación se calcula con la siguiente ecuación:

$$Fact_{Pond} = (Sup_{Citri}) * (Ind_{Suscep}) * (Carga_{Inoculo}) * (Ind_{D.citri}) * (Ind_{Trasp}) \quad [E.8]$$

Donde: $Fact_Pond$ = Indicador de la inductividad epidémica y nivel de riesgo por región; Sup_Citri = Superficie sembrada de especies cítricas distribuida en cuartiles, a mayor superficie mayor valor de ponderación; $Ind_{D.citri}$ = Índice de *D. citri* obtenido con el modelo de dinámica poblacional de *D. citri* generado por Torres-Pacheco *et al.*, 2013 (Figura 9).

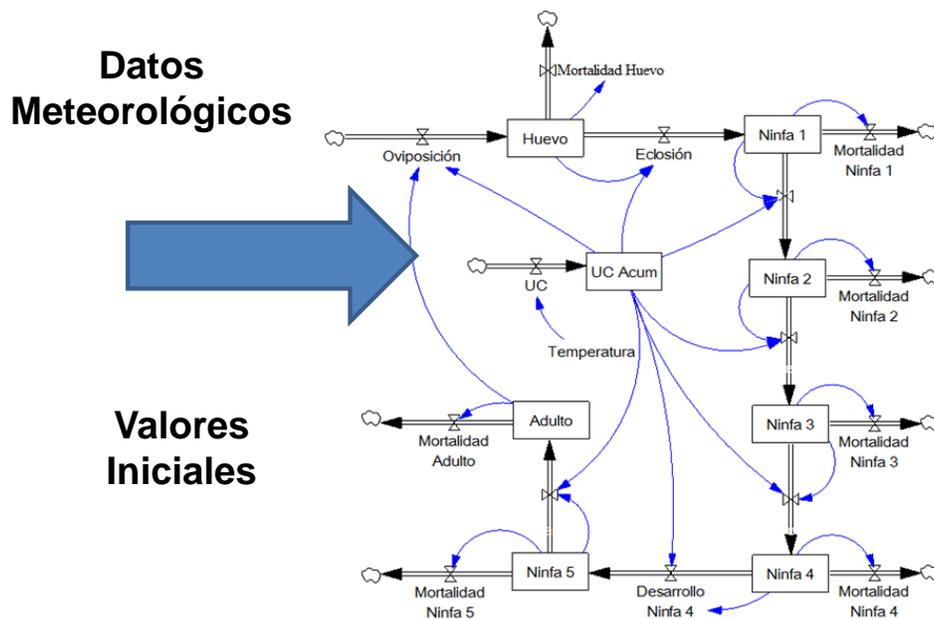


Figura 10. Modelo de dinámica poblacional de *D. citri* generado por Torres-Pacheco *et al.*, 2013.

$$Indice_{Suscep} = [\sum_{i=1}^n (SupCitri_i * PondSuscep_i)] / SupCitri_{total} \quad [E.9]$$

Donde: $Indice_{Suscep}$ = Susceptibilidad relativa de especies cítricas a *Candidatus Liberibacter asiaticus*; $SupCitri_i$ = Superficie sembrada de: limón mexicano=LM, limón persa=LP, limón italiano y toronjo=LI,T, mandarina=M y naranja dulce=ND; $PondSuscep_i$ = Valor ponderado de la susceptibilidad de especies cítricas a *Candidatus Liberibacter*

asiaticus, LM=5, LP=4, LI, T=3, M=2 y ND=1 (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012); $SupCitri_{total}$ = Total de superficie citrícola sembrada por región.

$$Carga_{Inoculo} = (Región) + (Cercania_{foco}) * (Positivos_{veg}) + (Positivos_{psil}) \quad [E.10]$$

Donde: $Carga_{Inoculo}$ = Indicador del nivel de incidencia en planta y vector; $Region$ = Vertientes con superficie citrícola (Golfo=1, Pacífico=2); $Cercania_{foco}$ = Indicador del riesgo por cercanía de regiones con HLB. Región con presencia=4, Región Contigua a una con presencia de HLB=3, Región Intermedia a una con presencia de HLB=2 y Región Distante a una con presencia de HLB=1; $Positivos_{veg}$: Incidencia de número de muestras vegetales positivas a HLB por región; $Positivos_{psil}$: Incidencia de número de muestras de vector positivas a HLB por región.

$$IndTrasp = [(Ind_{AsentHum}) + (Ind_{SupCitri}) + (Ind_{Agri})]/3 \quad [E.11]$$

Dónde: $Ind_{AsentHum}$ = Índice generado a partir de la superficie (ha) del territorio municipal entre la superficie (ha) de asentamientos humanos. Ambos reportados por INEGI; $Ind_{SupCitri}$ = Índice generado con la superficie citrícola (ha) del municipio entre la superficie (ha) territorial del municipio; Ind_{Agri} = Índice generado con la superficie agrícola (ha) del municipio entre la superficie (ha) territorial del municipio.

2.3.2 Potencial de dispersión del HLB

El modelo propuesto establece que el tamaño de las ARCOs (número de hectáreas) estará en función del potencial de dispersión del HLB y el factor de riesgo regional con base en las variables de inductividad epidémica. La base cuantitativa implicó el análisis de datos de epidemias de HLB en Brasil (San Pablo) (Bassanezi *et al.*, 2005), EUA (Florida) (Irey, 2009) y México (Colima, y Yucatán) (Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2011). Los escenarios epidémicos (Cuadro 2) determinan la intensidad de la dispersión de la enfermedad en función de los vientos dominantes: gradiente mayor ($GradMayor$) a favor del viento y gradiente menor ($GradMenor$) en contra del viento (Figura 10).

$$ARCO = \left(\left(3.15 * (tasa_{disp} * Riesgo_{Regional})^2 \right) * t \right) * 100 \quad [E.12]$$

Dónde: $\text{Área}_{\text{Riesgo}}$ = Superficie de riesgo (hectáreas) por región; 3.15 = Valor constante para cálculo de área; tasa_{dis} = Distancia de dispersión del HLB por mes a partir de un foco inicial en una región de reciente ingreso con dispersión activa; $\text{Riesgo}_{\text{Regional}}$ = Producto de las variables de ponderación seleccionadas; t = Tiempo para determinar el tamaño de un área de riesgo.

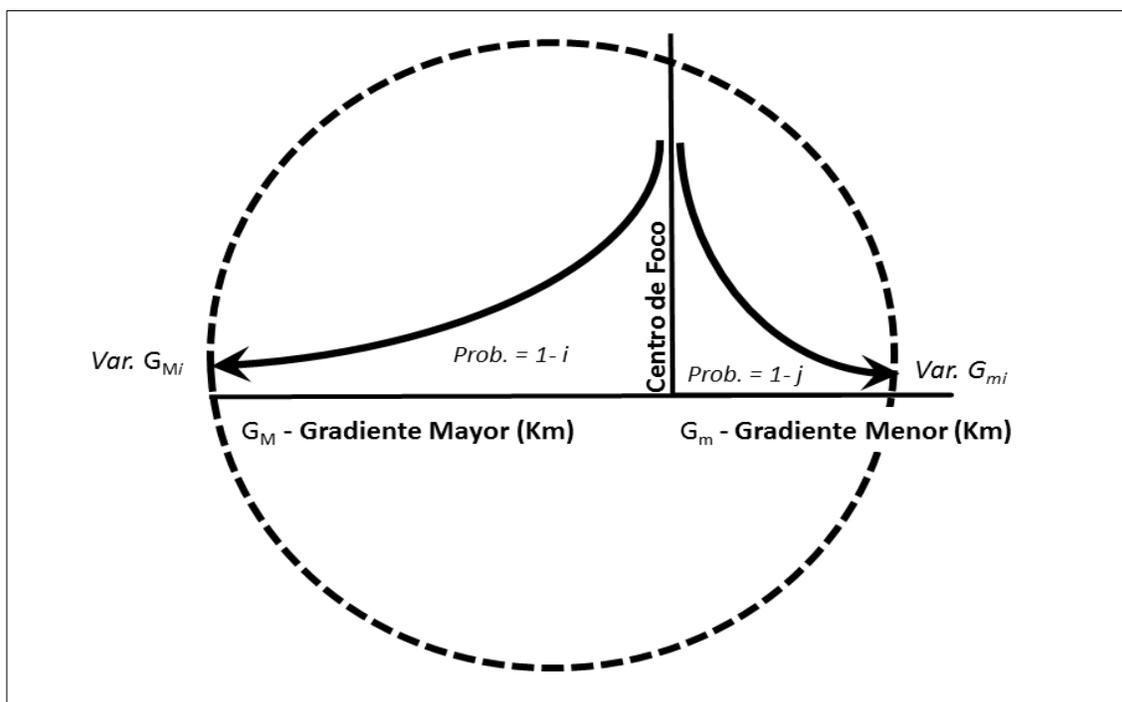


Figura 11. Modelo epidemiológico general para la estimación de un área regional de control (ARCO) basado en el concepto de gradiente asimétrico de dispersión de CLas por *D. citri*.

Cuadro 2. Tasas de dispersión mensual del HLB, por gradiente, en cuatro escenarios epidémicos.

País	Región	Tasa de Dispersión/mensual		Escenarios Epidémicos
		GradMayor (km)	GradMenor (km)	
EUA	Florida	34	17	Alto
Brasil	San Pablo	12.5	8.9	Moderado
México	Colima	12.6	2	Moderado
México	Yucatán	6	2.6	Bajo

Para este fin se generó una aplicación en MS-Excel, denominada @RCOs, la cual consta de cinco hojas de cálculo y una presentación del programa; @RCO's HLB v1.0 determina el número, localización y tamaño de áreas regionales de control del HLB (ARCOs) (Figura 11), con base en el enfoque espacial.

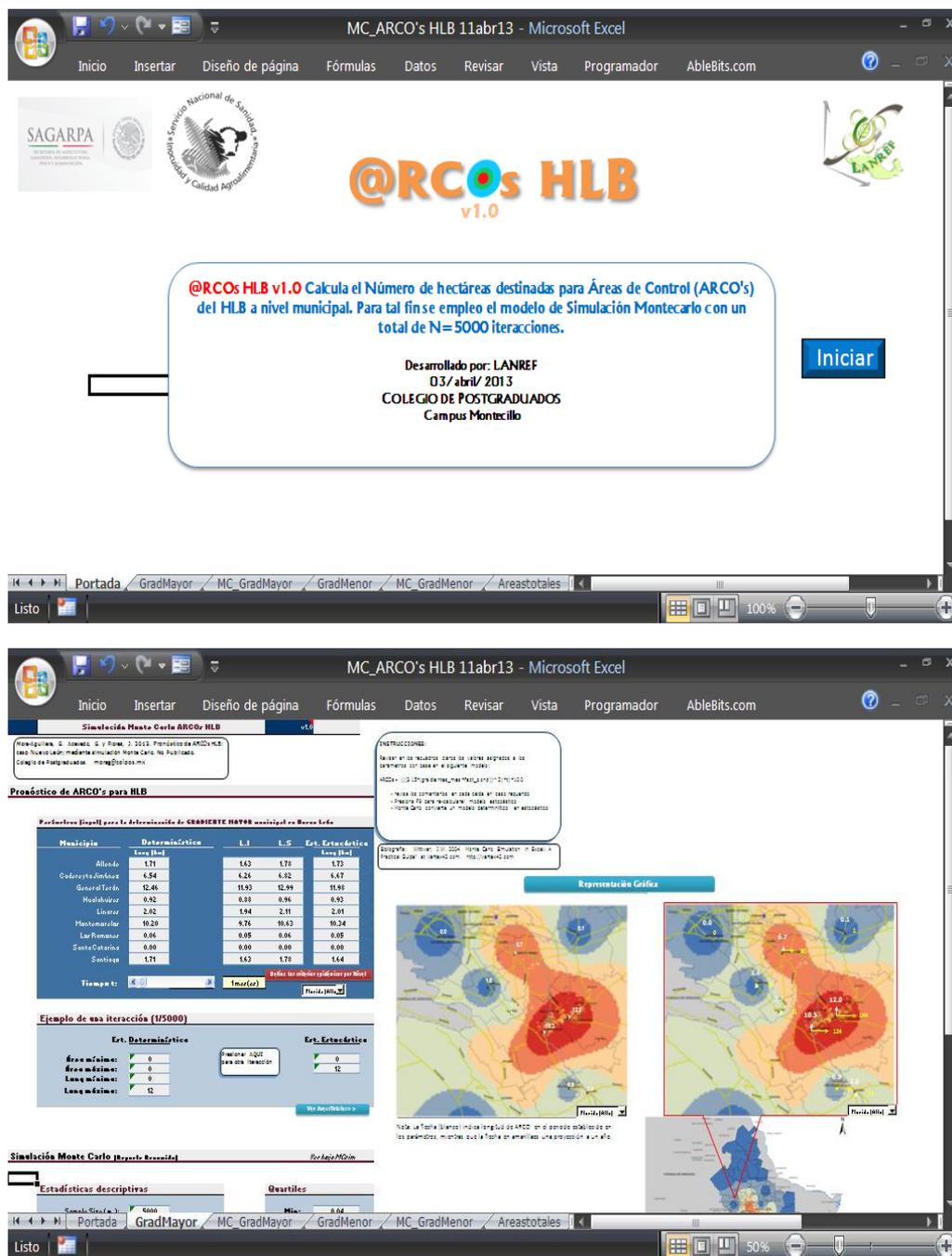


Figura 12. Aplicación @RCOs desarrollada en MS-Excel para la estimación de hectáreas en riesgo, a partir del riesgo regional y tasa de dispersión del HLB.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.1. Enfoque temporal (ET)

El uso de modelos temporales asociados a regiones epidémicas del HLB en México permitió estimar el número de hectáreas (ha) potenciales a ser establecidas en Áreas Regionales de Control de *D. citri* (ARCOs) para el manejo del HLB en el país.

La estimación de riesgo para hectáreas (ha) con HLB se realizó para el año 2015, la región de mayor riesgo fue el *GOLFO* y resto del país con 245,916 ha, la región de riesgo moderado fue *PCO* con 68,717 ha y la región con menor riesgo fue *PEN* con 23,195 ha, lo que corresponde al 73, 20 y 7% de la superficie citrícola establecida, respectivamente (Figura 12).

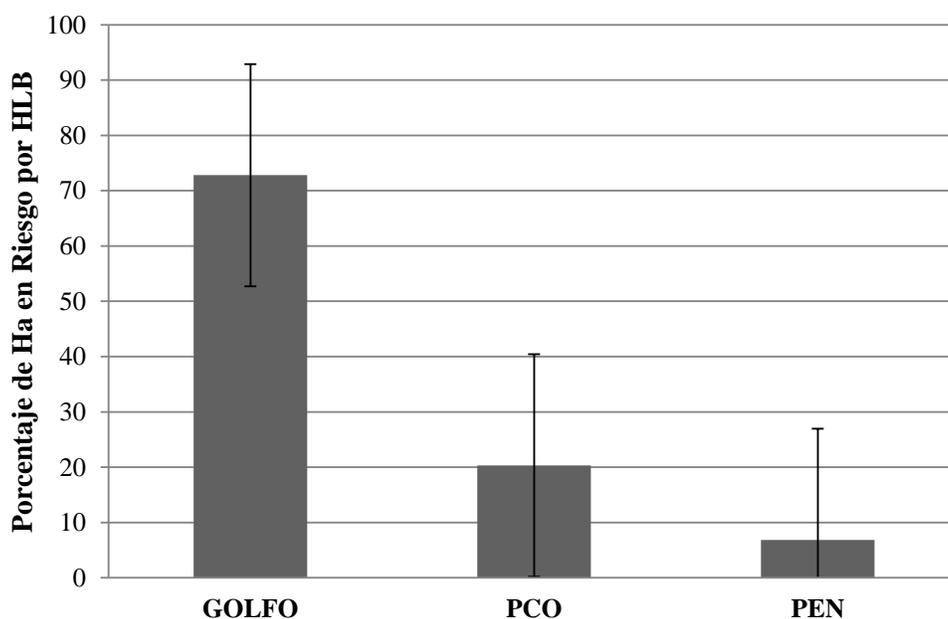


Figura 13. Porcentaje de hectáreas en riesgo con HLB estimadas mediante modelos temporales para el 2015, por región epidémica en México.

Este resultado es congruente con el *status* del HLB en México. La región con mayor riesgo es el Golfo y resto del país, la cual presenta la menor prevalencia del HLB en México (Figura 13). Notoriamente, *PEN* fue la región donde se detectaron los focos iniciales del HLB en México, y es la región con menor riesgo determinada con esta metodología, lo cual puede ser por la prevalencia del HLB en traspatios y las acciones de erradicación y control de DC realizadas con mayor énfasis por los Comités Estatales de Sanidad Vegetal (CESV) de esta región.

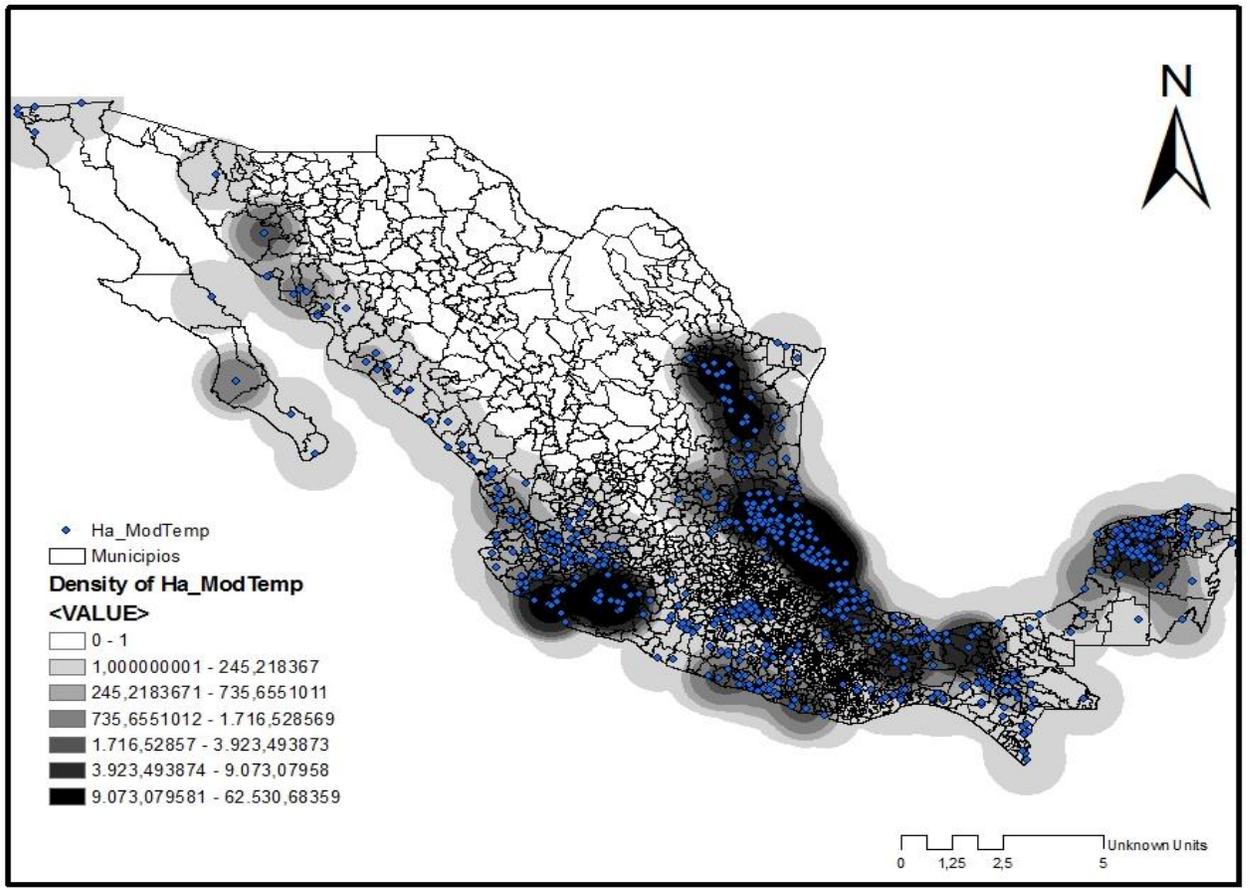


Figura 14. Mapa de hectáreas (ha) a establecerse en ARCOs para el manejo regional del HLB a nivel municipio para el 2015, estimadas con el enfoque temporal epidemiológico.

El análisis por región permitió determinar que en la región GOLFO los estados con mayor número de hectáreas (ha) a establecerse en ARCOs para el 2015 son Veracruz con 133,583 ha (54%), SLP, con 25,643 ha (10.4%), Tamaulipas, con 23,916 ha (9.7%), NL, con 20,434 ha (8.3%), Oaxaca, con 12,863 ha (5.2%); y Tabasco, con 10,277 ha (4%) (Figura 14). Por lo que las acciones de monitoreo y control de *D. citri* deberían enfatizarse en estos estados dentro de la región.

En la región PCO los estados con mayor riesgo fueron Michoacán con 42,700 ha (62%), Colima, con 19,661 ha (29%), Jalisco, con 3,100 ha (5%), Nayarit, con 2,153 ha (3%); y Sinaloa, con 1,102 ha (1%) (Figura 16).

En la región PEN el estado con mayor riesgo fue Yucatán con 14,412 ha (62%), Campeche, con 3,210 ha (14%), BCS, con 2,294 ha (10%), Q. Roo, con 2,169 ha (9%); y Chiapas, con 1,108 ha (5%) (Figura 15).

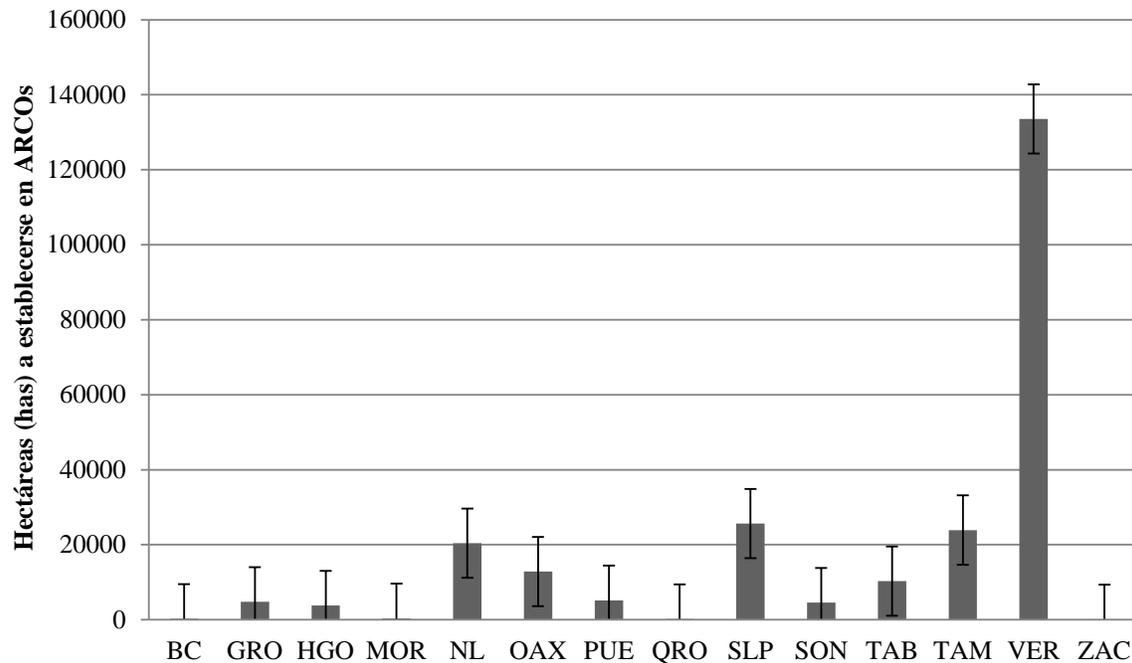


Figura 15. Hectáreas citrícolas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región *GOLFO*, la cual incluye los estados de BC (Baja California), GRO (Guerrero), HGO (Hidalgo), MOR (Morelos), NL (Nuevo León), OAX (Oaxaca), PUE (Puebla), QRO (Queretaro), SLP (San Luis Potosí), SON (Sonora), TAB (Tabasco), TAM (Tamaulipas), VER (Veracruz) y ZAC (Zacatecas), estimadas mediante el enfoque temporal epidemiológico.

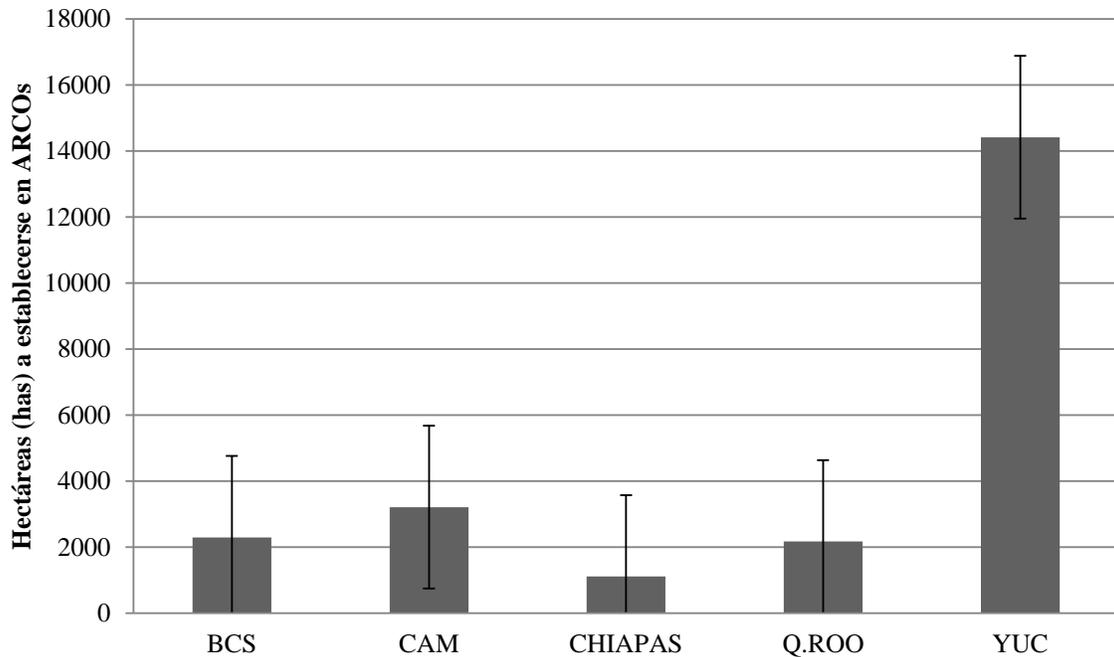


Figura 16. Hectáreas (ha) citrícolas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región *PEN*, la cual incluye los estados de BCS (Baja California Sur), CAM (Campeche), CHIAPAS (Chiapas), Q. ROO (Quintana Roo) y YUC (Yucatán), estimadas mediante el enfoque temporal epidemiológico.

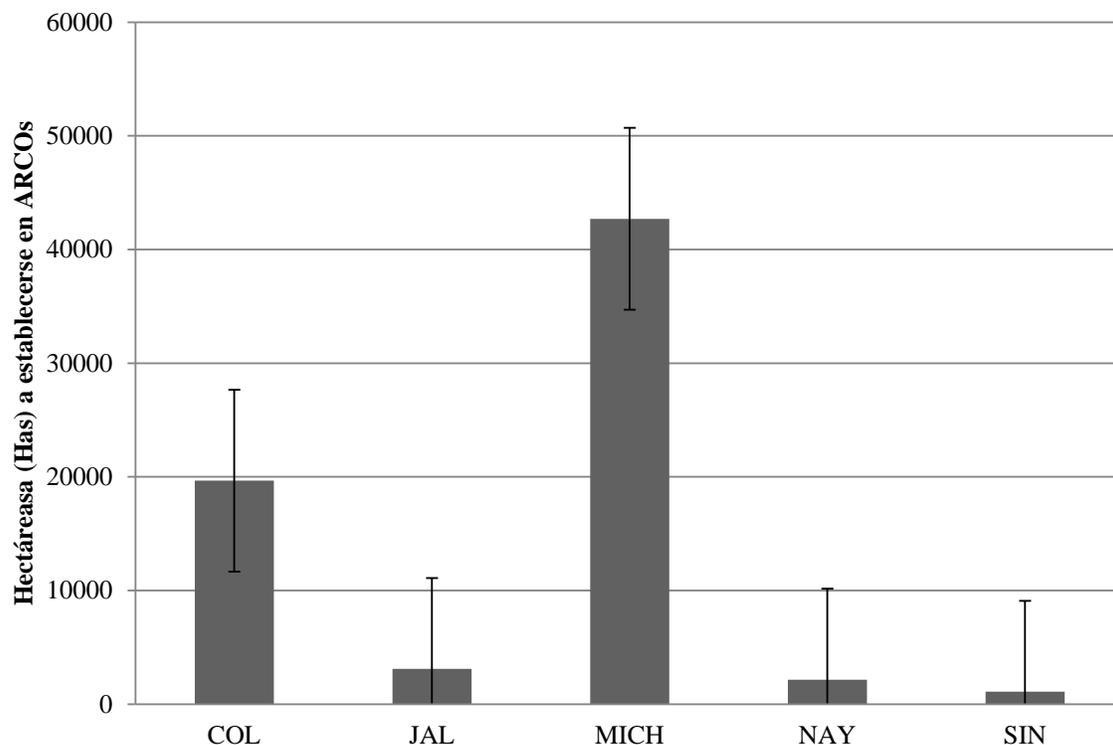


Figura 17. Hectáreas (ha) citricolas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región *PCO*, la cual incluye los estados de COL (Colima), JAL (Jalisco), MICH (Michoacán), NAY (Nayarit) y SIN (Sinaloa), estimadas mediante el enfoque temporal epidemiológico.

3.1.2. Enfoque espacial (*EE*)

La estimación de riesgo con esta metodología se realizó con la combinación de un factor de riesgo regional el cual se estimó mediante un método ponderativo de las variables de inductividad epidémica y con el potencial de dispersión del HLB.

La región de mayor riesgo fue el *GOLFO* y resto del país con 142,754 ha potenciales a enfermarse con HLB, la región de riesgo moderado fue *PCO* con 75,696 ha y la región con menor riesgo fue *PEN* con 25,469 ha, lo que corresponde al 59, 31 y 10%, respectivamente (Figura 17 y 18).

Esta metodología, se generó con elementos parciales de la propuesta de Áreas Regionales de Control del Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs) desarrollada para la definición del número, tamaño y localización de las mismas. Sin embargo, la propuesta planteada en este documento utiliza el área total de riesgo definida por el modelo y no es afectada por el componente logístico por capacidad operativa.

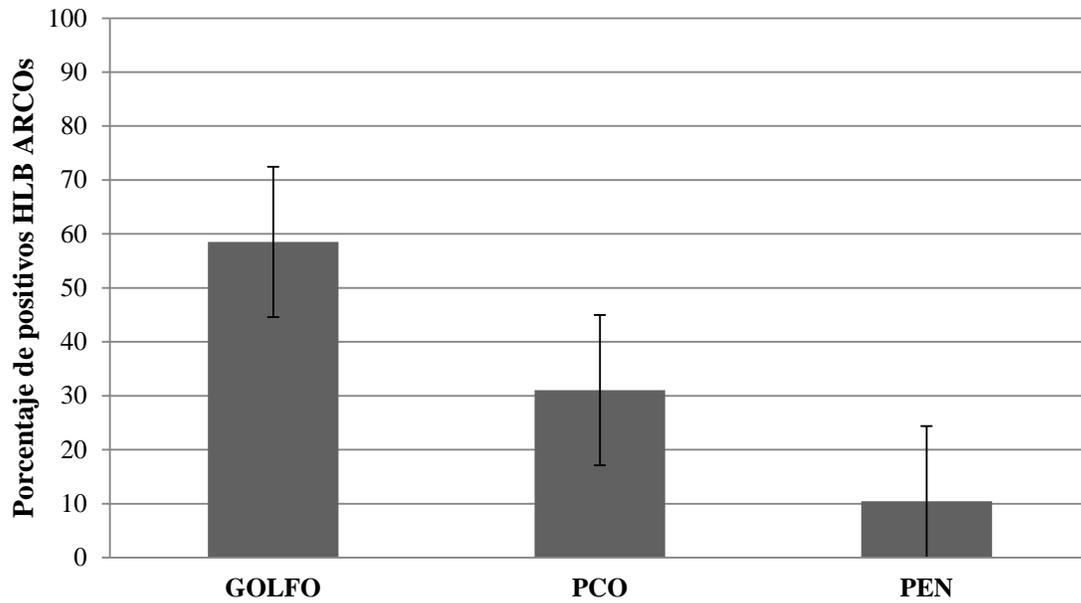


Figura 18. Hectáreas (ha) (%) a ser establecidas en ARCO para el manejo regional del HLB, estimadas con el método ponderativo de variables de inductividad epidémica y potencial de dispersión del HLB.

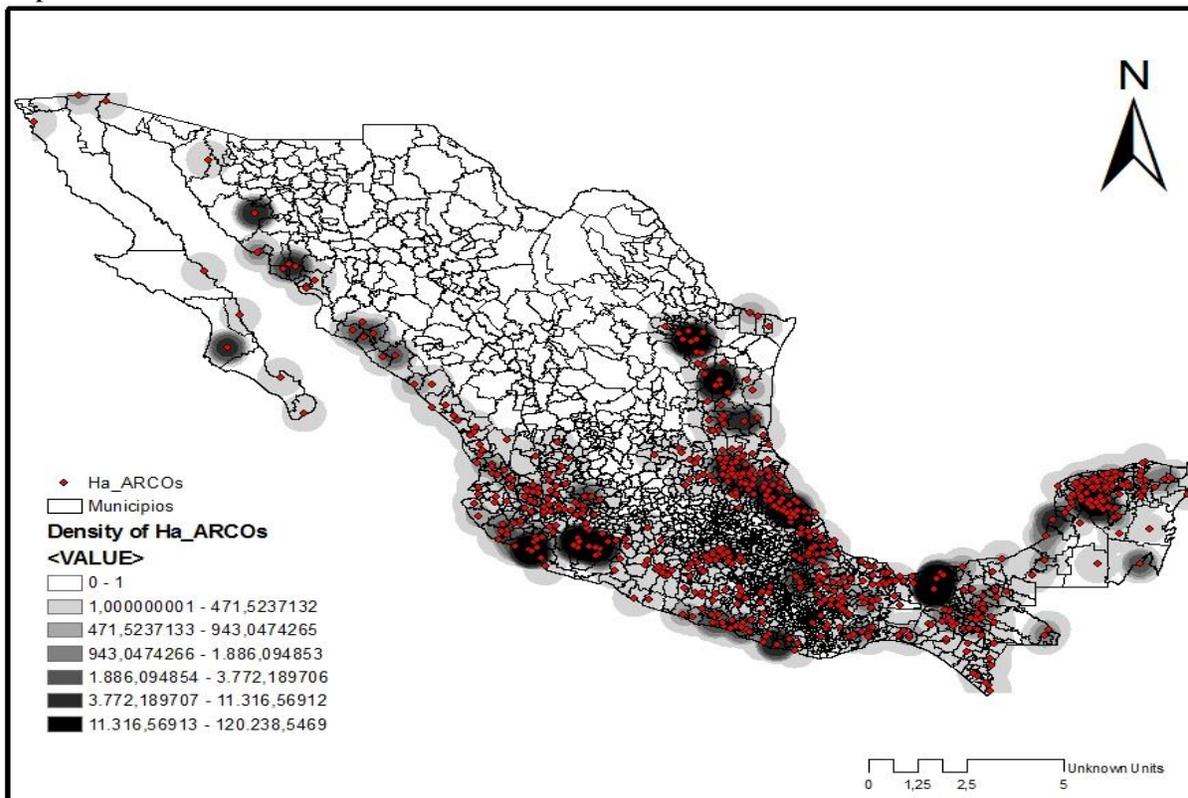


Figura 19. Mapa de hectáreas (ha) potenciales a ser establecidas en ARCO para el manejo regional del HLB, estimadas con el método ponderativo de variables de inductividad epidémica y potencial de dispersión del HLB.

El análisis por región permitió detectar diferencias en la estimación de las hectáreas potenciales a establecer en ARCOs. Para la región *GOLFO* los estados de mayor riesgo fueron Tabasco con 53,509 ha (38%), NL, con 21,188 ha (15%), Tamaulipas, con 18,059 ha (13%), Puebla, con 17,736 ha (12%), Oaxaca, con 8,339 ha (6%), Sonora, con 7,331 ha (5%); y Veracruz, con 4,227 ha (3%) (Figura 19). Aparentemente, Veracruz tiene un menor peso debido al potencial de dispersión del HLB y debido a la cobertura de monitoreo en los estados aledaños como Puebla, Tabasco y Tamaulipas.

En la región *PEN* también se observan cambios en la estimación con éste método ponderativo, el estado con mayor riesgo fue Yucatán con 13,630 ha (53.5%), Campeche, con 4,315 ha (17%), Chiapas, con 3,552 ha (14%) BCS, 2,675 ha (11%); y Q. Roo con 1,297 ha (5 %) (Figura 20).

En la región *PCO* los estados con mayor riesgo fueron Michoacán con 45, 171 ha (60%), Colima, con 20,834 ha (28%), Jalisco, con 4,649 ha (6%), Sinaloa, con 3,869 ha (5.2%); y Nayarit con 1,171 ha (2%) (Figura 21).

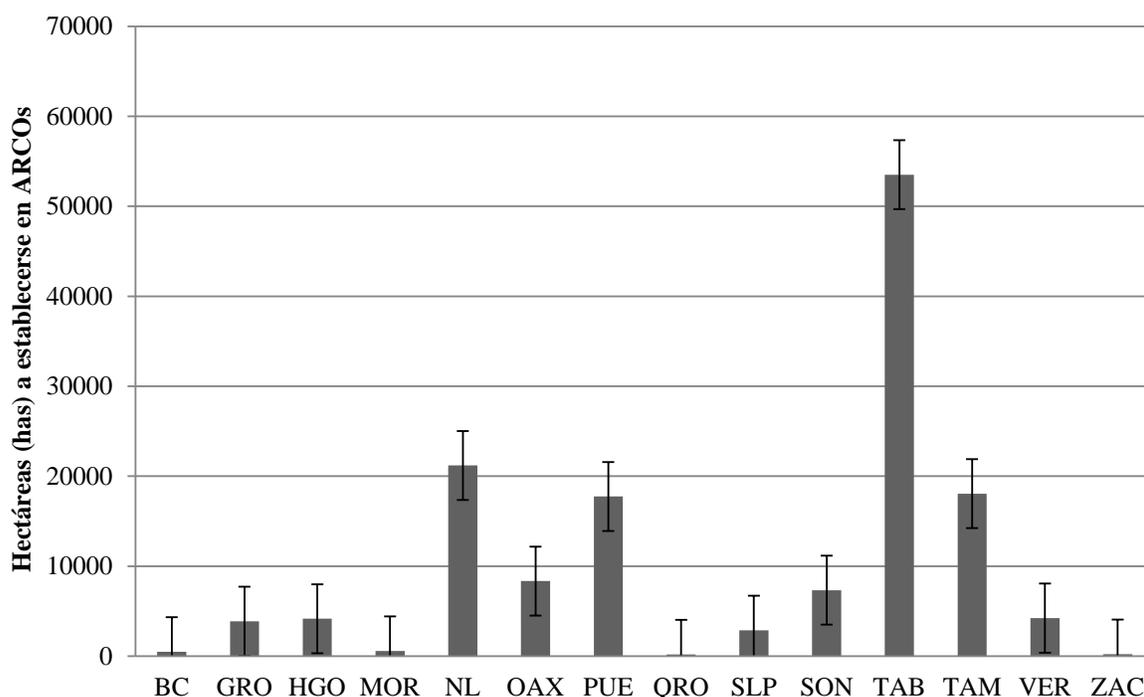


Figura 20. Hectáreas (ha) citricolas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región *GOLFO*, la cual incluye los estados de BC (Baja California), GRO (Guerrero), HGO (Hidalgo), MOR (Morelos), NL (Nuevo León), OAX (Oaxaca), PUE (Puebla), QRO (Queretaro), SLP (San Luis Potosí), SON (Sonora), TAB (Tabasco), TAM (Tamaulipas), VER (Veracruz) y ZAC (Zacatecas), estimadas mediante el enfoque espacial epidemiológico.

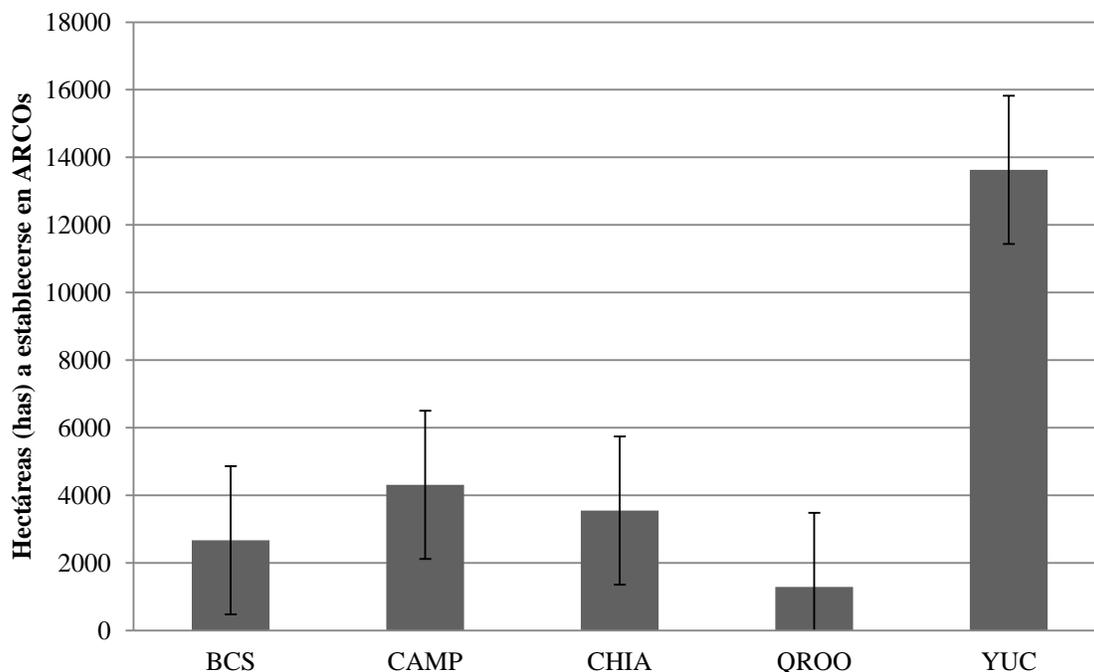


Figura 21. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región *PEN*, la cual incluye los estados de BCS (Baja California Sur), CAM (Campeche), CHIAPAS (Chiapas), Q.ROO (Quintana Roo) y YUC (Yucatán), estimadas mediante el enfoque espacial epidemiológico.

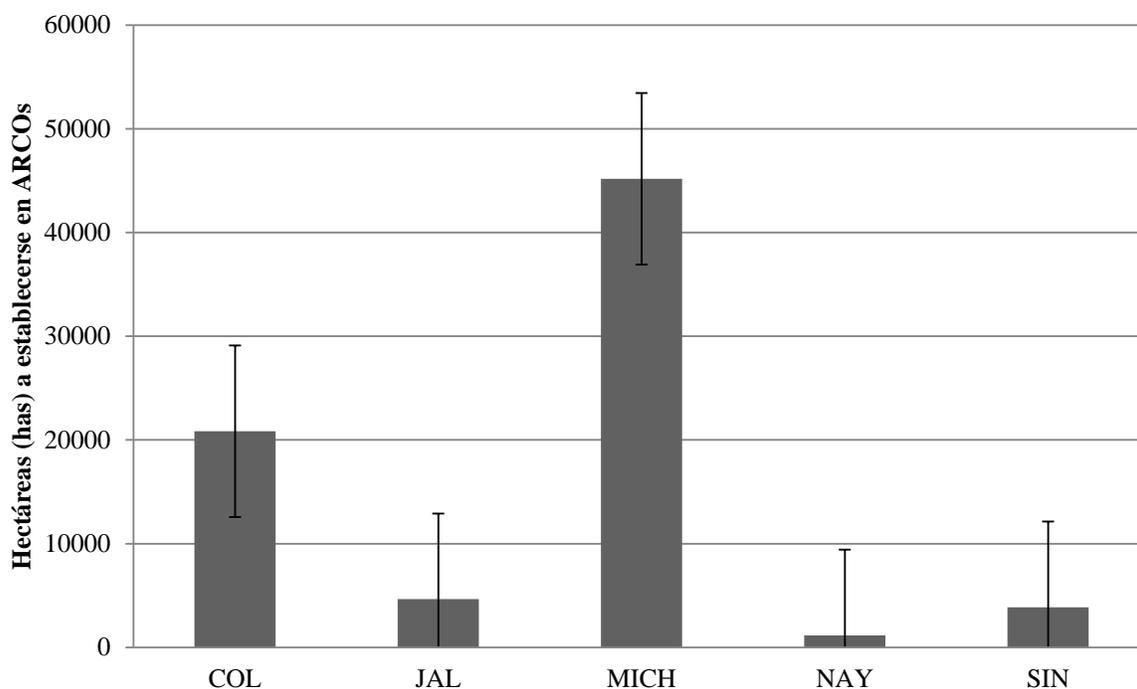


Figura 22. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB en la región *PCO*, la cual incluye los estados de COL (Colima), JAL (Jalisco), MICH (Michoacán), NAY (Nayarit) y SIN (Sinaloa), estimadas mediante el enfoque temporal epidemiológico.

3.1.3. Análisis integrativo del *ET* y *EE*

Las estimaciones de hectáreas con potencial para establecerse en ARCOs para el manejo del HLB generadas con ambos enfoques epidemiológicos son coincidentes y definen la región GOLFO como la de mayor riesgo y en la cual se debería priorizar estratégicamente bajo un escenario de recursos humanos y económicos limitados; sin embargo, el resto de las regiones deben ser atendidas con una mínima superficie. Los resultados indican que el enfoque temporal (*ET*) podría ser empleado como un escenario agresivo, mientras que el enfoque espacial (*EE*) representa un escenario moderado para un planteamiento a gran escala (p.e. nacional) de manejo del HLB, ya que con *ET* se estimaron 337,828 ha y con *EE* 243,919 ha, lo que representa el 67.5% y 48.7% de la superficie citrícola del país, respectivamente.

En la región *GOLFO* Veracruz, SLP, y Tabasco, el *ET* tiende a sobrestimar la estimación de las ARCOs ($r^2=0.02$), en comparación con *EE* ($r^2=0.90$) (Figura 22); esto podría deberse a que con *ET* se emplearon modelos temporales de epidemias de Yucatán a nivel regional y Campeche a nivel municipal (Cuadro 1), por similitud regional y falta de estudios específicos para estos estados por ausencia del HLB, mientras que el *EE* emplea el factor de riesgo regional como criterio inherente a cada región citrícola. Por lo que variables de inductividad epidémica como la diversidad de especies (Naranja=213,000 ha, LP= 36,308 ha, MD= 10,474 ha y T=7,300 ha) en Veracruz, SLP, y Tabasco podría tener un efecto al maximizar la estimación con el modelo multidimensional generado con *ET*.

Esta hipótesis se validó con otros estados de la región GOLFO como NL y Tamaulipas, los cuales tienen menor diversidad de especies, con prevalencia de Naranja y Toronjo, donde la estimación de hectáreas en riesgo fue similar con ambos métodos (Figura 22).

Adicionalmente, el análisis de regresión lineal entre la hectáreas estimadas con ambos métodos, sin incluir a Veracruz, SLP y Tabasco, el coeficiente de correlación mejora considerablemente ($r^2=0.9$) (Figura 23), lo cual sugiere que la estimación con ambas metodologías es confiables y que el *ET* podría emplearse bajo la premisa de un escenario agresivo en comparación con *EE*. Ambas propuestas robustecen y coadyuvan a la estrategia ARCOs, al optimizar los recursos económicos y humanos administrados por el SENASICA-DGSV, para el manejo regional del HLB en México.

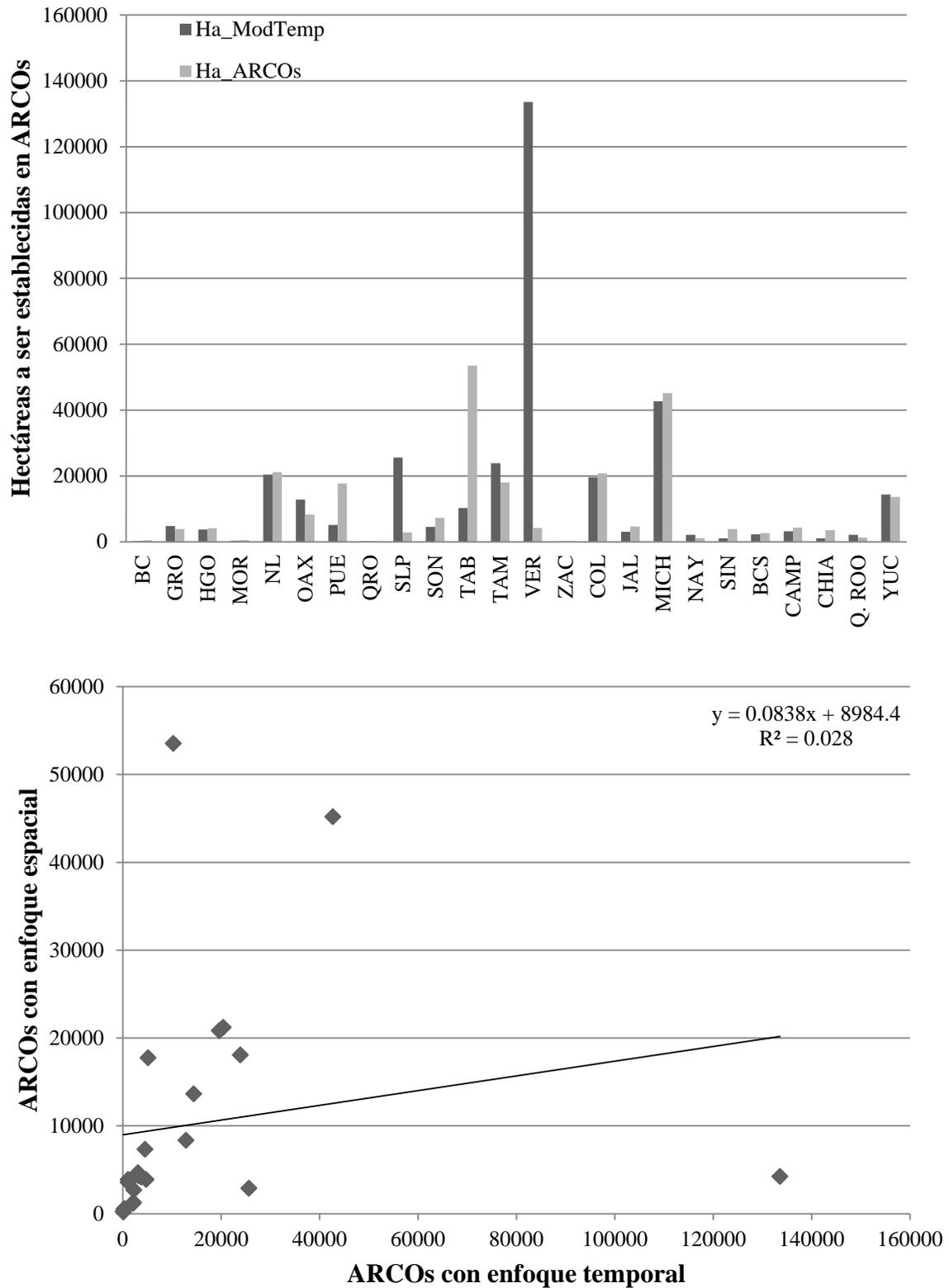


Figura 23. Gráficos comparativos de las hectáreas estimadas con el enfoque temporal (ET) y con el enfoque espacial (EE), considerando todos los estados citrícolas.

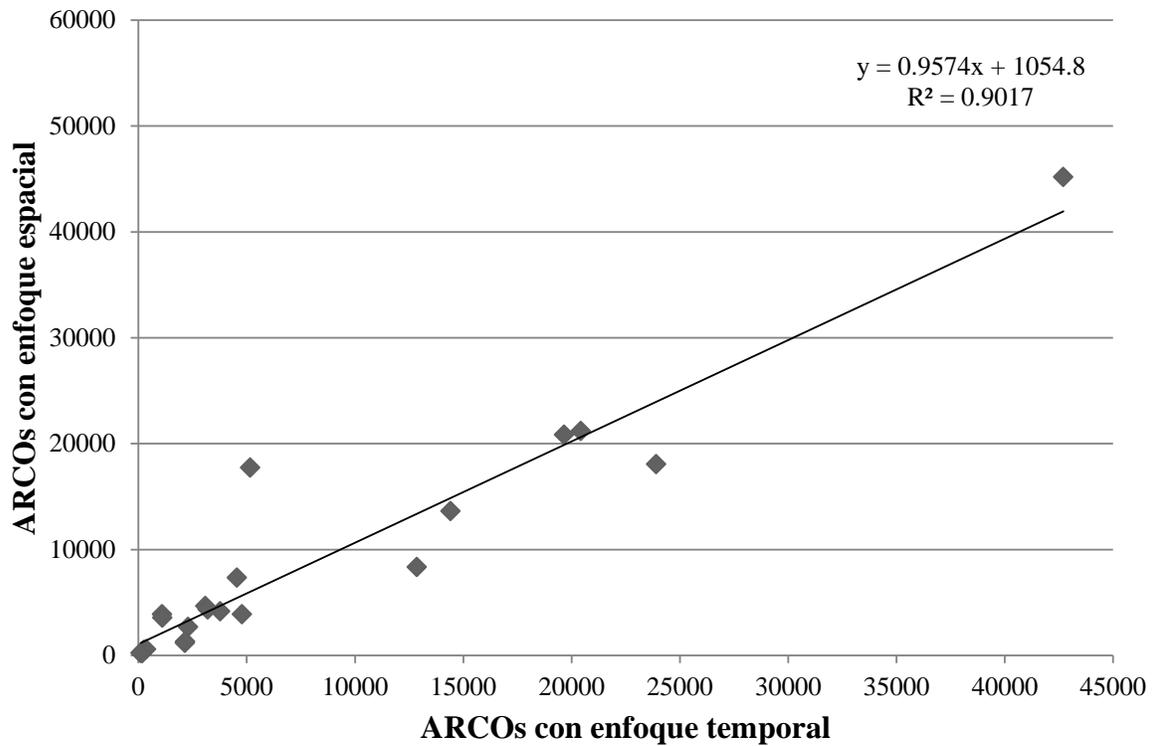
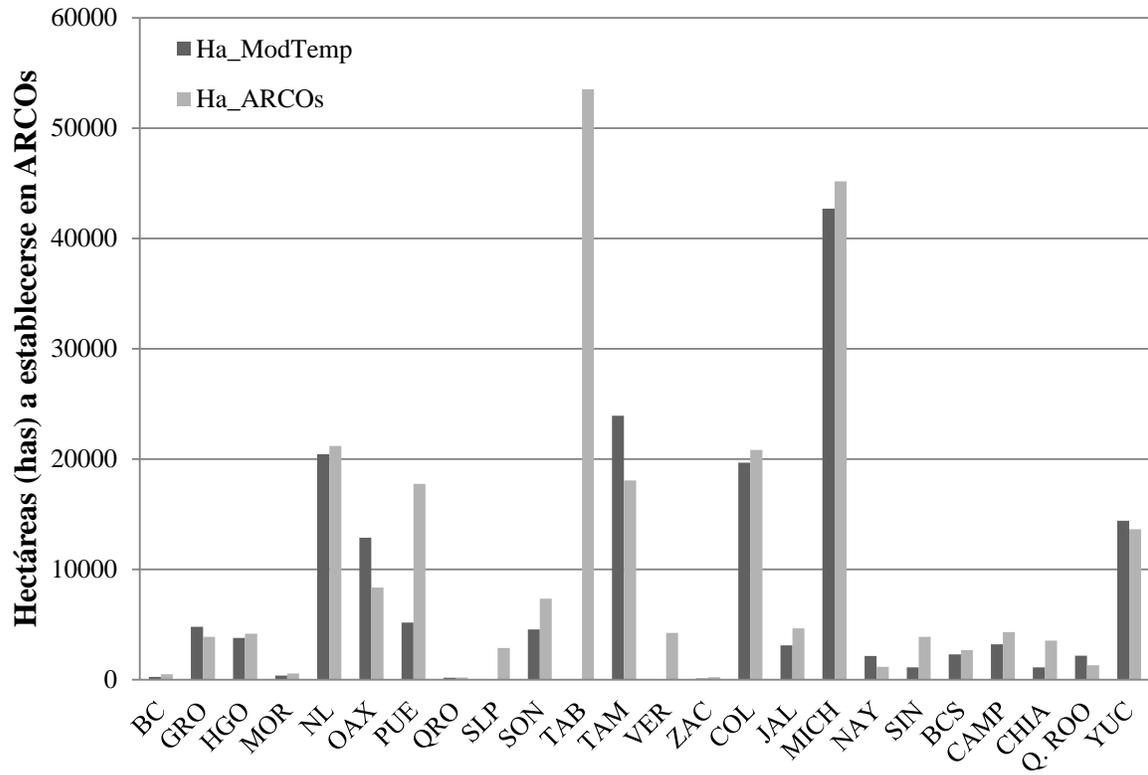


Figura 24. Gráficos comparativos de las hectáreas estimadas con el enfoque temporal (ET) y con el enfoque espacial (EE), sin datos de Veracruz, SLP y Tabasco.

Coincidentemente, la ubicación de las ARCOs mediante mapas interpolados de las hectáreas estimadas con ambos métodos sugiere que en la región *GOLFO* el *ET* (Figura 24A) maximiza el riesgo y asigna mayor superficie (ha) en los estados de Veracruz, SLP, y Tabasco, en comparación con *EE* (Figura 24B), el cual podría reducir el efecto por consideración de las variables de inductividad epidémica del HLB.

En la región *PEN*, ambas metodologías explican adecuadamente el riesgo del HLB, ya que discriminan cuatro áreas que requieren ser incorporadas en las ARCOs, las cuales corresponden a las zonas de producción de cítricos de los estados de Yucatán, Campeche, y Quintana Roo (Figura 25 A y B).

En la región *PCO*, los mapas también sugieren que ambos métodos serían adecuados, ya que la definición de las ARCOs coinciden con las zonas de mayor intensidad epidémica del HLB en los estados de Colima, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Sinaloa (Figura 26 A y B), Sonora, BC y BCS (Figura 27 A y B). Sin embargo, la estimación con el *ET* sugiere un escenario más agresivo, el cual en el caso de esta región requiere considerarse debido al estatus endémico del HLB (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; SENASICA, 2015); probablemente, lo adecuado sería enfatizar los recursos en la región del GOLFO puesto que el escenario epidémico de esta enfermedad es de riesgo por procesos de dispersión activa, asociada a los casos de muestras positivas recientemente detectados en planta y vector (SENASICA, 2015).

Adicionalmente, en la región *PCO* por su condición endémica del HLB específicamente en el estado de Colima se desarrolló una plataforma WEB en fase inicial llamada Sistema Regional para el Manejo Integrado del HLB (*SIREMI-HLB*) con el fin de disponer de una herramienta electrónica para coadyuvar al manejo del HLB con un enfoque regional, la cual considera al productor como el eje integrador y responsable de la accionabilidad del manejo recomendado mediante la integración de insumos científicos, tecnológicos y empíricos (Anexo 4).

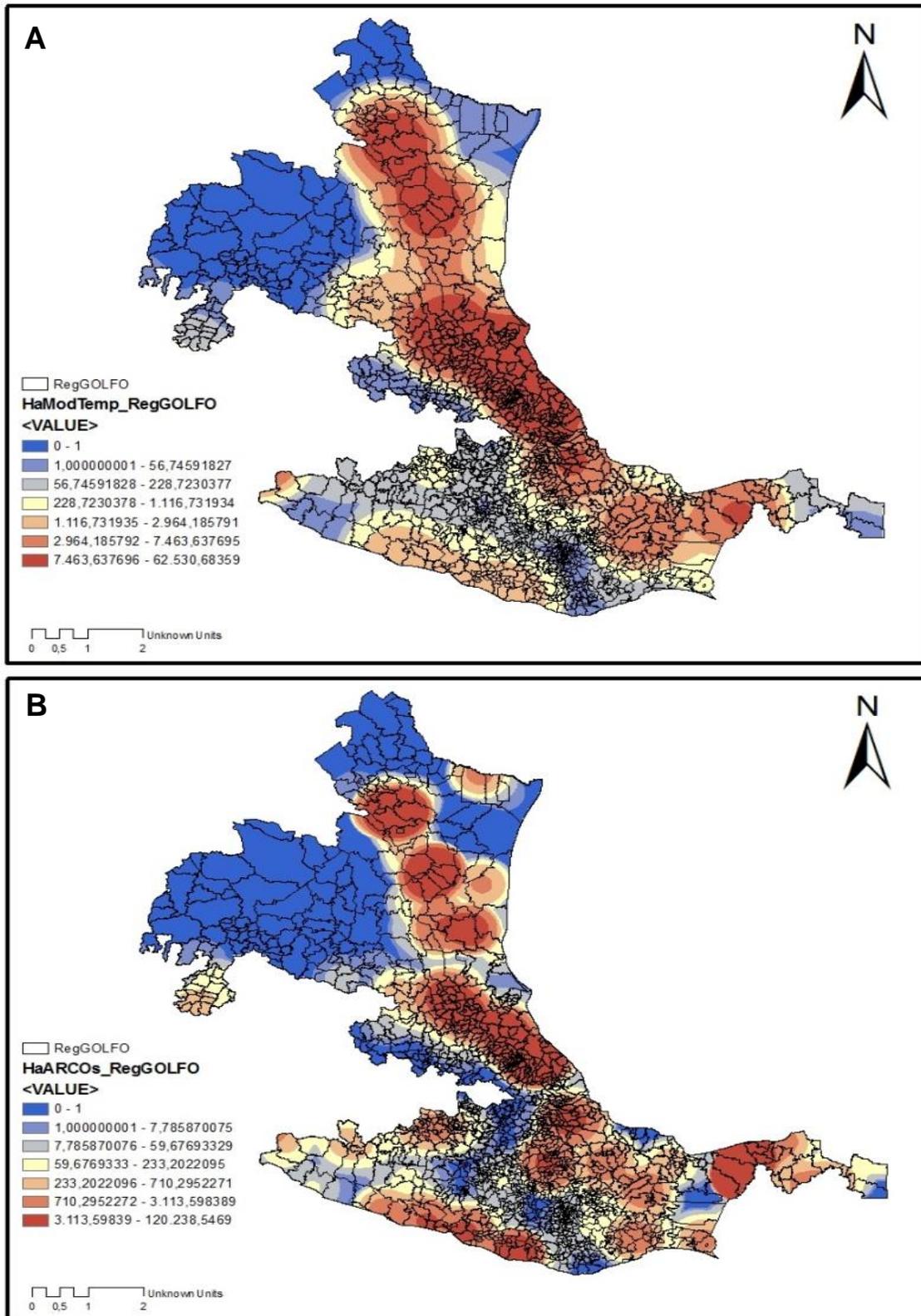


Figura 25. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB en la región GOLFO, estimadas mediante las metodologías: A) modelos temporales y B) método ponderativo.

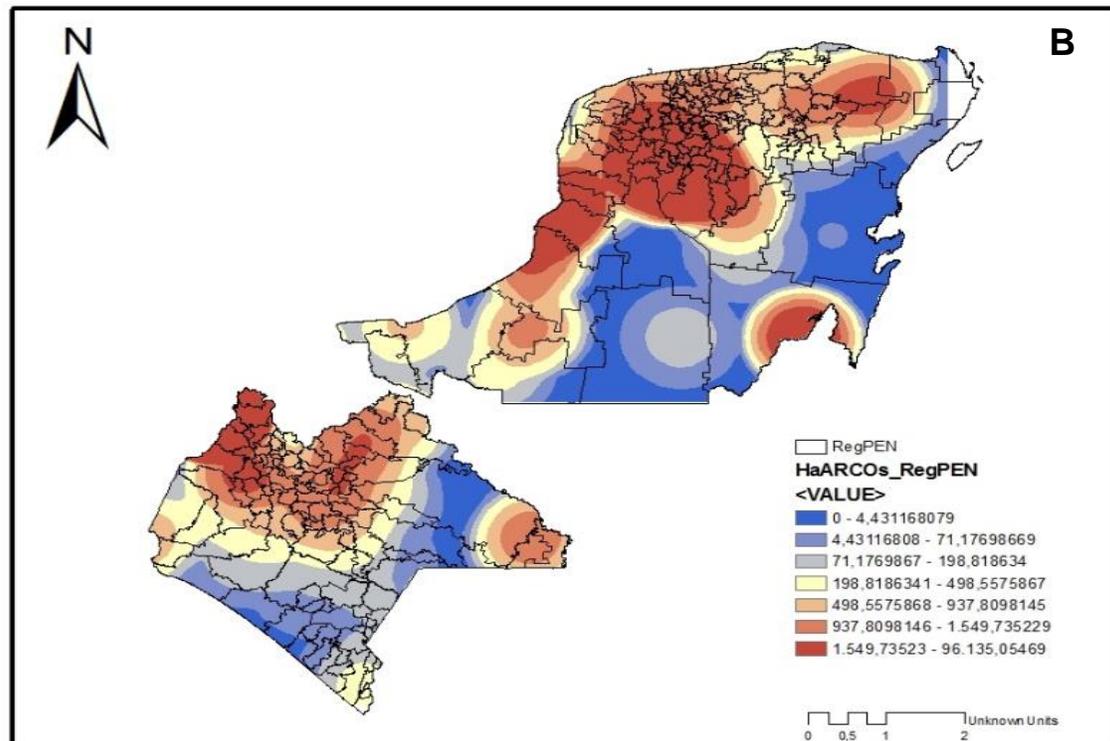
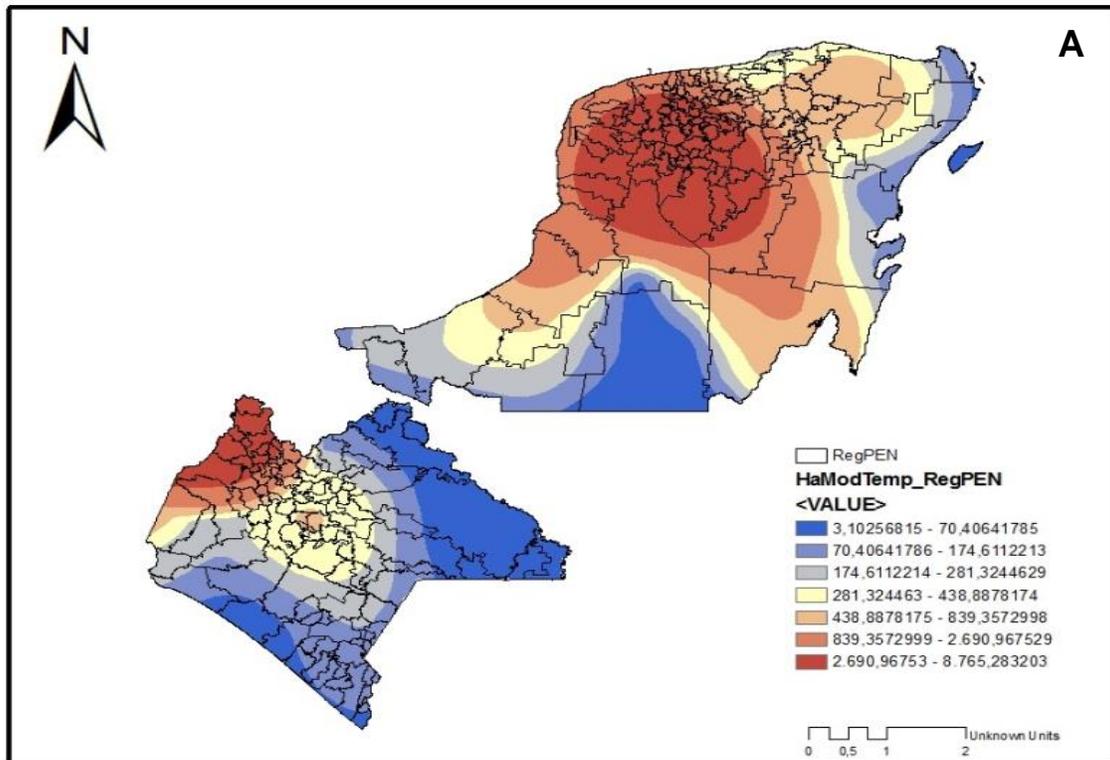


Figura 26. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB en la región PEN, estimadas mediante las metodologías: A) modelos temporales y B) método ponderativo.

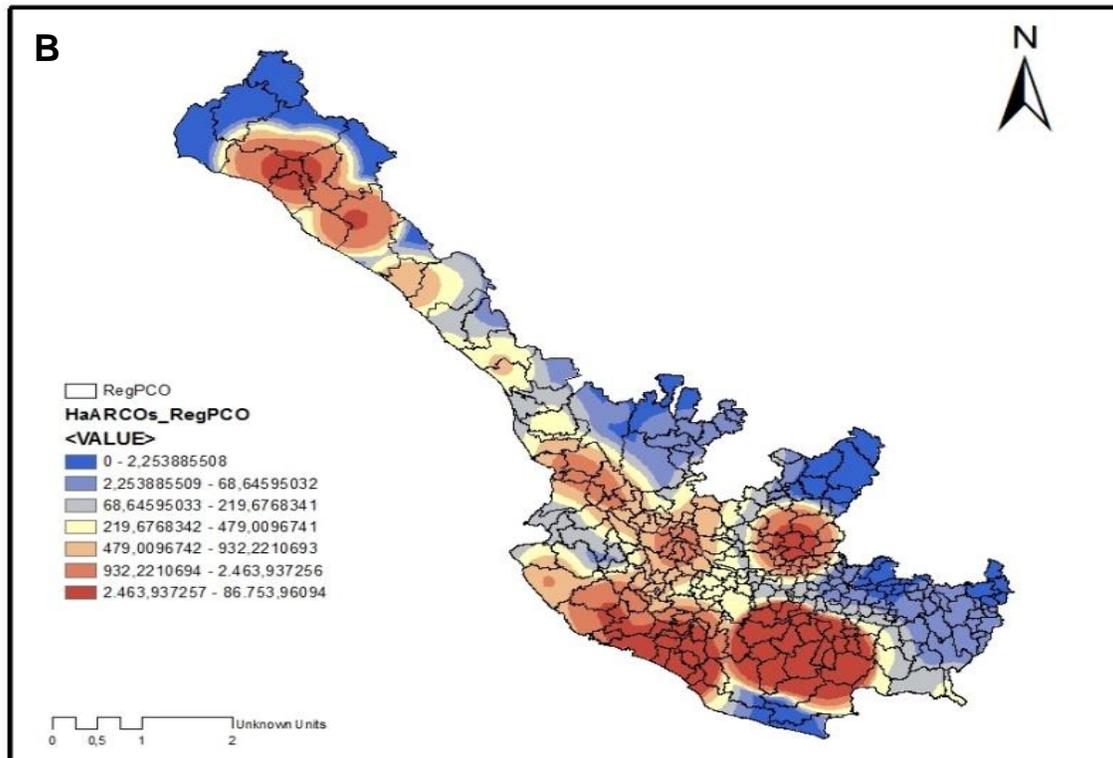
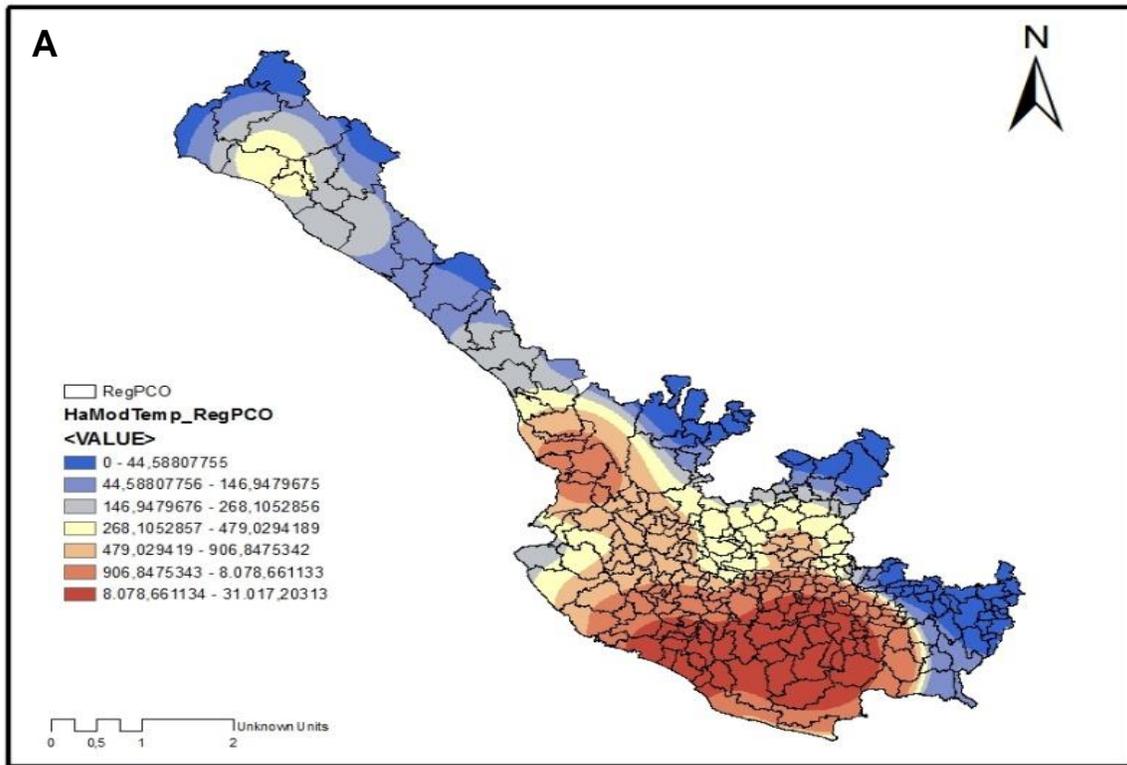


Figura 27. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB en la región PCO, estimadas mediante las metodologías: A) modelos temporales y B) método ponderativo.

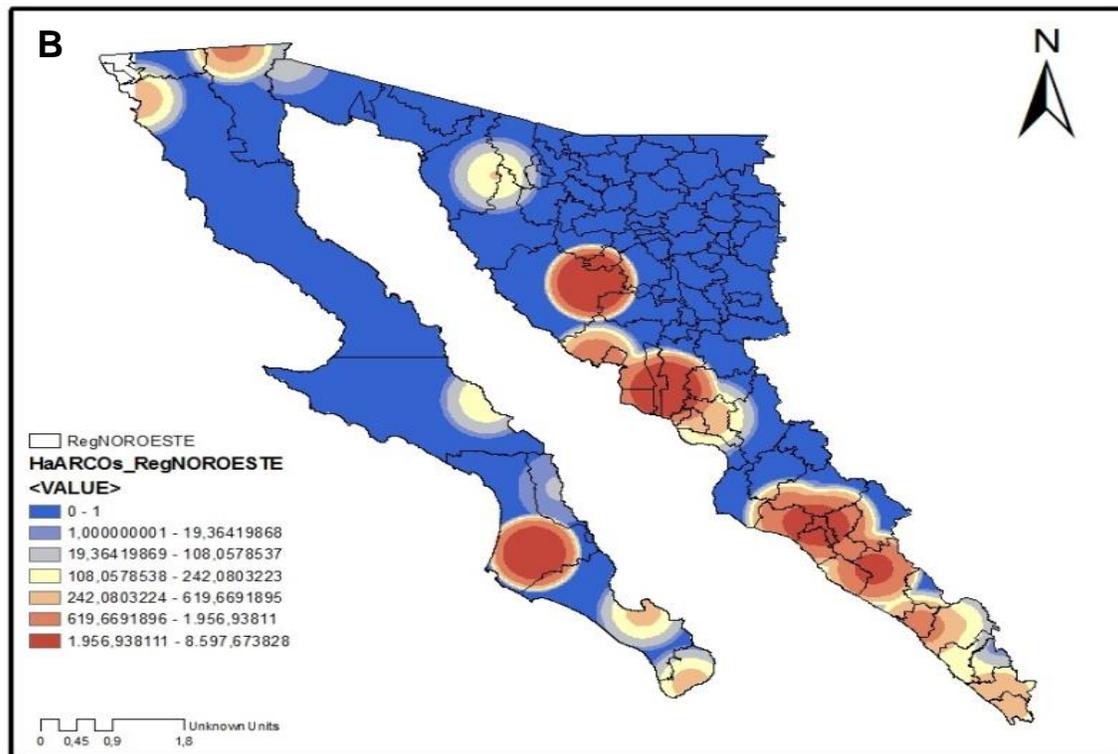
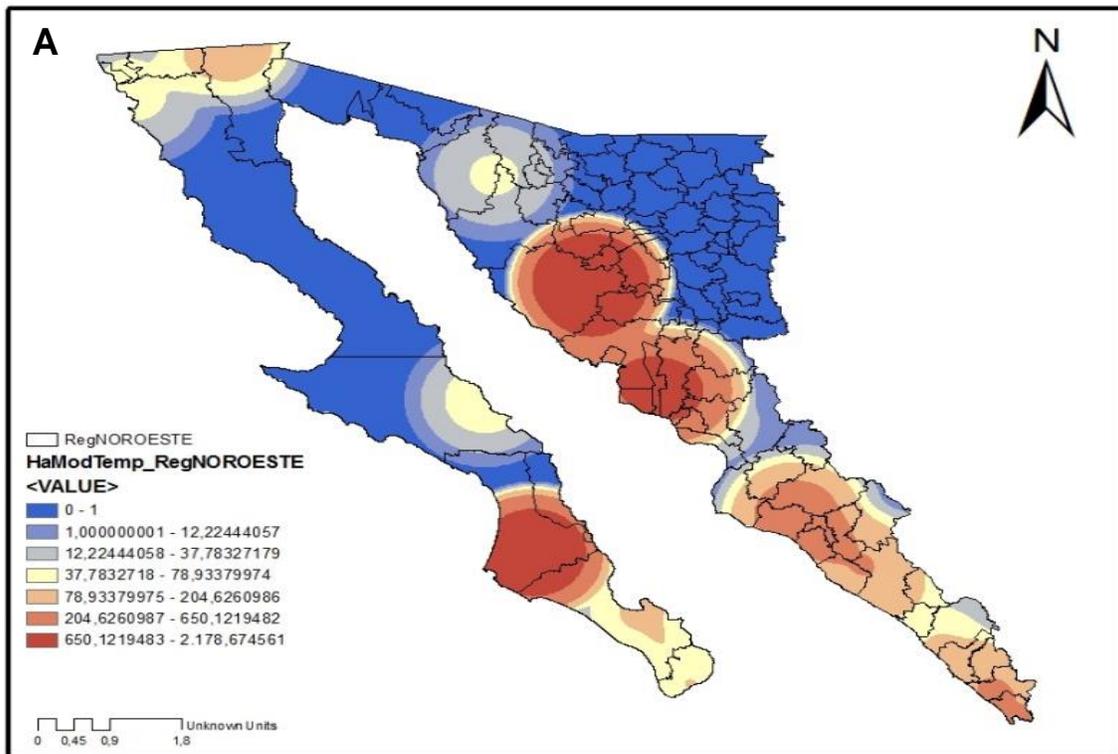


Figura 28. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB en la región PCO, estimadas mediante las metodologías: A) modelos temporales y B) método ponderativo.

El uso de los enfoques espacial y temporal para estimar el riesgo de dispersión y establecimiento de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) tuvo como fin proporcionar estimaciones regionales de riesgos bajo la premisa de que la dispersión y el incremento de la incidencia del HLB es gradual, no lineal, y con una tasa dependiente de factores climáticos, varietales, manejo productivo y biológicos (asociados al vector *Diaphorina citri* y CLAs) (Mora-Aguilera *et al.*, 2013; 2014; Bassanezi *et al.*, 2013; Salcedo *et al.*, 2010), a partir de los cuales se estimarán las ARCOs con *ET* y *EE*. En esta concepción también se incorporó el efecto de cronicidad inherente a una infección sistémica como la inducida por CLAs. Los enfoques empleados en este estudio tienen dos implicaciones en esta concepción:

- Aplicación de un modelo(s) temporal que estima la gradualidad infecciosa en un horizonte de tiempo (*ET*).
- Desarrollo de un modelo(s) espacial que estima la gradualidad infecciosa en un área (*EE*).

Si bien existen otros estudios que analizaron el efecto del control local versus el control regional, como bases para plantear que la estrategia más adecuada y sustentable para el manejo del HLB es el control regional (Bassanezi *et al.*, 2013), y que las áreas CHMAs deberían definirse con base en criterios de riesgo para priorizar su tamaño, localización y número (Gottwald *et al.*, 2014), dichos estudios omitieron el efecto temporal de dispersión, direccionalidad y velocidad de la misma, lo cual en la presente propuesta se integró al enfoque espacial como un componente esencial para definir el tamaño de las ARCOs. Con lo anterior, se espera que bajo las condiciones de pequeños productores y un escenario de recursos humanos y financieros que caracteriza a México, esta propuesta tenga gran aplicación en la reducción de la dispersión y carga de inóculo de CLAs.

4. CONCLUSIONES

La aplicación de criterios biológicos y epidemiológicos con enfoque regional permite proporcionar estrategias racionales para la determinación de riesgo, el cual se emplea para el establecimiento de Áreas Regionales de Control de *Diaphorina citri* (ARCOs), con base en los principios de prevención (riesgo) y protección (endemicidad) como estrategia esencial para el manejo del HLB en México.

Ambos enfoques epidemiológicos, el temporal y el espacial, que se emplearon en esta investigación resultaron ser adecuados para la estimación de las ARCOs por su justificación epidemiológica. El *ET* se podría utilizar para escenarios agresivos donde el área en riesgo es mayor; en este caso las estimaciones de ARCOs tanto en la región *GOLFO* como *PAC* resultaron mayores a las de *EE*, por lo que éste último podría representar un escenario moderado.

A nivel nacional con *ET* se recomienda establecer en ARCOs 337,828 ha y con *EE* se sugieren 243,919 ha, lo que representa el 67.5% y 48.7% de la superficie citrícola del país, respectivamente

La propuesta de ARCOs con la integración del enfoque temporal y el enfoque espacial permite priorizar la superficie citrícola programada para aplicar medidas de manejo del HLB, para optimizar los recursos humanos y financieros contemplados para el control del insecto en áreas estratégicas identificadas para reducir la dispersión y carga de inóculo de CLas bajo las condiciones de México.

5. REFERENCIAS

1. Arredondo-Bernal, H. 2013. Control Biológico: Componente de las Áreas Regionales de Control del PAC. *In: Memorias de la Reunión Nacional de Sanidad Vegetal. México, D.F. 16-19 Abril. SENASICA México.*
2. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L. and Bergamin Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease*, 97:789-796.
3. Bassanezi, R. B. 2012. Epidemiology of Huanglongbing in Citrus. IV Simposio Nacional y III Internacional sobre Bacterias Fitopatógenas. Guadalajara. Jalisco. México.
4. Bassanezi, R. B., Busato, L. A., Bergamin-Filho, A., Amorim, L. and Gottwald, T. R. 2005. Preliminary spatial pattern analysis of Huanglongbing in São Paulo, Brazil. *In: Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA: IOCV, 341–55.*
5. Belasque, J. J., Filho, B. A., Bassanezi, B. R., Barbosa, J. C., Fernandes, G. N., Yamamoto, T. P., Lopes, A. S., Machado, M. A., Pereira-Leite, J. R. Ayres, J. A. and Massari, C. A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*. 34(3): 137-145.
6. Bové, J. M. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo, State, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 94 (3): 465-467.
7. Cabrera-Hidalgo, A., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Rebollar-Alviter, A. y Marbán-Mendoza, N. 2014. Ocurrencia de *Nacobus aberrans* en Cultivos Hortícolas del Noroeste de Michoacán, México. *Nematropica* 44: 107-117.
8. Domínguez-Monge, S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 63 pp.
9. Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J.J., Manzanilla-Ramírez, M.A., Flores-Sánchez, J.L. y López-Arroyo, J.I. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con

- Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8):769-782.
10. Esquivel-Chávez, F. 2011. Análisis Histológico y Epidemiológico de limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 56 pp.
 11. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., Rivas-Valencia, P., Ruiz-García, N., López-Arroyo, J. I., Hernández-Chan, E., Novelo-Cocon, A., López-Sánchez, P., y Sánchez-Rebolledo, F. 2011. Gradientes de Dispersión del HLB a partir de Focos Iniciales de Infección en la Península de Yucatán. (Presentación en poster) *In: Memoria del 2do. Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 5 y 6 de Diciembre. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. pp: 83-87.*
 12. Góngora, K. C. 2004. Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del Citrus Tristeza Closterovirus en Tamaulipas, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 90 pp.
 13. Gottwald, T., Luo, W., Riley, T. and Parnell, S. 2014. Commercial risk-based survey for HLB and implications for efficacy of Citrus Health Management Areas (CHMAs). *Journal of Citrus Pathology* 1: 110-11.
 14. IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). 2012. IRAC MoA Classification Scheme. IRAC International MoA Working Group. IRAC executive. Version 7.2 23 p.
 15. Irely, M. 2009. Current Status of Management in Florida. Taller Internacional de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. Villahermosa, Tabasco.
 16. Jesús Junior, W.C., Pozza E.A., Vale, F.X.R., Mora-Aguilera, G. 2005. Análise Temporal de Epidemias. 127- 191p. in: *Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas*. Vale, F.X.R., Jesús Junior, W.C., Zambolim, L. (eds). Perffil Editora (Brasil).
 17. López-Arroyo, J.I. y Rocha-Peña, M (Eds.) 2012. 3º Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Memorias. 10-12 diciembre, Veracruz Ver.

18. Loeza-Kuk, E., Jasso-Argumedo, J., Lozano-Contreras, M., Hernandez-Chan, E. 2010. Dispersión *Candidatus Liberibacter* spp. en huertas cítricas de Yucatán, México. *In:* 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 8 y 9 de diciembre. Monterrey, N. L. pp:125-134.
19. Márquez, P. F., Márquez, G. J., Rodríguez, M. M. L., Esquivel, C. F., Mora, A. G. y Acevedo, S. G. 2011. Análisis espacial y temporal del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en el municipio de Xalisco, Nayarit. *In:* 2do. Taller Internacional de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. 1519 de agosto. Manzanillo, Col.
20. Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Flores-Sánchez, J. L., González-Gómez, R. and Robles-García, P. 2013. Applied Epidemiology to Plant Disease Risk Analyses. Pp. 27-29 *In:* IV Brazilian Workshop of Plant Disease Epidemiology. December 2nd-4th. Curitiba-Parana, Brazil.
21. Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Velázquez-Monreal, J. J., Flores-Sánchez, J. L., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S. y González-Gómez, R. 2014. Situación Actual y Perspectivas de Manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108-119.
22. Mora-Aguilera, G. and Campbell, C. L. 1997. Multivariate techniques for selection of epidemiological variables. Pp 51-58 *In:* Exercises in Plant Disease Epidemiology. (Francl, L. J. and Neher, D. A. eds) APS Press. St. Paul Minnesota, USA. 233 p.
23. OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). 2013. Norma Regional de Sanidad Vegetal (NRSV): Lineamientos de Armonización Normativa Regional de Certificación Fitosanitaria de Material Propagativo de Cítricos.
24. Pacheco, C. J., Samaniego, R. J. y Fontes, P. A. 2012. Tecnología para el manejo integrado del psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae) en cítricos en Sonora. Folleto Técnico No. 88. INIFAP.
25. Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal. J. J., Manzanilla-Ramírez. M. A., Orozco-Sánchez. M., Medina-Urrutia. V. M., López-Arroyo, J. I. y Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19(1): 15-31.

26. Robles, G. P. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>.
27. Rogers, M. E., P. A. Stansly and L. L. Stelinski. 2010. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a Psyllid Management Plan. University of Florida, IFAS Extension, Gainesville, FL. <http://www.crec.ifas.ufl.edu/chma/>
28. Ruiz-Cancino, E., Coronado-Blanco, J. M., y Myartseva, S. N. 2008. Psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae). *In*: Casos de Control Biológico en México Arredondo , H.C., y Rodríguez del Bosque, LA. (Eds.)Ed. Mundi-Prensa. 323-331 pp.
29. Salcedo, B, D., Hinojosa, R., Mora-Aguilera, G., Covarrubias, I., De Paolis, J.R F., Mora, S., Cíntora, C. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p.
30. SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe octubre, 2015. Revisado en web el 27 de octubre 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
31. Torres-Pacheco, I., López-Arroyo, J. I., Aguirre-Gómez, J. A., Guevera-González, R. G., Yanez-López, R., Hernández-Zul, M. I. y Quijano-Carranza, J. A. 2013. Potential Distribution in Mexico of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of Huanglongbing pathogen. Florida Entomologist 96: 36-47.

7. CONCLUSIONES GENERALES

1. La presente investigación sustenta las bases biológicas sobre el uso de la epidemiología con enfoque regional y justifica su uso en los problemas fitosanitarios con la finalidad de obtener un entendimiento integral de los factores involucrados y sus relaciones para generar propuestas de manejo con una visión preventiva y sustentable.
2. Se demostró que la región de la Península de Yucatán presenta un proceso epidémico del HLB con menor intensidad en comparación a la región del Pacífico, lo cual se atribuyó a la baja carga de inóculo de CLas en planta y vector, a la baja disponibilidad de tejido y menor NGP, lo cual redujo los procesos de reinfección y el potencial de dispersión de DC.
3. En la región Península de Yucatán, se recomienda mantener la eliminación de plantas enfermas hasta un umbral económico deseable, con programas de inspecciones frecuentes, renovación de plantas e incremento de la densidad de plantación para mantener la producción y sustentabilidad de la actividad citrícola en esta región. Mientras que en la región del Pacífico, la condición actual de endemidad y alta cronicidad indican que la erradicación es una opción inviable, por lo que con acciones de manejo integrado del cultivo existe la posibilidad de mantener la sustentabilidad y rentabilidad de la actividad citrícola.
4. Se propone el uso de la cronicidad de infección de CLas como indicador de la carga de inóculo regional y periodos de infección en estudios epidemiológicos regionales para la definición de áreas de riesgo y endemidad del HLB, ya que al ser una variable cualitativa evaluada directamente en campo, reduce los costos de las pruebas moleculares para la cuantificación de CLas y disminuye el tiempo para conocer el estatus epidemiológico *in situ*.
5. Se demostró por primera vez la ocurrencia de una condición epidémica asintomática en naranja dulce, lo que sugiere una posible adaptabilidad parasítica hacia una condición moderada con un efecto crónico de largo plazo.
6. La pérdida en producción inducida por CLas en limón mexicano fue mayor en Colima con 62.7% en comparación con Michoacán en donde se encontró 36.7%, lo cual se asoció a que Colima tiene una infección más crónica que Michoacán.

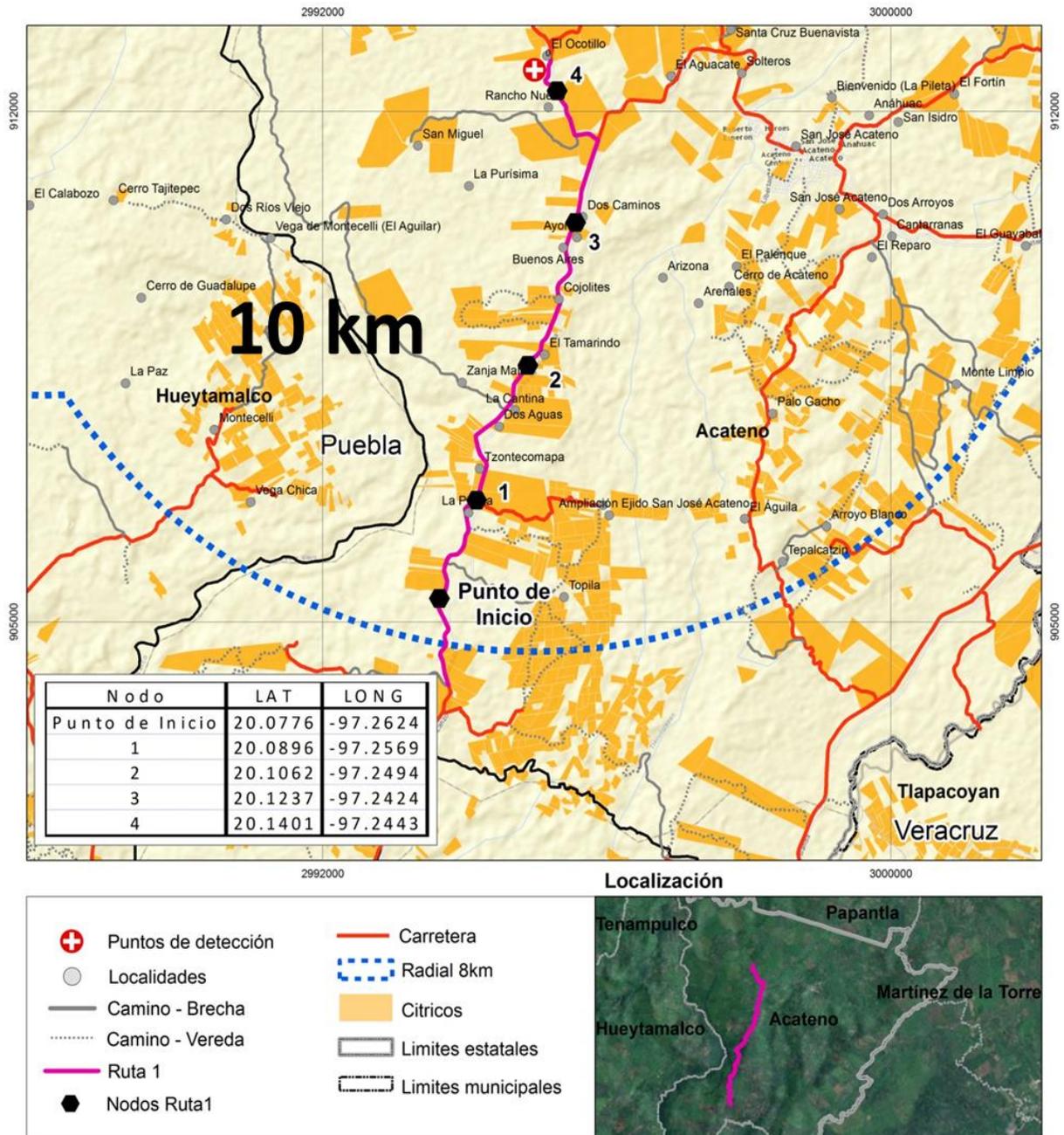
7. A nivel regional, se demostró que el manejo agronómico tiene mayor implicación en la pérdida productiva de limón mexicano que la cronicidad de infección, pero que éste tiene que desarrollarse bajo un enfoque de manejo integrado del cultivo como nuevo sistema productivo, para mantener los niveles productivos y rentabilidad de esta actividad económica.
8. Se detectó un nuevo escenario epidémico de CLas bajo una condición de ausencia de síntomas característicos del HLB en la región de Puebla y Veracruz, la cual mostró un proceso de dispersión de baja intensidad en comparación con la dispersión de CLas sintomático, a pesar de estar presente en un diámetro de 100 km, en la región colindante de Papantla, Martínez de la Torre y Tlapacoyan, Veracruz, y San José Acateno y Hueytamalco, Puebla.
9. Las evidencias del análisis de dispersión de CLas asintomático a nivel regional y parcelario asocian ésta condición a una baja concentración de la bacteria en planta y vector; baja disponibilidad de tejido por presencia de naranja dulce, la cual tiene menor desarrollo de brotes vegetativos que otras especies cítricas como las limas; y baja población de *D. citri*, lo cual reduce el potencial de reinfección y dispersión parcelaria y regional de CLas asintomático.
10. La información obtenida del escenario epidémico de CLas asintomático, tiene gran potencial de uso en un contexto de estrategia regional y nacional de muestreo y delimitación de focos de dispersión activa para efectuar acciones de erradicación de árboles asintomáticos (inóculo primario) y control del vector (inóculo secundario).
11. En Paraguay, la condición epidémica del HLB es de baja intensidad, ya que solo se encontró en siete de 22 huertos evaluados, con incidencia del 29.2% y severidad del 12%, lo cual sugiere focos iniciales de infección de la bacteria sobre los cuales se podrían aplicar medidas de mitigación.
12. Se comprobó que la erradicación tiene un efecto en la reducción de la dispersión del HLB; y que el patrón espacial es agregado y con efecto de borde en la fase inicial de la epidemia, por lo que se recomienda mantener las acciones de erradicación con como base del manejo del HLB y control regional del vector para optimizar recursos humanos y económicos en un contexto de emergencia nacional para evitar la dispersión del HLB en Paraguay.

13. La información epidemiológica del HLB en un marco de estrategia preventiva y para su manejo permite el desarrollo y transferencia de tecnologías y métodos para el apoyo en el manejo de esta enfermedad. Un ejemplo de esto es la metodología para el establecimiento de las Áreas Regionales de Control de *Diaphorina citri* (ARCOs), la cual se generó con criterios biológicos y epidemiológicos con enfoque regional, con base en los principios de prevención (riesgo) y protección (endemicidad), como estrategia esencial para el manejo del HLB en México, la cual optimiza los recursos humanos y financieros contemplados para el control del insecto en áreas estratégicas identificadas para reducir la dispersión y carga de inóculo de CLas bajo las condiciones de México.
14. Otro producto generado a través de la aplicación de la información epidemiológica del HLB como distribución espacial, cronicidad, impactos productivos, y estudios de nutrición; lo constituye el Sistema Regional para el Manejo Integrado del HLB (SIREMI-HLB) en Colima, el cual es una herramienta en plataforma WEB para coadyuvar al manejo del HLB a nivel regional, que por su naturaleza dinámica y expedita genera recomendaciones de manejo agronómico bajo las condiciones epidémico-productivas indicadas por los productores.

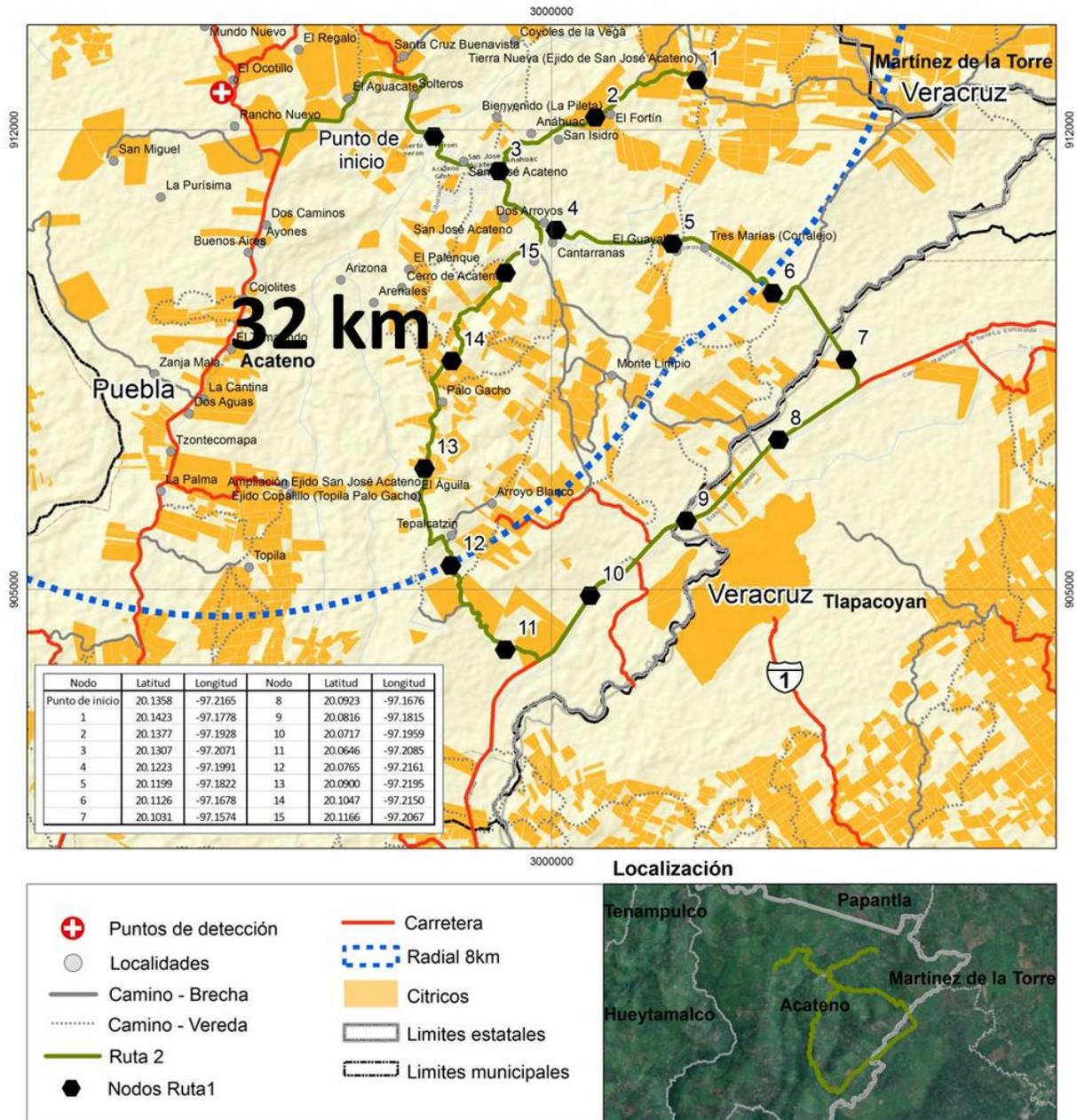
ANEXOS.

1. Transectos definidos para evaluación de la delimitación del HLB en la región citrícola de San José Acateno, Puebla

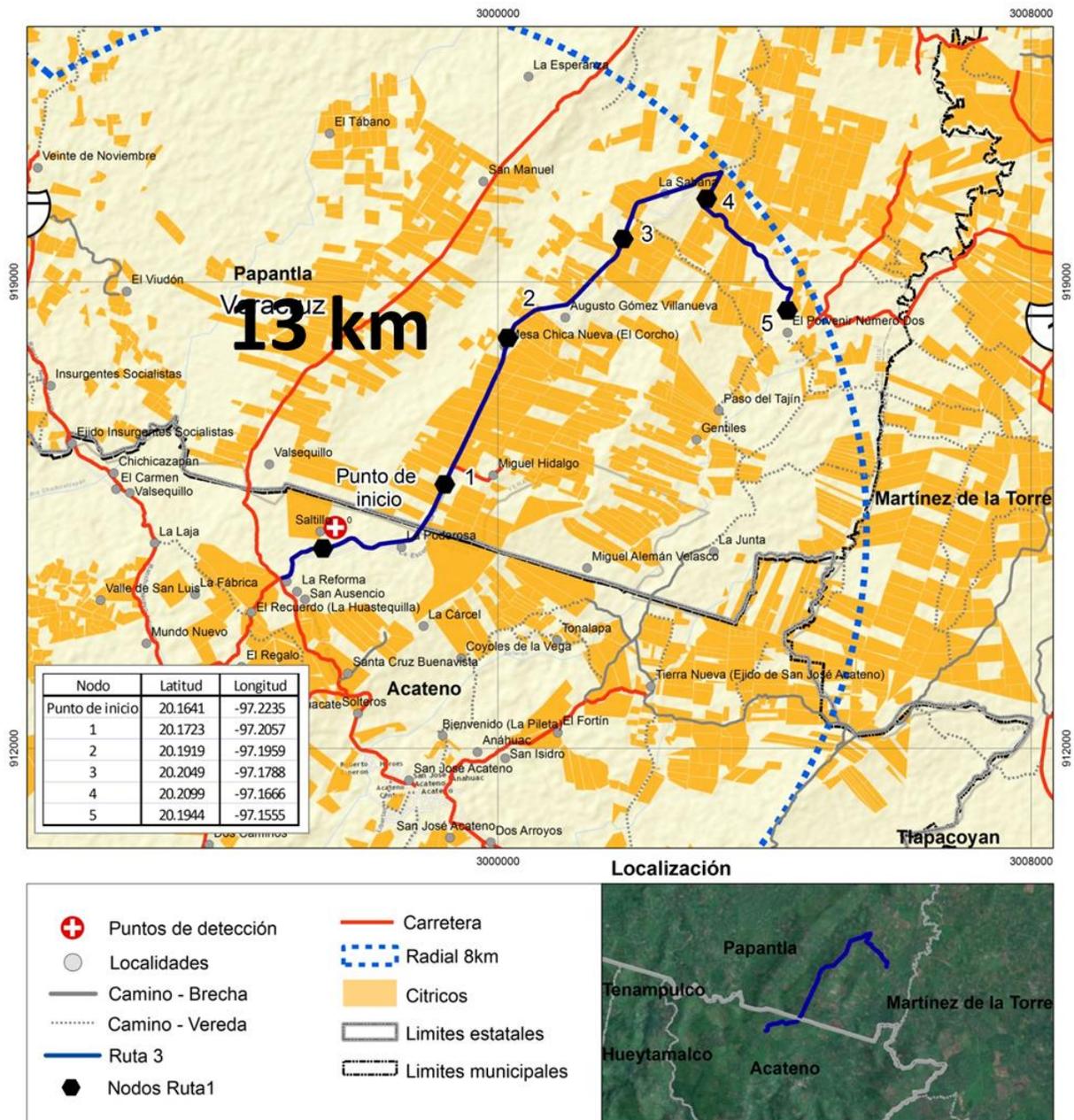
1.1. Transecto 1



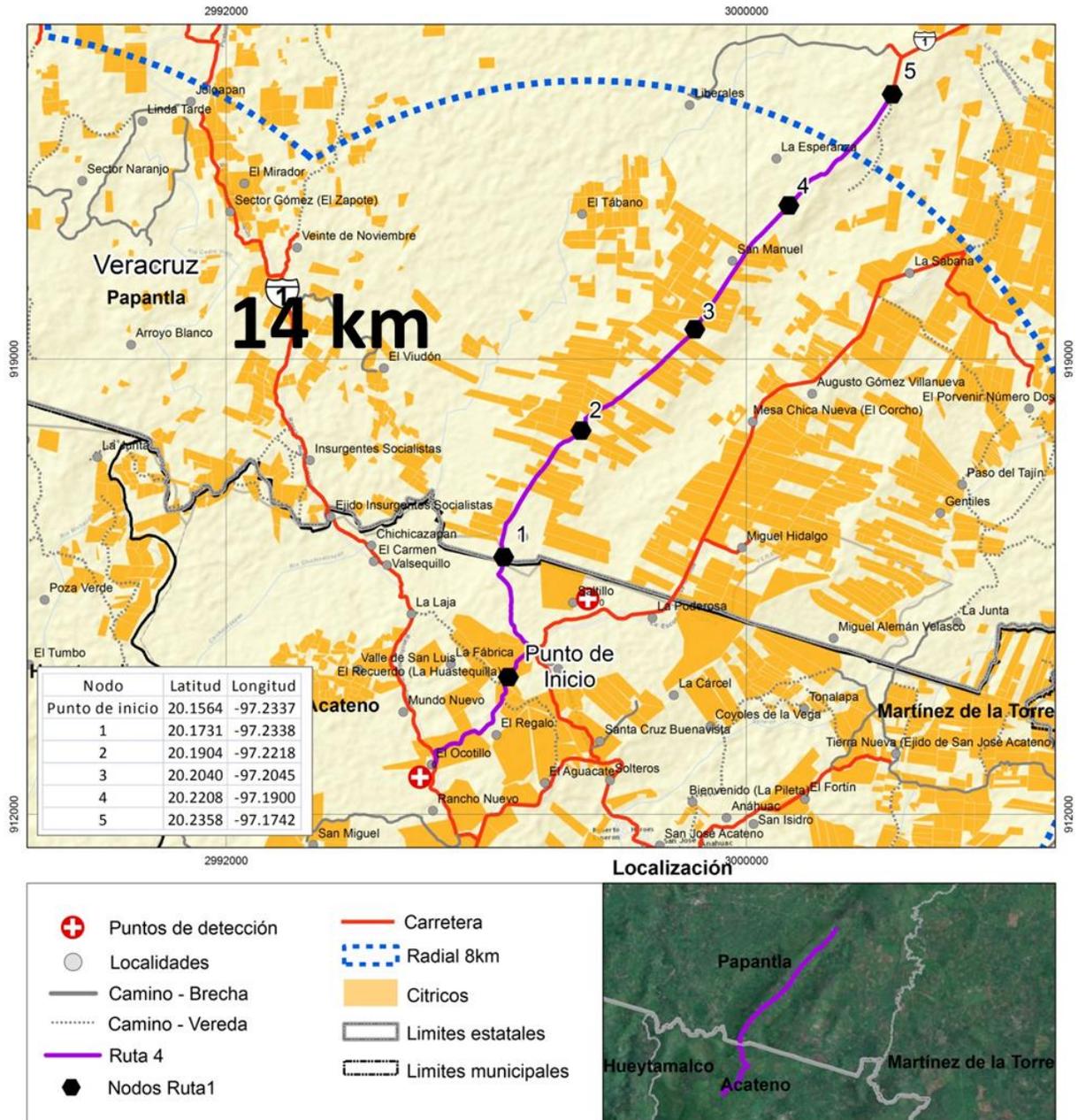
1.2. Transecto 2



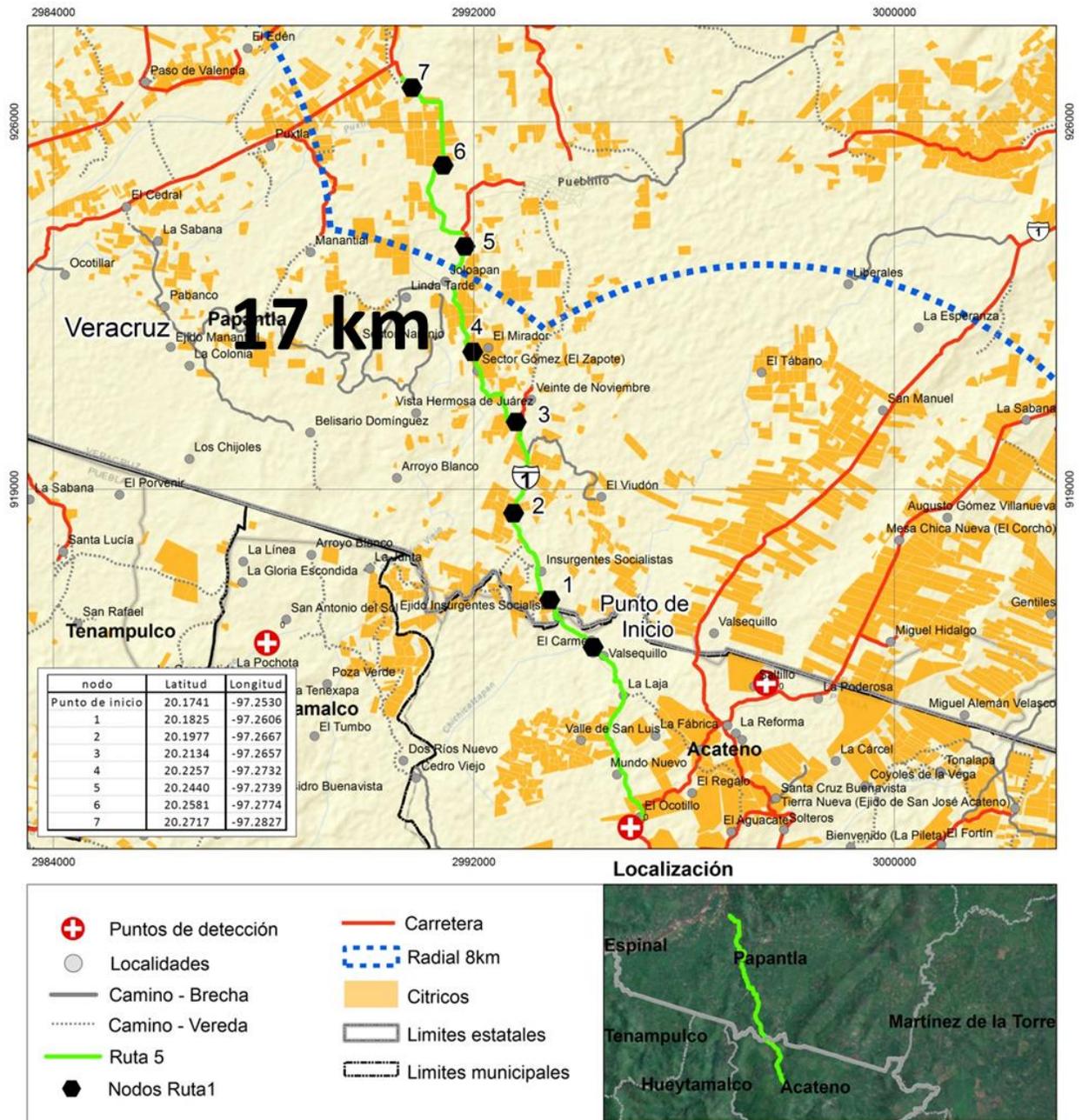
1.3. Transecto 3



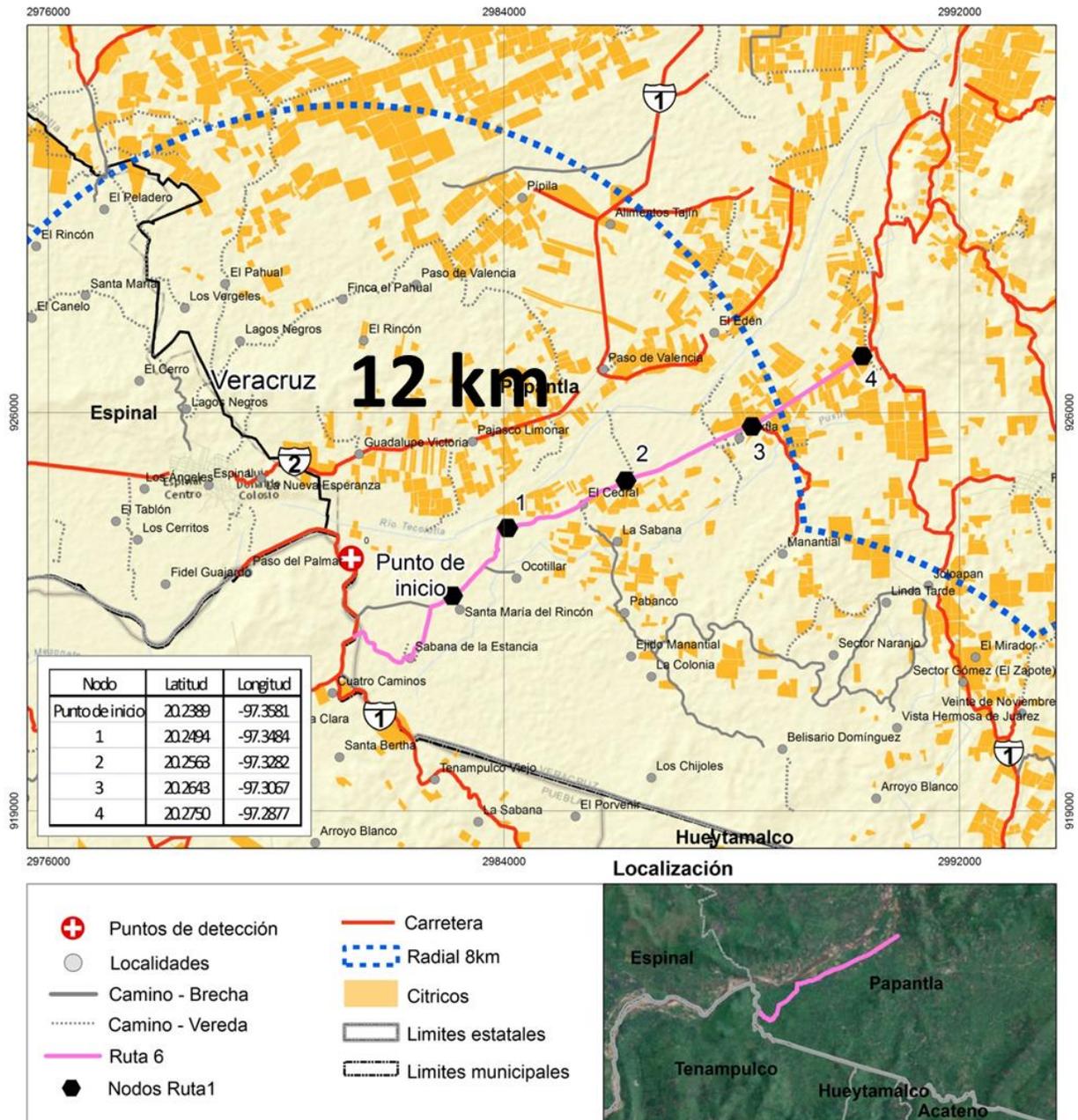
1.4. Transecto 4



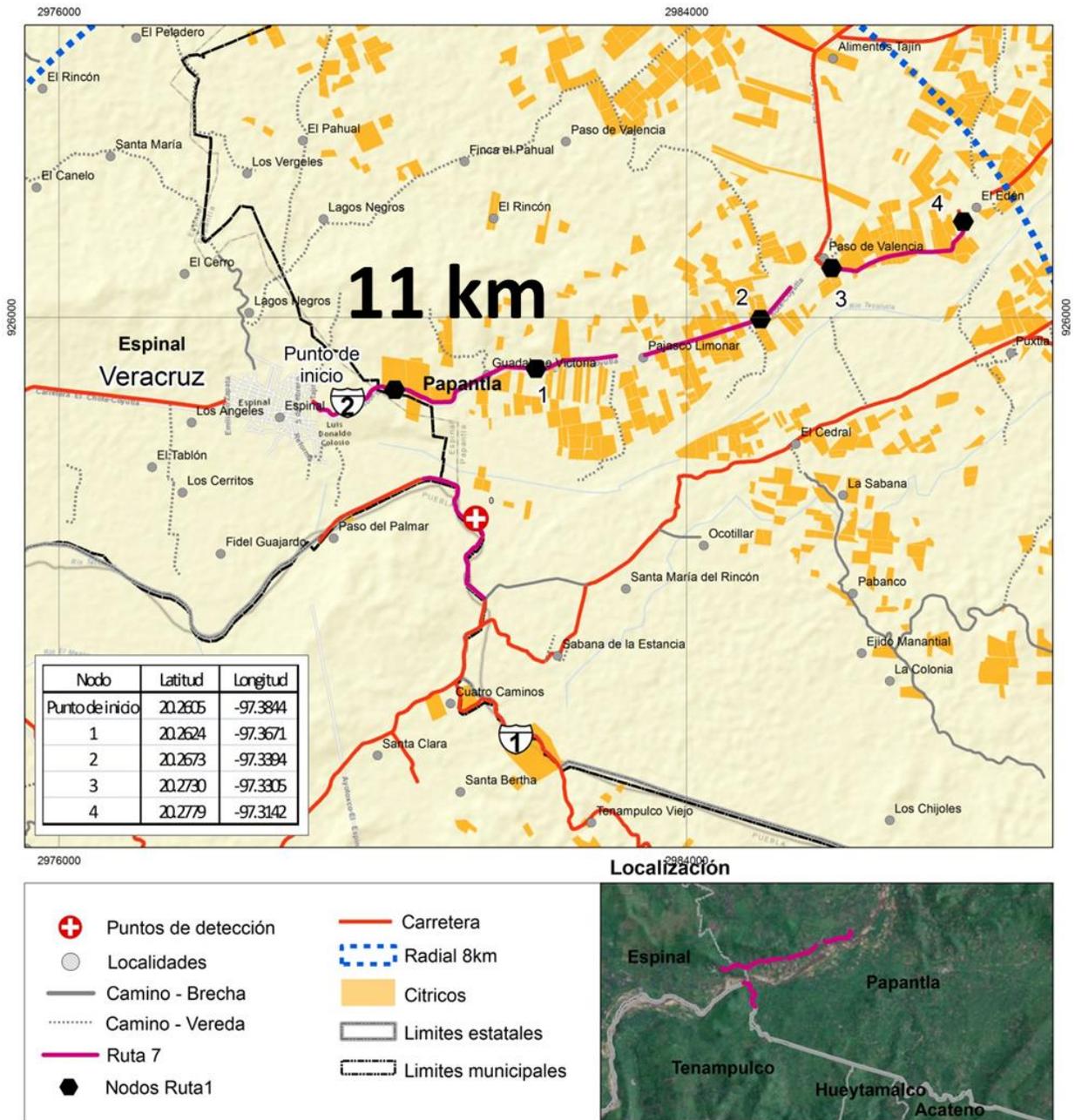
1.5. Transecto 5



1.6. Transecto 6



1.7. Transecto 7



1.8. Georreferencias de sitios preliminares de muestreo

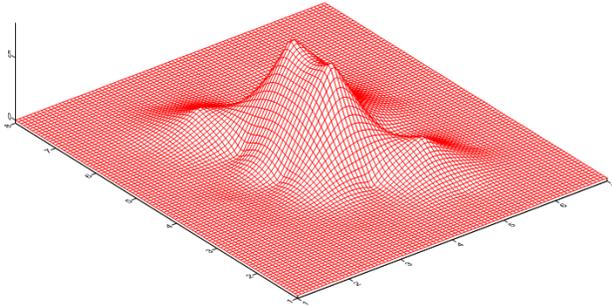
Clave	Estado	Distancia	Transecto	Sitio	Longitud	Latitud
T1-4	Puebla	0	1	4	-97.24054	20.13006
T1-3	Puebla	1.41	1	3	-97.24418	20.11637
T1-2	Puebla	4.42	1	2	-97.25671	20.08901
T1-1	Puebla	5.51	1	1	-97.2614	20.07915
T2-5	Veracruz	0	2	5	-97.1082	20.10696
T2-4	Puebla	1.27	2	4	-97.1511	20.10082
T2-3	Veracruz	4.37	2	3	-97.12087	20.10784
T2-1	Veracruz	15.46	2	1	-97.21844	20.01266
T2-5	Veracruz	0	2	5	-97.1082	20.10696
T2-6	Veracruz	1.1	2	6	-97.09869	20.11042
T3-3	Veracruz	0	3	3	-97.17707	20.20835
T3-2	Veracruz	2.26	3	2	-97.19428	20.1936
T3-1	Puebla	5.18	3	1	-97.20813	20.16787
T3-3	Veracruz	0	3	3	-97.17707	20.20835
T3-4	Veracruz	3.13	3	4	-97.14779	20.19707
T3-5	Veracruz	6.45	3	5	-97.11472	20.19983
T3-6	Veracruz	10.87	3	6	-97.09461	20.16052

T4-5	Veracruz	0	4	5	-97.16911	20.24192
T4-4	Veracruz	5.72	4	4	-97.20827	20.20021
T4-3	Veracruz	0	4	3	-97.21939	20.19256
T4-2	Veracruz	8.55	4	2	-97.22971	20.18185
T4-1	Veracruz	9.05	4	1	-97.23274	20.1779
T4-6	Puebla	11.29	4	6	-97.23404	20.1555
T5-1	Veracruz	0	5	1	-97.25703	20.26721
T5-2	Veracruz	2.16	5	2	-97.27319	20.25287
T5-4	Veracruz	4.28	5	4	-97.27477	20.23166
T5-5	Veracruz	6.74	5	5	-97.26461	20.20929
T5-6	Veracruz	11.78	5	6	-97.25121	20.1607
T6-5	Veracruz	0	6	5	-97.30547	20.26454
T6-4	Veracruz	0.9	6	4	-97.30547	20.26454
T6-3	Veracruz	2.31	6	3	-97.32778	20.25823
T6-2	Veracruz	4.54	6	2	-97.34807	20.24906
T6-1	Veracruz	5.66	6	1	-97.3557	20.2398
T7-0	Veracruz	0	7	0	-97.38211	20.25987
T7-1	Veracruz	0.951	7	1	-97.3726	20.2598
T7-2	Veracruz	1.744	7	2	-97.36479	20.25842
T7-3	Veracruz	0	7	3	-97.34155	20.26617
T7-4	Veracruz	1.19	7	4	-97.3302	20.26991

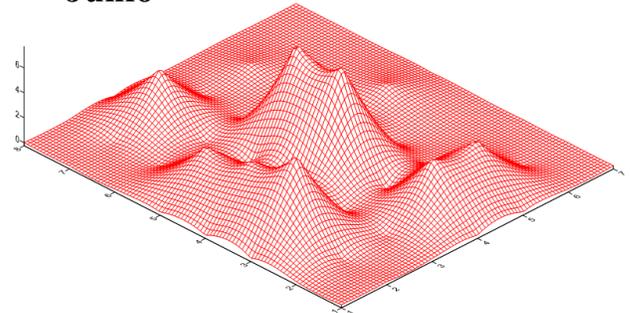
Anexo 2. Mapas geostatísticos de los focos de infección por fecha de muestreo

2.1. Mapas de Foco 1

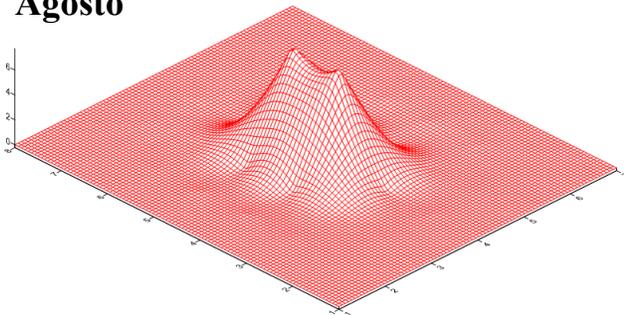
Abril



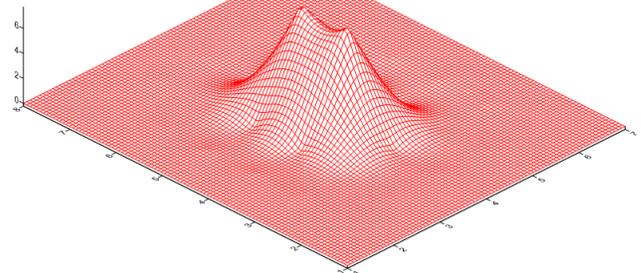
Junio



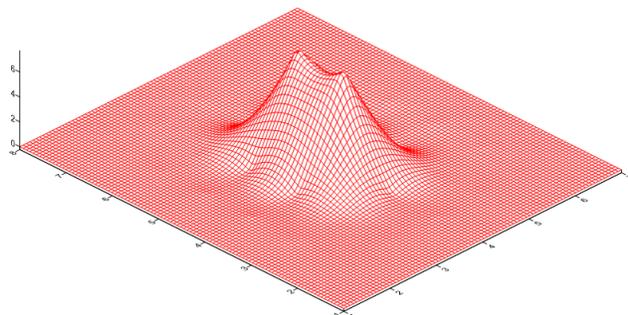
Agosto



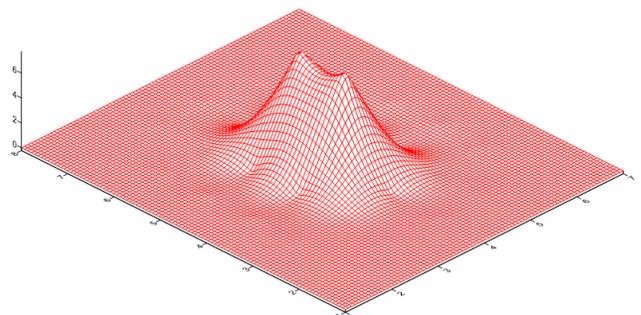
Octubre



Noviembre

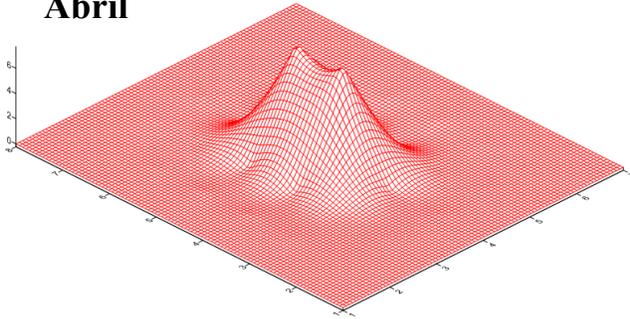


Diciembre

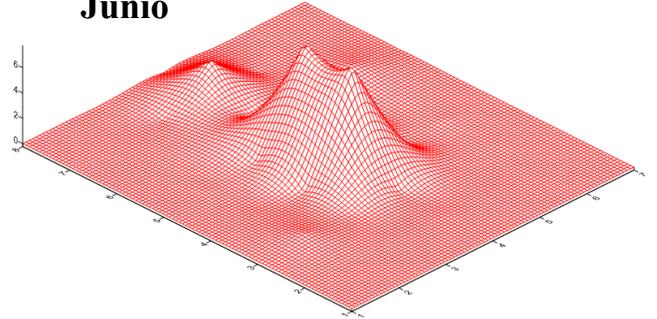


2.2. Mapas Foco 2

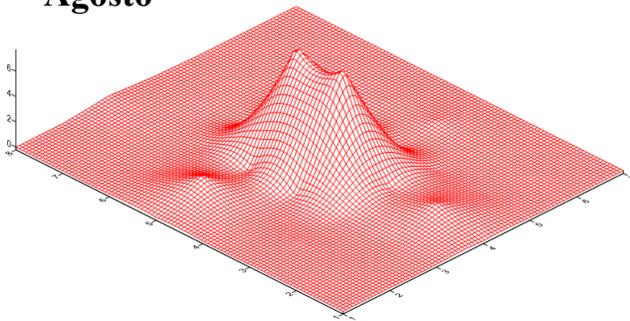
Abril



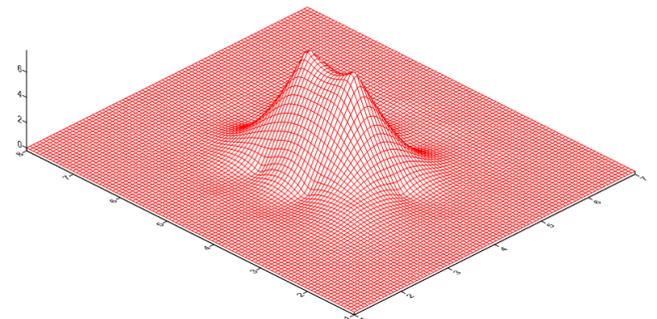
Junio



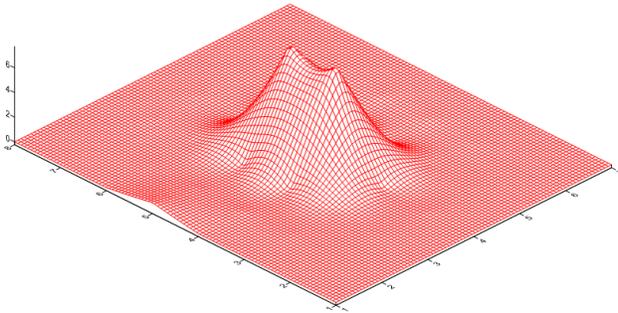
Agosto



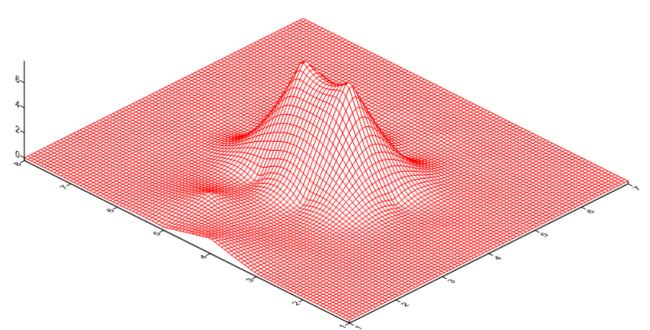
Octubre



Noviembre

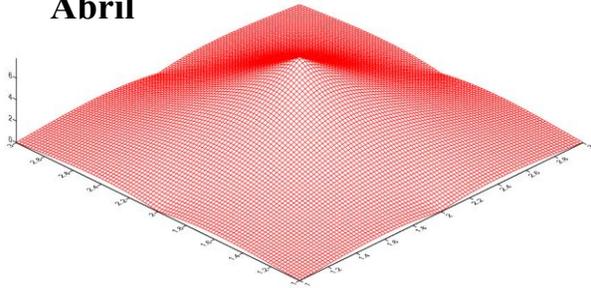


Diciembre

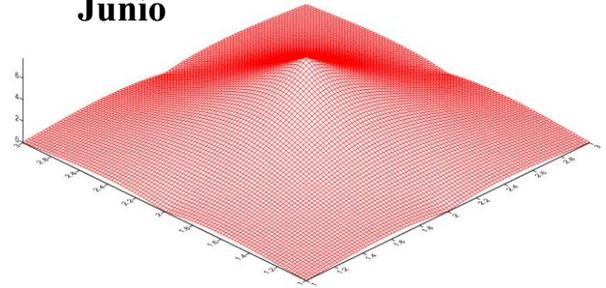


2.3. Mapas Foco 3

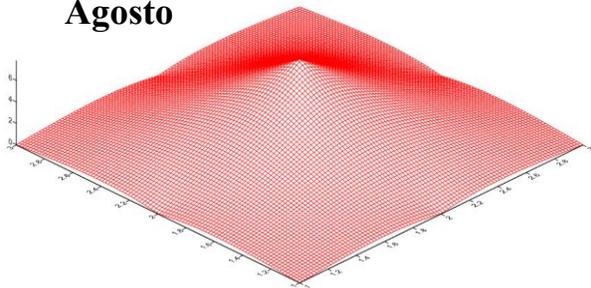
Abril



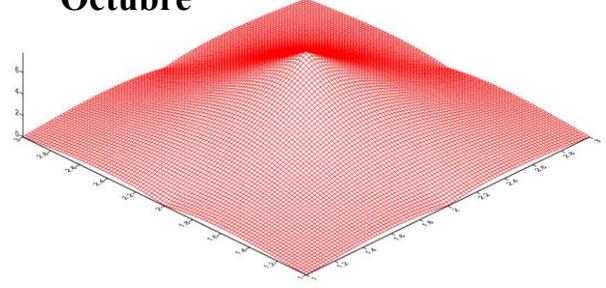
Junio



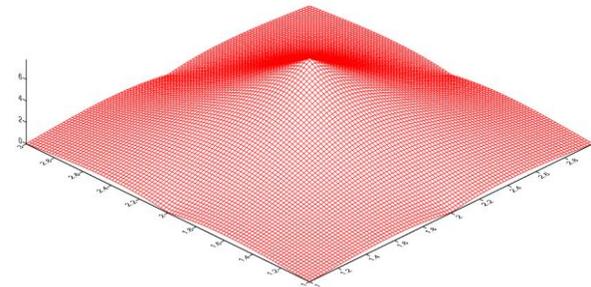
Agosto



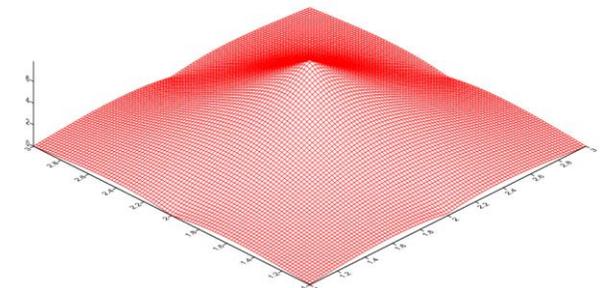
Octubre



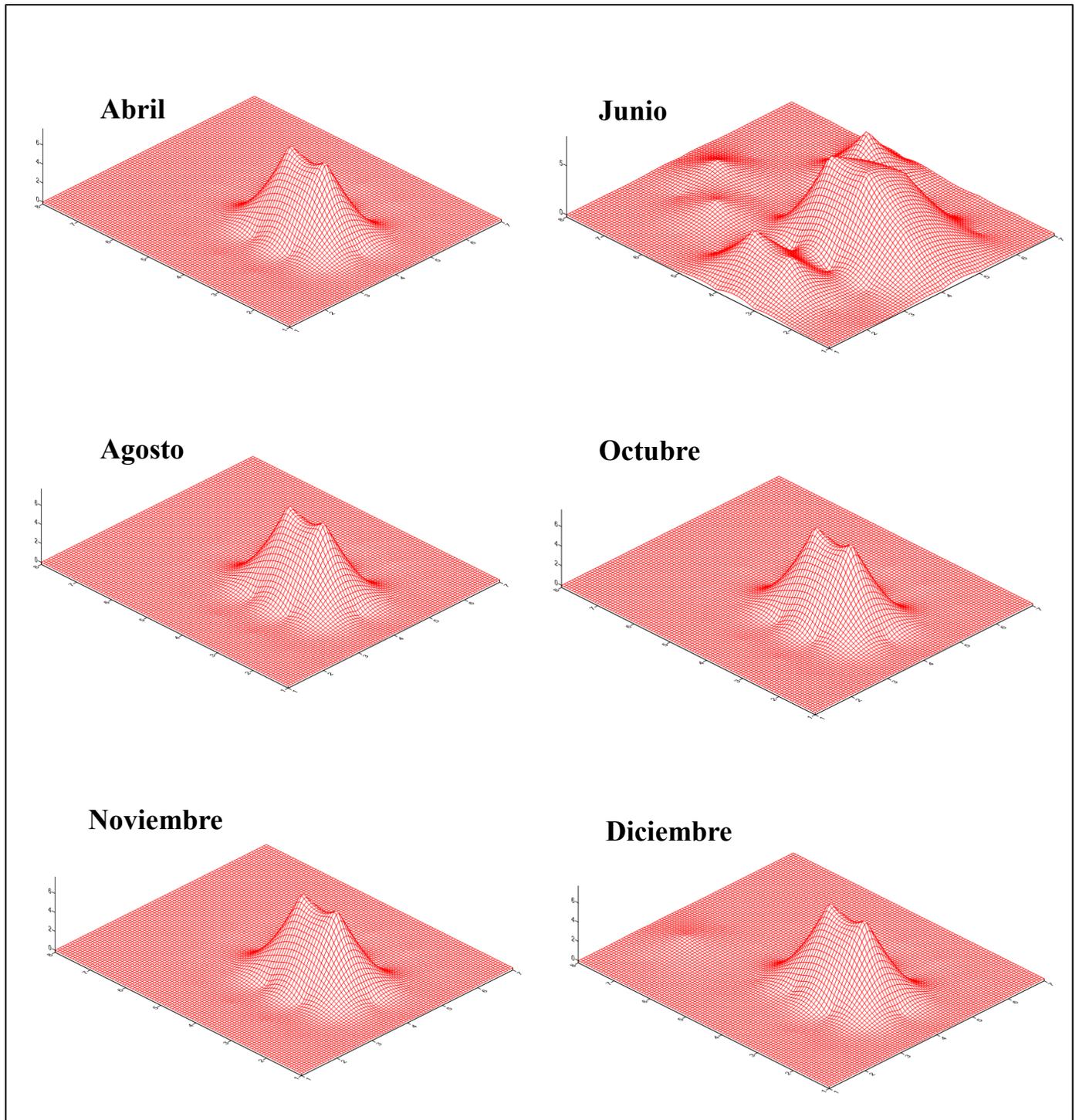
Noviembre



Diciembre

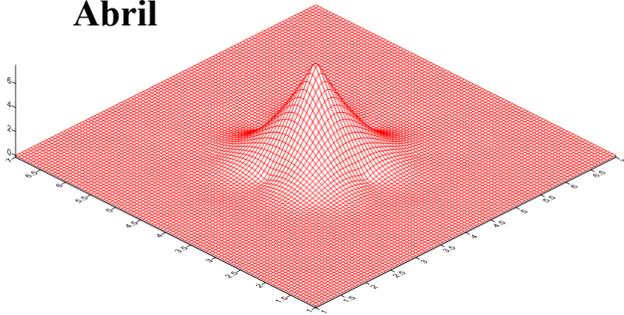


2.4. Mapas Foco 4

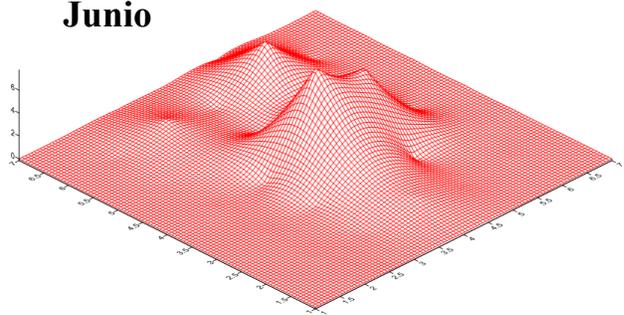


2.5. Mapas Foco 5

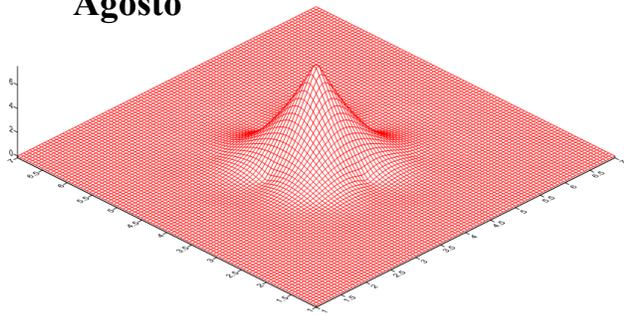
Abril



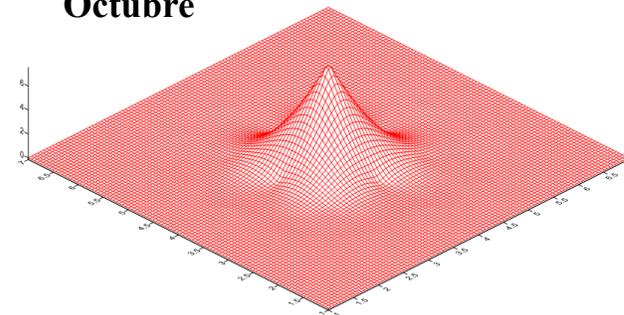
Junio



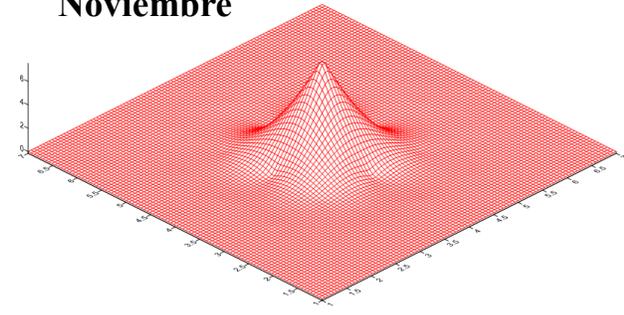
Agosto



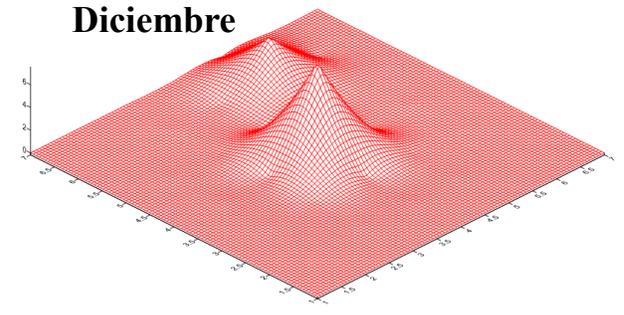
Octubre



Noviembre

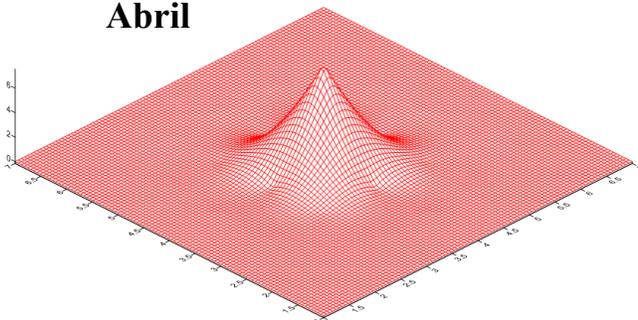


Diciembre

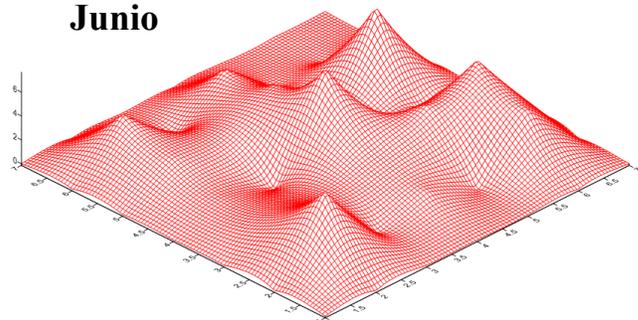


2.6. Mapas Foco 6

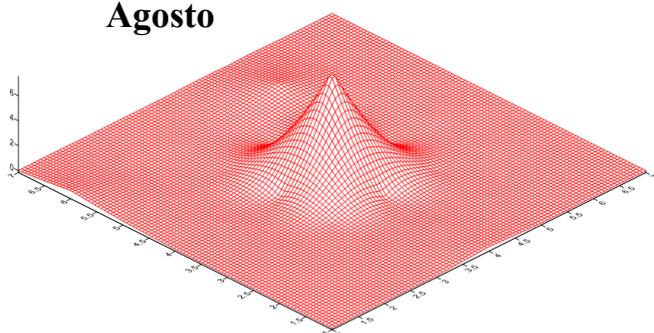
Abril



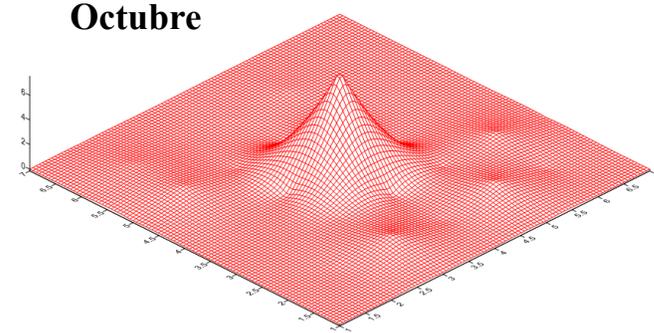
Junio



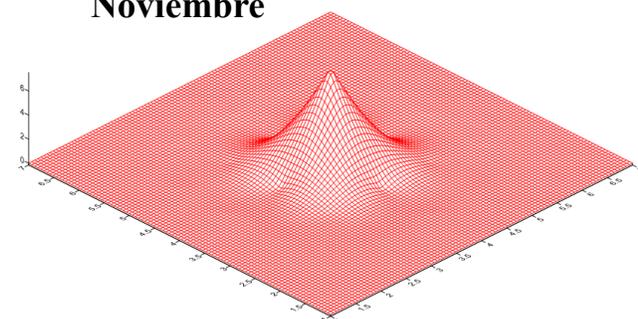
Agosto



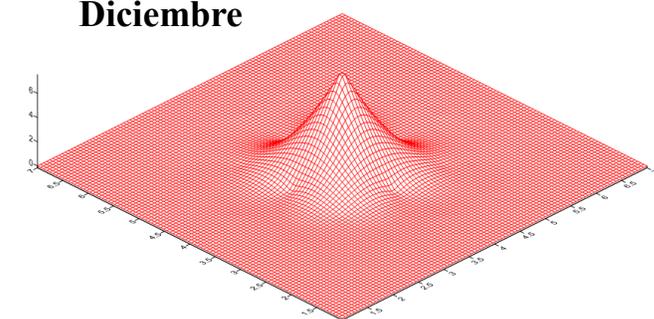
Octubre



Noviembre



Diciembre



Anexo 3. Protocolos de Laboratorio

3.1. Protocolo CTAB para extracción de DNA/RNA total de tejido vegetal

1. Depositar en un tubo de 2ml 0.1 gramos de tejido vegetal. Es importante mantener la muestra a 4°C.
2. Colocar dos balines de 3/16 dentro del tubo. Agregar 600 µL de buffer salino.
3. Ajustar el macerador de tejido a 25 f/s (frecuencias por segundo) por un tiempo de 3 minutos.
4. Transcurrido el tiempo, centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos a 4°C.
5. Descartar el sobrante y retirar los balines de la muestra.
6. Posteriormente, agregar 600µL de CTAB al 2% y 3µL de beta-mercaptoetanol. Dar vortex la muestra por 10 segundos e incubar a 55°C por un lapso de 30 minutos.
7. Agregar 400µL de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico 25:24:1 y mezclar en vortex por 10 segundos.
8. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 14 000 rpm.
9. Colectar 500µL de la fase acuosa en un tubo nuevo. Evitar que se mezclen las fases, por lo que se recomienda extraer la fase acuosa en volúmenes de 100µL. Desechar la fase sólida.
10. Agregar 50µl de acetato y 500µl de isopropanol e incubar por 10 minutos a -20°C. (Puede quedarse precipitando toda la noche).
11. Consecutivamente centrifugar por 10 minutos a 14 000 rpm a 4°C y descartar el sobrenadante cuidadosamente para no perder la pastilla que se formó.
12. Adicionar 1000µl de etanol al 70% y despegar la pastilla. Centrifugar un minuto a 14 000 rpm a 4°C.
13. Secar la muestra a temperatura ambiente de tal modo que se evaporen los residuos de etanol dentro del tubo, por un lapso aproximado es de 20 minutos.
14. Resuspender la pastillas en 50µl de agua libre de RNAsas.

3.2. Protocolo de extracción de ADN de insectos

1. Transferir 10 insectos en un tubo de 1.5 ml estériles, agregar 400ul de PBS 1X pH 7.2, (fosfato de potasio 50mM, NaCl 150 Mm) y macerar. Centrifugar unos segundos.
2. Adicionar 350 ul de Buffer Lysis Wizard® SV y de vortex unos segundos.
3. Centrifugar a 8 min a 12000 rpm.
4. Preparar la columna y etiquetar tubos de recolección
5. Pasar el sobrenadante a la columna (650 ul).
6. Centrifugar 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
7. Agregar 650 ul de la solución de lavado (Wash Solution, CWA; with 95% etanol added). Centrifugar a 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
8. Repetir el paso 7.
9. Agregar 300 ul de la solución de lavado. Centrifugar 2 min a 14000 rpm. Retirar cuidadosamente la columna para evitar que ésta entre en contacto con el precipitado. Pasarla a un tubo nuevo etiquetado.
10. Agregar en el centro de la columna 35 ul de agua libre de nucleasas (Nuclease-Free Water), incubar 5 min a temperatura ambiente y centrifugar 1 min a 8000 rpm.
11. Repetir el paso 10.
12. Desechar la columna y almacenar el ADN en hielo y /o a 4° C para su uso inmediato en PCR o bien almacenar a -20° C para su uso posterior.

3.3. Protocolo de PCR Tiempo Real tipo Cuantitativo (CLas)

1. Desinfectar la campana de qPCR con RNASE-away, hipoclorito de sodio 1.5%, etanol 70% y someter material de ensayo (Micropipetas, rack de Tubos de PCR, Rack para placas, puntas, apresor de tubos, etc.) a luz ultravioleta durante 25 minutos previos a la preparación de mix. **Importante NO introducir ADN a la campana**
2. Descongelar los reactivos sobre hielo o en el refrigerador de 4°C (colocando los reactivos dentro de una gradilla o caja de **preferencia para uso exclusivo**)

La preparación de la sonda y los primers se debe de realizar dentro de la campana de qPCR con el fin de evitar contaminaciones.

a) **Sonda:** Tomar 10ul de stock de sonda y adicionar 990ul de H₂O libre de nucleasas, colocarlos en un tubo de 1.5 ml cubierto con papel aluminio (para evitar el contacto de la luz y se degrade la sonda). Mezclar por pipeteo y marcar en la tapa o un costado como **SONDA -----** con un marcador indeleble.

b) **Primers:** Tomar 20ul de stock del primer Forward (HLB as) y adicionar 980ul de H₂O para libre de nucleasas, colocar en un tubo de 1.5 ml, mezclar por pipeteo. etiquetar en la tapa o a un costado con el nombre del primers. repetir el procedimiento con el primer Reverse.

3. Calcular la cantidad de reactivos necesarios en base al número de muestras a procesar; no olvidar contemplar las 12 reacciones extra necesarias para la curva estándar y 4 más empleadas en los controles positivos que se deben de agregar en cada corrida. Ej para una placa de 48 (dos controles negativos y dos controles positivos requeridos en el ensayo, 32 muestras problema y 12 reacciones requeridas para las dos repeticiones de cada punto de la curva estandar).

Reactivo	1x	49x
Bio-Rad Universal Master Mix	10 µL	490
HLBas	2.5µL	122.5
HLBp	2.5 µL	122.5

Sonda	4 μ L	196
Total	19 μ L	931
ADN	1 μ L	

4. Para ensayos de PCR cuantitativo se deberán preparar 5 diluciones seriadas 1:10 para utilizarse como puntos de referencia en la curva estándar: Tomar muestra inicial (clona con concentración 0.005ng/ul determinada de inserto de CLas con **1109500 copias/uL**) obteniendo 6 puntos de referencia para la curva estándar

Dilución	Concentración (copias /ul)
D0 (0.005 ng/ul)	1109500
D1	110950
D2	11095
D3	1109.5
D4	110.95
D5	11.95

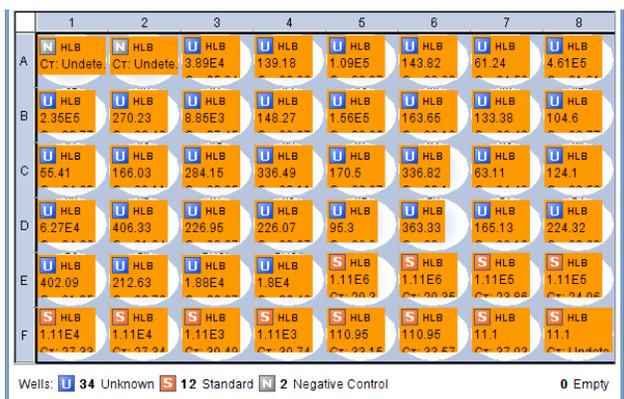
5. Preparar la mezcla de reacción en tubos de 1.5mL cubiertos con papel aluminio para evitar contacto de la sonda a la luz. Asegurarse de mezclar adecuadamente la solución, pipeteando consecutivamente hasta que se homogenice. El orden de preparación es el siguiente:

- i. Bio-Rad Universal SuperMix
- ii. HLBp
- iii. HLBas
- iv. Sonda

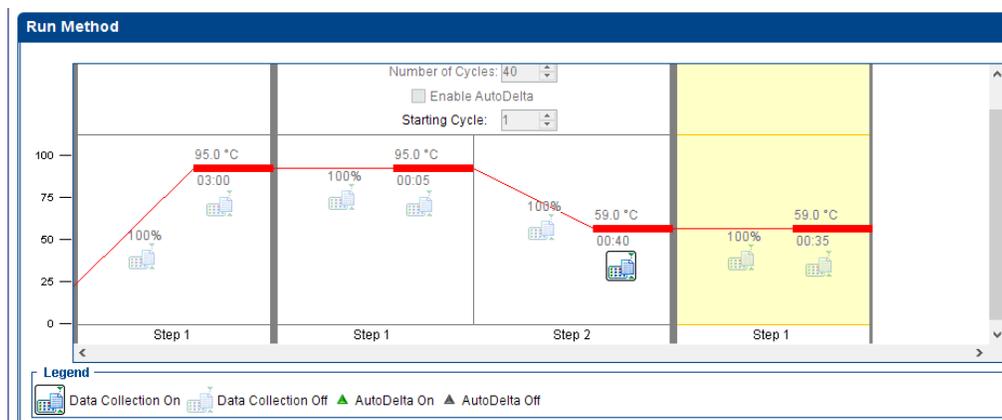
4. Una vez preparada la reacción, dejarla reposar en hielo mientras se acomoda la placa de 48 pozos (AppliedBiosystems) teniendo cuidado de **NO** tocar el fondo de los tubos o la placa, ya que puede afectar la lectura emitida por el termociclador.
5. Repartir 19uL de la mezcla de reacción en cada pozo, asegurándose de que la misma llegue al fondo del tubo. Una vez completado, verificar que no haya burbujas de aire

en el fondo, en evento que hubiese dar un ligero golpe al borde del rack para que las mismas disipen.

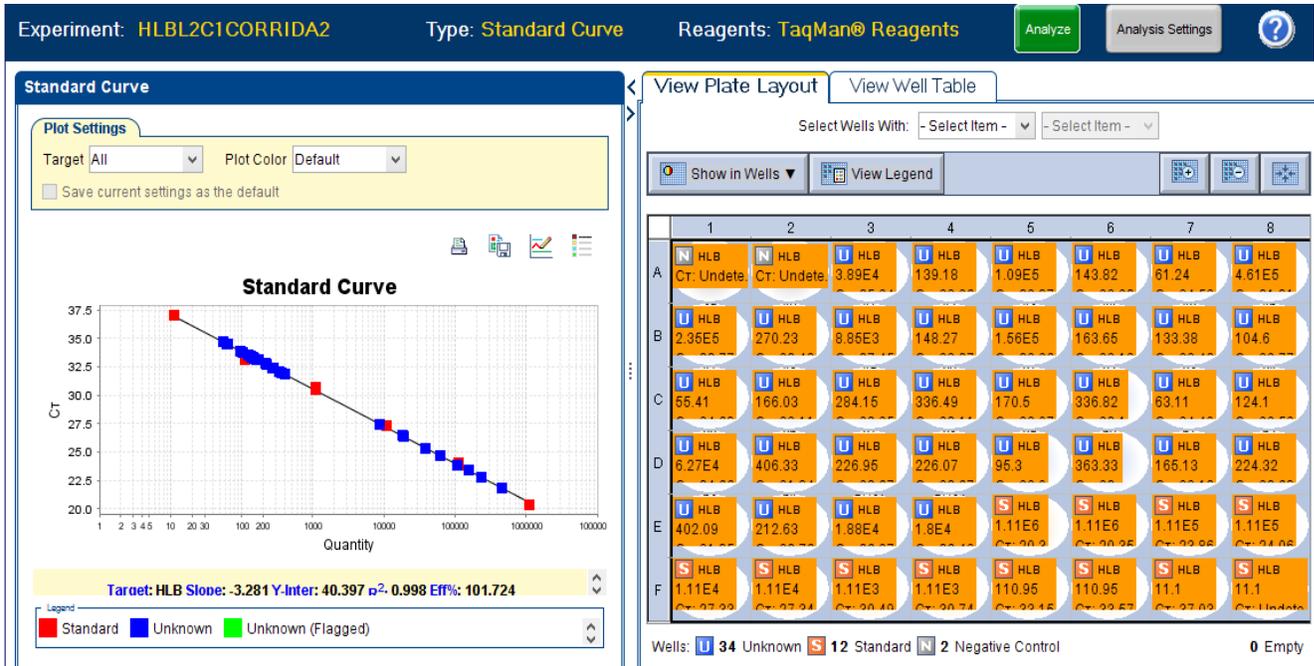
6. Agregar 1uL de muestra de ADN del pozo A3-E2 (dos primeros pozos son controles negativos) y los pozos E3-E4 los controles positivos.



7. Agregar 1uL de las diluciones D0-D5 con su respectiva repetición, las cuales ocupan del pozos E5-F8 (El orden de las diluciones debe ser de manera descendiente, por lo que la dilución de menor concentración siempre deberá ser la última, al igual, es imperativo que se respete el orden de factor y las repeticiones sean adyacentes)
8. Cubrir las muestras utilizando tiras de tapas (FastOptical AppliedBiosystems) teniendo nuevamente cuidado de no tocar las tapas directamente ajustar la tapa utilizando los apresores, para evitar contaminación. evitar movimientos bruscos para no salpicar la tapa
9. Programa de termociclaje para CLas



- 10.- Seleccionar la opción de Star run. Automáticamente aparecerá la opción de donde desea guardar el ensayo y una vez completado iniciara la corrida.



11.- Análisis de resultado

Anexo 4. Sistema Regional de Manejo Integrado del HLB (SIREMI-HLB) en Colima

4.1. INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing (HLB) es la mayor amenaza de los cítricos en cuanto productividad, comercialización y manejo a nivel mundial (Bové, 2006; Bassanezi *et al.*, 2011; Flores-Sanchez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013). En México, el HLB se asocia a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) la cual se detectó por primera vez en Julio de 2009 en Tizimín, Yucatán (SENASICA, 2015). En abril de 2010, se realizó la primera detección de esta enfermedad en Tecomán, Colima con evidencias de su presencia desde varios meses atrás y en diciembre del mismo año se reportó presente en todos los municipios del estado (SENASICA, 2015). Actualmente, se reportan incidencias del 100% en el estado con severidades variables desde 25 a 100% (SENASICA, 2015).

Esta bacteria se transmite por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Lyviidae) (Bové, 2006). En México la mayor severidad de síntomas fisiológicos e histológicos se presenta en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y limón persa (*Citrus latifolia*), en comparación con naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Los síntomas en hojas de cítricos agrios incluyen puntos cloróticos, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteado y clorosis difusa hasta el amarillamiento generalizado en la lámina foliar y defoliación. Histológicamente hay un incremento de almidón en el mesófilo de limón mexicano y persa. En naranja dulce se concentra en el parénquima de empalizada. En todos los casos se presenta hiperplasia, lo que ocasiona un colapso de floema (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Esta enfermedad carece de un método de control directo y actualmente se carece de variedades tolerantes (Xu *et al.*, 2013); actualmente, existen estudios en fase inicial, sobre materiales que presentan tolerancia o que prolongan la vida productiva de huertas citrícolas (Stuchi *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2013) y sobre agentes inductores de resistencia sistémica adquirida que reducen la dispersión y contagio entre plantas (Bagio *et al.*, 2014). Investigaciones recientes en Brasil, EUA, China, África y México, indican que la estrategia que presenta mayor eficiencia en el manejo del HLB es el enfoque de control regional de DC, por su efecto en la dispersión de inóculo secundario y reducción en costos de aplicación, en complemento a la erradicación de fuentes de inóculo y al uso de material vegetal certificado (Bassanezi *et al.*, 2013); sin embargo, en regiones citrícolas donde estas

acciones no fueron implementadas con pertinencia y el escenario epidémico del HLB es endémico, es decir, que esta enfermedad tiene amplia distribución en la región; la erradicación es una opción inviable (Belasque *et al.*, 2009). En estas regiones como el Pacífico Mexicano, con énfasis en Colima y Michoacán, se requiere la adición de una nueva estrategia con enfoque de manejo integrado del cultivo, la cual puede tener como base la nutrición, frecuencia de riego, altas densidades de plantación, renovación frecuente de plantaciones y control regional de DC mediante productos químicos y biológicos (Bassanezi *et al.*, 2014a; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011; Sandoval-Reyes *et al.*, 2013; López-Arroyo *et al.*, 2012; Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012; Stuchi and Girardi, 2010; Skaria and Hanagriff, 2008). No obstante, la mayoría de estos métodos se proponen de manera individual, lo cual se considera es restrictivo puesto que el manejo del HLB requiere un enfoque holístico como lo provee el manejo integrado del cultivo y lo cual se discute en esta tesis (CAPITULO III). Por otra parte la transferencia de estas estrategias al sector productivo aún es una problemática a resolver. Un método para interactuar con productores o con instancias oficiales para la toma de decisión de manejo de plagas o problemas fitosanitarios es el desarrollo de sistemas web. Un ejemplo de un sistema exitoso es el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Roya del Café en México, el cual se desarrolló en ambiente web con un enfoque de gestión y análisis de datos en forma *quasi-real* para optimizar la toma de decisión con fines de alerta temprana y prevención de riesgos de epidemias de esta enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Existen otras plataformas con un enfoque de trazabilidad de las acciones de control regional de DC, como lo son para Florida las CHMAs (Citrus Health Management Areas) (Rogers *et al.*, 2011), en Brasil con áreas amplias (Bassanezi *et al.*, 2014b) y en México con el SIMDIA (Sistema de Monitoreo de *Diaphorina citri*) (SENASICA, 2015); sin embargo, todos los casos se basan en integrar información e insumos para el control regional de DC con la incorporación del productor como usuario, pero carecen de un enfoque holístico sobre el manejo integrado del cultivo basado en las prácticas agronómicas que anteriormente se mencionaron. Por lo anterior, se planteó el objetivo de desarrollar un sistema dinámico con enfoque regional para coadyuvar el manejo integrado del HLB en Colima, pero con base en el manejo integrado del cultivo y con el productor como eje integrador y responsable de la accionabilidad de las recomendaciones.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Modelo del SIREMI-HLB

El Sistema Regional para el Manejo Integrado del HLB *SIREMI-HLB* se desarrolló con el uso de tecnologías WEB, mediante *Hosting* para almacenamiento de datos configurados con Linux/Apache, MySQL como gestor de bases de datos y PHP, HTML y CSS como lenguajes de programación. La plataforma integró tres componentes de gestión de información: 1) investigación generada en instituciones como el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y Colegio de Postgraduados (COLPOS) con enfoque multidisciplinario; 2) Paquetes tecnológicos generados en programas de INIFAP *in situ*; y 3) cocimiento empírico del sector productivo. La integración de estos componentes tuvo como salida la propuesta de manejo agronómico bajo las condiciones de los huertos (Figura 1).

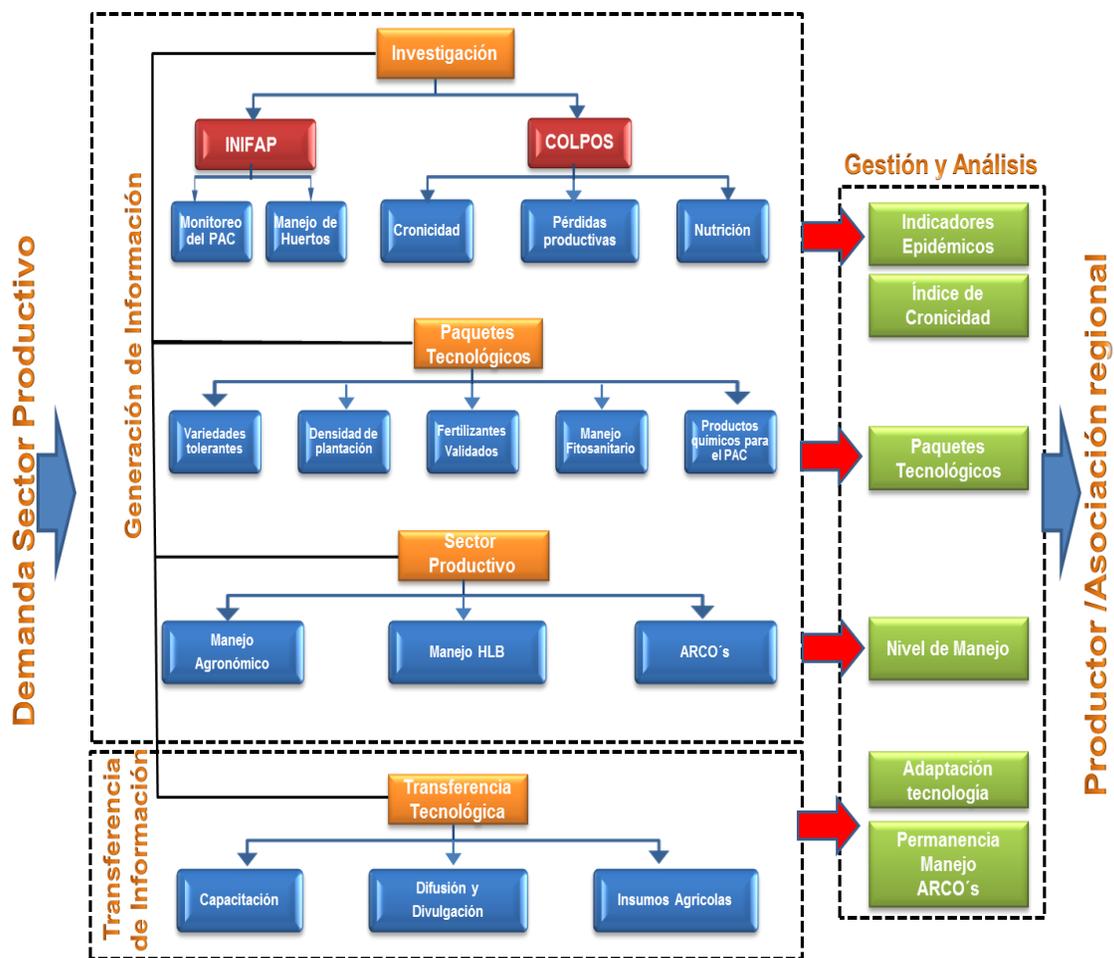


Figura 1. Modelo General del SIREMI-HLB.

4.2.2. Gestión de Datos

El SIREMI-HLB emplea resultados de líneas de investigación generadas por el INIFAP y COLPOS, entre otras, durante el periodo 2012-2014, tales como: estatus epidémico del HLB en Colima, estudios de cronicidad de infección en relación al impacto productivo inducido por CLas, paquetes tecnológicos en desarrollo, análisis correlativos entre severidad del HLB, niveles nutricionales, fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* (DC), datos oficiales de detección y de manejo del HLB mediante la estrategia nacional ARCOs.

4.2.3. Cronicidad de infección regional de CLas

El modelo emplea datos de cronicidad de infección regional de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) evaluada *in situ* durante 2012-2014 en 32 huertos de limón mexicano de los municipios citrícolas de Tecomán y Armería, Colima.

En cada huerto seleccionado se midió la severidad del HLB en 100 árboles mediante una escala nominal con clases 0=0, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100, porcentaje de copa con síntomas de HLB (Figura 2) (Flores-Sánchez *et al.*, 2015) con el fin de estimar cronicidad de infección y frecuencia de árboles por clase de severidad. A partir de esta evaluación se determinó el porcentaje promedio de cronicidad del huerto.



Figura 2. Escala de severidad de HLB en árboles de limón mexicano empleada para determinar cronicidad y seleccionar árboles para estimar el impacto productivo inducido por CLas.

4.2.4. Extrapolación de la cronicidad regional de CLas

Debido a que el estudio de cronicidad regional de CLas se realizó únicamente en 32 huertos de Tecomán y Armería, Colima y a que el objetivo del SIREMI-HLB es que cualquier productor de este estado pueda ingresar al sistema, se desarrolló un método geo-estadístico para cuadrantizar todo el territorio de esta entidad y poder asignar un valor de cronicidad a partir de los datos provenientes de investigación, complementariamente, el productor tendrá la posibilidad de realizar evaluaciones *in situ* para corregir la cronicidad de su huerto y ajustar la recomendación de manejo agronómico, en caso necesario.

El método de extrapolación consistió en generar un mapa integrado, en ARCGIS® v10.1, de: 1) un grid de cuadrantes del estado de Colima de un tamaño de 1x1 km, lo cual se determinó bajo la premisa de que los huertos que los productores registren deben quedar en cuadrantes diferentes o que un mínimo de huertos coincidan en el mismo cuadrante, lo que permite inducir variabilidad de la cronicidad además de tener una buena visualización de los huertos; y 2) un mapa interpolado de la cronicidad de infección de CLas evaluada durante 2012 a 2014 en 32 huertos de Tecomán y Armería; ambos insumos se integraron en una capa estatal, en la cual cada cuadrante (1x1 km) contenía las georreferencias de los cuatro puntos de unión y el valor de cronicidad estimado (Figura 3).

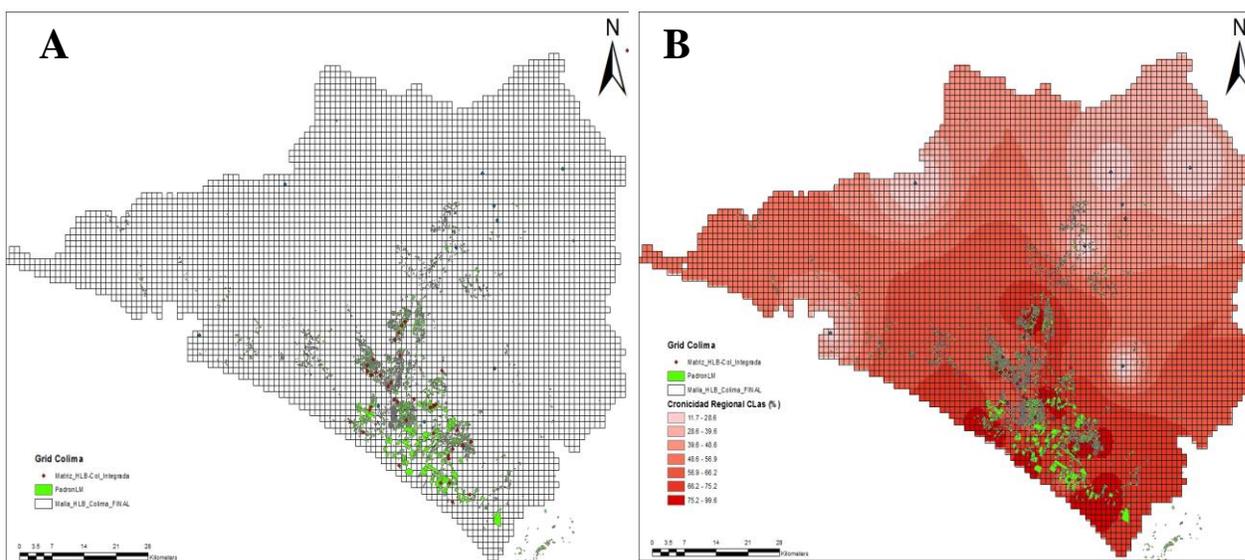


Figura 3. Mapa de la cronicidad regional de infección de CLas integrado por: A) Malla de cuadrantes de 1x1 km y B) Mapa interpolado de la cronicidad de infección de CLas en 32 huertos de Tecomán y Armería, Colima.

Finalmente, el mapa extrapolado se insertó en la plataforma WEB mediante el uso de la aplicación maps de GoogleApps® para generar algoritmos de búsqueda y poder registrar y visualizar los huertos de los productores interesados.

4.2.5. Nivel de tecnificación de huertos

La clasificación de los huertos de limón mexicano por su nivel de tecnificación se realizó a partir de una encuesta cuantitativa (Anexo 1), aplicada a los productores, en la que se evaluaron aspectos generales de los huertos (AG); nivel general de nutrición (N); vigor de árboles (V); control de maleza (CM); control general de plagas y enfermedades (CPE); y tipo y frecuencia de riego (R); a partir de los cuales se estimó un factor de ponderación por inductividad al HLB (FPI), el cual fue la suma de los valores parciales por categoría:

$$FPI = \sum(AG, N, V, CM, CPE, R) \quad [1]$$

El nivel de tecnificación se obtuvo con la regla de decisión:

$$NT = si(FPI \leq \frac{FPI}{3}, "BT", si(FPI \leq \frac{FPI}{2}, "MT", "AT")) \quad [2]$$

Donde: *NT*= Nivel de tecnificación de los huertos; *FPI*= Factor de ponderación por inductividad al HLB; *BT*= Baja tecnificación, *MT*=Moderada tecnificación y *AT*= Alta tecnificación.

4.2.6. Impactos de CLas en la producción

En cada huerto se seleccionaron 15 árboles, tres por clase de severidad, de 6 a 10 años de edad; en cada árbol se cosechó, se contó y pesó el número de frutos totales con madurez de cosecha. El porcentaje de pérdida por variable se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$Perd(\%)i = 100 - (Pest * 100)/Ptotali \quad [3]$$

Donde: *Perd(%)i*: es el porcentaje de pérdida por variable *i*; *Pest*: es el valor de la producción *P* de cada variable estimada en árboles enfermos; y *Ptotali*: es el valor de *P* de árboles sanos, para cada variable morfológica (peso, diámetro ecuatorial y polar, grosor de cáscara, volumen de jugo) y organoléptica (pH y grados Brix).

Finalmente, el porcentaje de pérdida se transformó a toneladas por hectárea (t/ha), con base en la siguiente ecuación:

$$Perd (t/ha) = (((Ptotal * N)/1000) * Perd(\%)j)/100 \quad [4]$$

Donde: $Perd$ (t/ha): es la pérdida en toneladas por hectárea; $Ptotal$: es la producción de árboles sanos en kilogramos; N : es la población de plantas presentes en una hectárea (ha) de acuerdo con una densidad de plantación promedio de la región; 1000: constante para convertir kilogramos (kg) a toneladas (t); $Perd(\%)j$: es el porcentaje de pérdida por huerto; 100: constante para eliminar porcentaje.

4.2.7. Análisis nutrimental

En cada huerto se analizaron muestras *in situ* con ionómetros portátiles de la marca Horiba® para determinar la concentración de nitratos (NO₃), potasio (K) y calcio (Ca), como indicadores del nivel de nutrición y su detrimento en relación a la cronicidad de infección de CLas.

4.2.8. Algoritmos empleados

La integración de esta información se realizó mediante indicadores y parámetros de modelos correlativos obtenidos mediante análisis exploratorio y estadístico de los datos. Finalmente en la plataforma web se desarrollaron algoritmos para indicar los procesos y la toma de decisiones. El insumo final es una recomendación de manejo del huerto con base en los datos analizados (Figura 4).

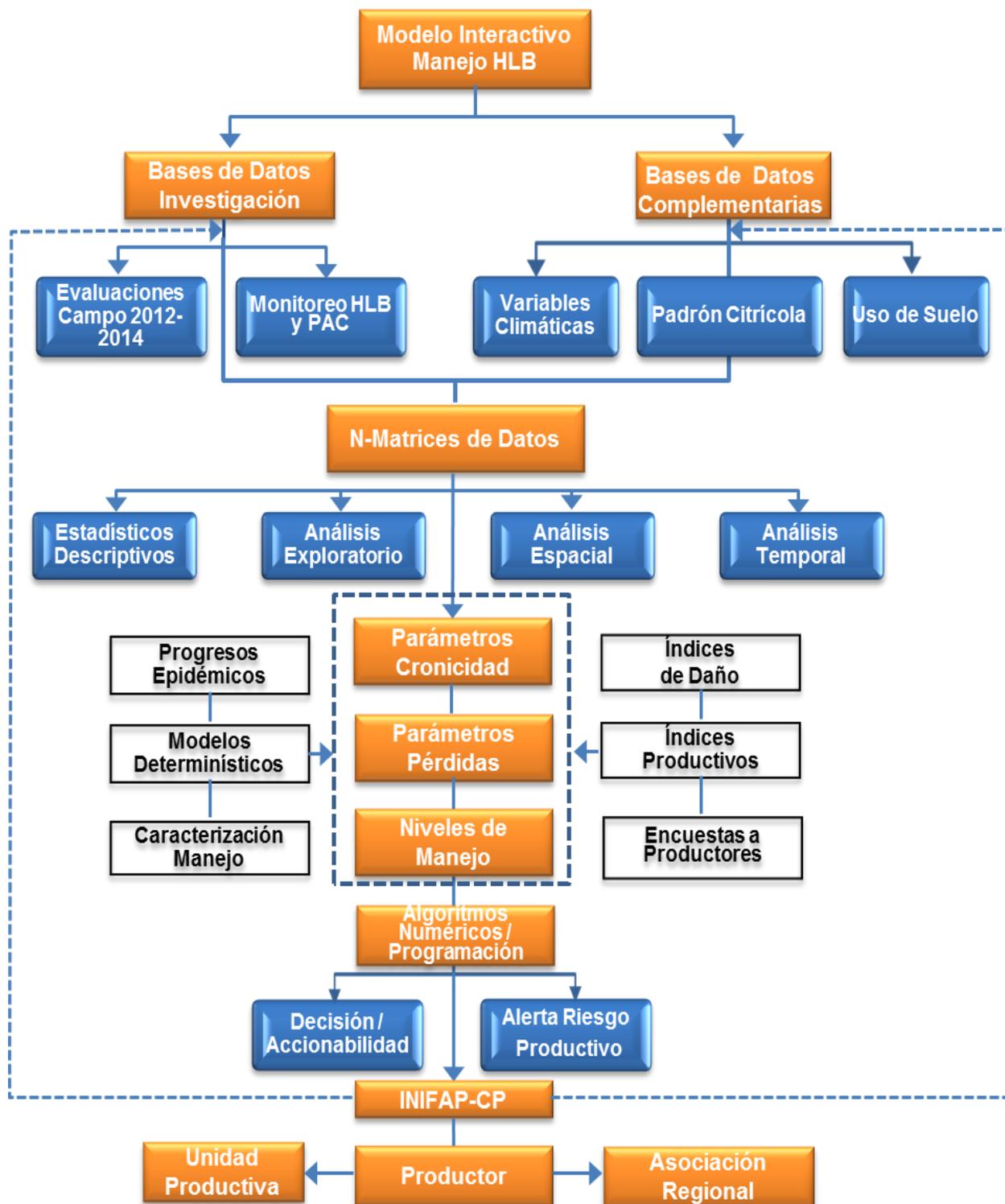


Figura 4. Esquema de gestión y análisis de datos y salidas del modelo interactivo para el manejo del HLB.

Los algoritmos se desarrollaron con base en modelos de regresión lineal entre cronicidad y peso de producción y contenido de NO3, en relación al nivel de manejo agronómico. En el Cuadro 1 se muestran los parámetros por modelo.

Cuadro 1. Parámetros de modelos empleados como algoritmos para realizar las estimaciones en la plataforma ARCOs.

Nivel de Manejo	Modelo	Pérdida		Modelo	NO3	
		a	B		a	B
Alto	$Prod_est=a+(b*x)$	59.05	-0.03	$NO3_est=a+(b*x)$	2189.3	2.79
Moderado		72.14	-0.52		2341.3	-3.77
Bajo		74.26	-0.05		1871.1	-3.4

Con base en los parámetros ajustados al modelo de regresión lineal se propusieron los siguientes algoritmos:

$$Por_Pérdida= 100-((Prod_est.*100)/18.5) \quad [5]$$

Donde:

Por_Pérdida: Es la pérdida productiva inducida por el HLB en el huerto consultado.

Prod_est= Es la producción estimada al utilizar el modelo de regresión entre la cronicidad y la producción en kg.

18.5= Es la producción (t) de limón mexicano obtenida en árboles sanos.

$$NO3= 3500 - NO3_est \quad [6]$$

NO3_est: Es la cantidad de NO3 (ppm) recomendada para evitar la pérdida productiva inducida por el HLB en el huerto consultado.

3500= Es la cantidad de NO3 presente en árboles de limón mexicano sanos.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se indicó el desarrollo del *SIREMI-HLB* fue para disponer de una herramienta electrónica para coadyuvar al manejo del HLB con un enfoque regional y en consideración del productor como el eje integrador y responsable de la accionabilidad del manejo recomendado mediante la integración de insumos científicos, tecnológicos y empíricos.

La vista pública contiene información general sobre el HLB como: publicaciones y capacitaciones en formato de presentación (PDF), sitios relacionados con el sector oficial, científico, tecnológico del patosistema HLB-Cítricos y un directorio de empresas especializadas en insumos agrícolas como agroquímicos, maquinaria e implementos y sistemas de riego (Figura 5).

Acceso a la plataforma:

Opción 1. Ir al siguiente link: <http://infit.org.mx/SIREMI-HLB/>

Opción 2. Entrar a cualquier navegador WWW (Explorer, Chrome, Firefox, etc), escribir en la barra de direcciones <http://infit.org.mx/SIREMI-HLB/> y dar Enter.

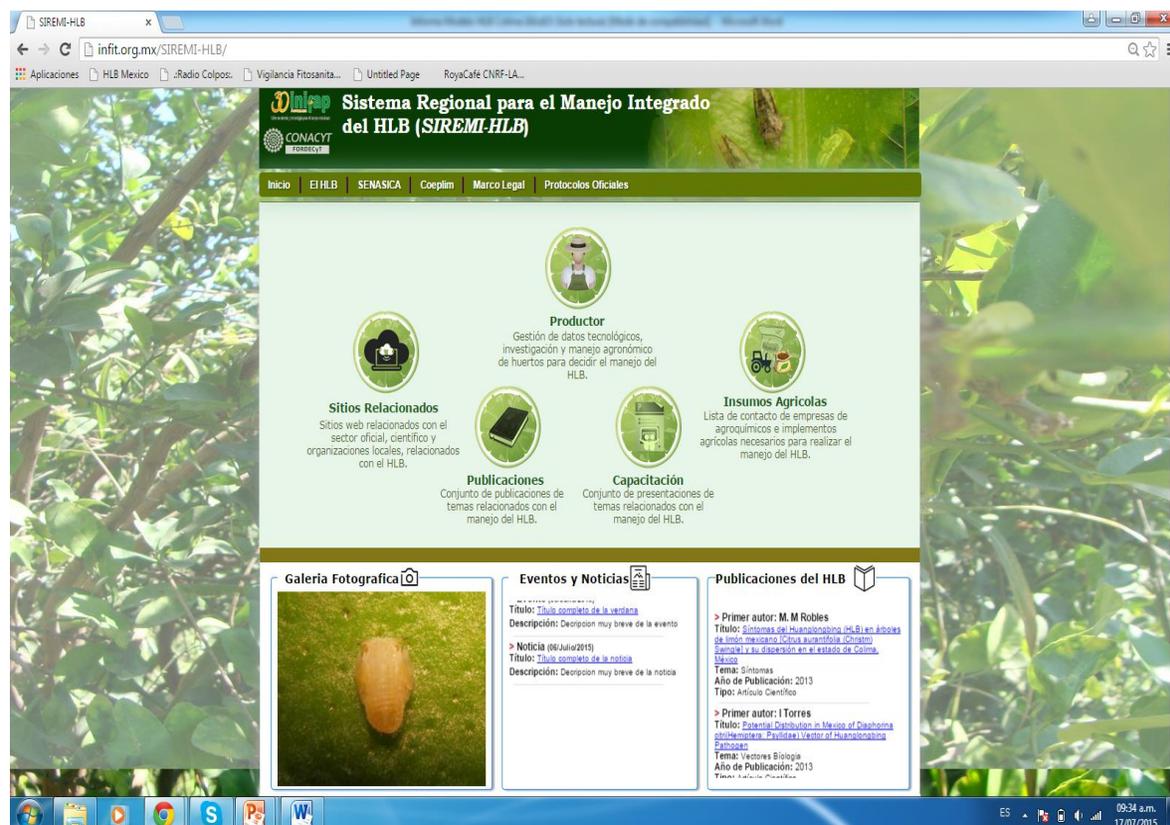


Figura 5. Vista pública de plataforma SIREMI-HLB (<http://infit.org.mx/SIREMI-HLB/>). Menú amigable para uso de productores.

En el área privada se desarrolló para los productores, los cuales constituyen el eje integrador de los procesos de esta plataforma debido a que son ellos los que deciden el realizar o no la recomendación de manejo que el sistema emite; y con los cuales se interactúa directamente sobre aspectos agronómicos del cultivo y manejo del HLB. El productor requiere registrarse, sólo en la primera ocasión, en la plataforma para ingresar al área privada con la asignación de un nombre de usuario y contraseña, el cual se solicita al dar click en el ícono *productor* (Figura 6).



Figura 6. Registro de usuario a nivel privado en la plataforma SIREMI-HLB, dirigido principalmente a productores.

La vista principal del área privada muestra un mapa del estado de Colima con la ubicación de los huertos cítricos de limón mexicano distribuidos en los 10 municipios de la entidad (Figura 7), lo cual permite que el productor visualice un escenario conocido y permita mantener interés en el sistema al identificarse con su región y con la problemática cítrica que existe en ella.

Adicionalmente, en la vista privada se incluyó un menú amigable con el usuario con componentes que coadyuvan a la recomendación de manejo emitida al final de un registro y navegación, tales como: manejo agronómico, análisis de la cadena productiva con información del comportamiento del mercado nacional e internacional, información sobre el desarrollo y eficiencia de la estrategia de Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs), datos de la fluctuación de DC, datos de clima y un área de correo electrónico (Figura 7), la cual tiene como fin la interacción expedita de los productores con investigadores de instituciones públicas y privadas con expertíz en el manejo del HLB y con el sector oficial para el planteamiento de dudas y propuestas de mejoría de las estrategias oficiales sobre el manejo de esta enfermedad.



Figura 7. Vista principal del área privada, la cual tiene un menú amigable con el productor con componentes como: cadena productiva, Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs), datos de DC, datos de clima y un área de correo electrónico.

La opción de *manejo agronómico* se integró con la encuesta sobre el nivel de tecnificación de los huertos, previamente descrita en la sección de materiales y métodos de este estudio, pero con un desarrollo en ambiente WEB (Figura 8), lo cual permite que el productor genere una base de datos integrada y que el sistema emita un nivel de tecnificación del huerto y un nivel de cronicidad de infección de CLAs.

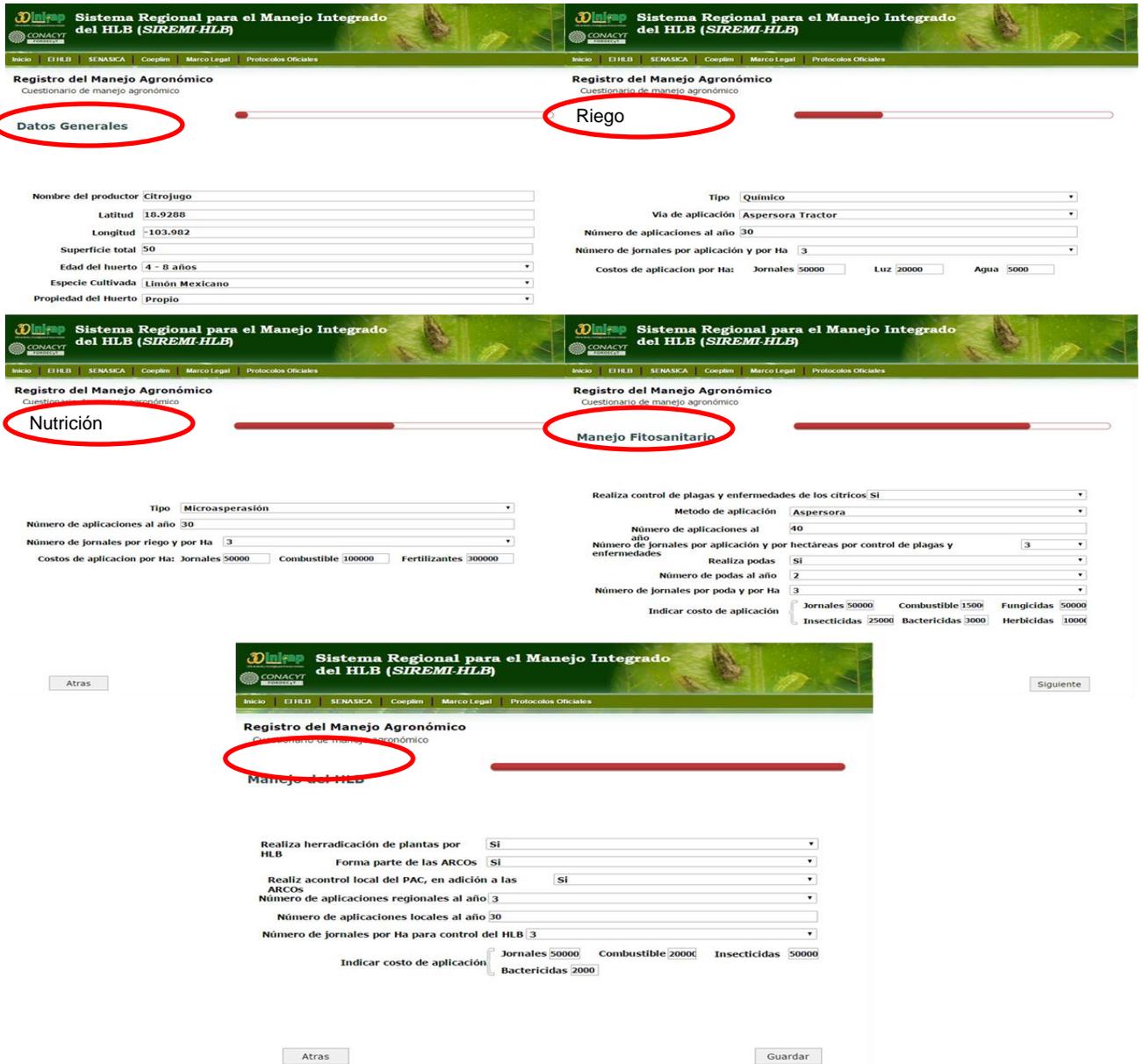


Figura 8. Vistas de la encuesta sobre el nivel de tecnificación clasificada por: datos generales, riego, nutrición, manejo fitosanitario y manejo de HLB.

La salida de este componente es: A) la ubicación del huerto registrado por el productor en el mapa del estado de Colima, B) el nivel de cronicidad de infección de CLas, el cual se asocia por cercanía a los huertos evaluados en el estudio *in situ* de la cronicidad regional; y C) el nivel de tecnificación del huerto con base en las categorías alta tecnificación (AT), moderada tecnificación (MT) y baja tecnificación (BT) (Figura 9).

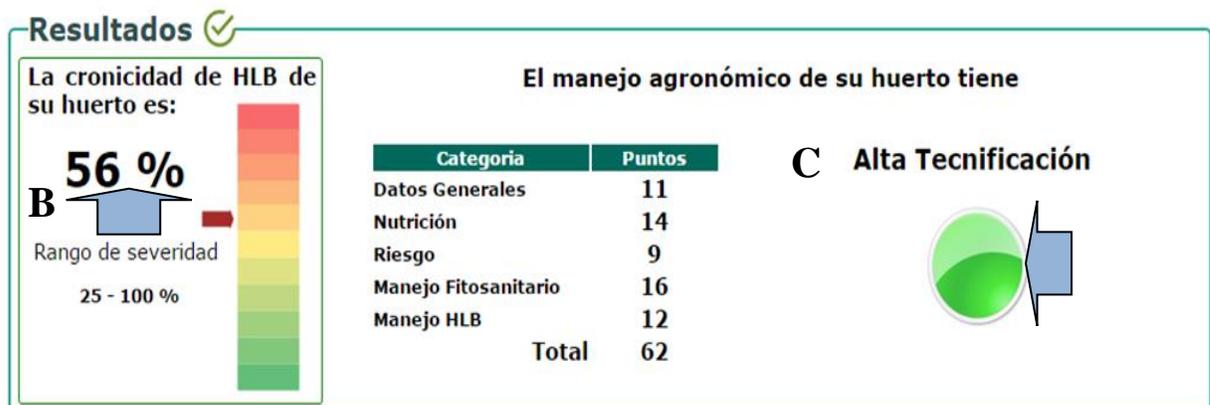


Figura 9. Vista de: A) la ubicación del huerto registrado por el productor en el mapa del estado de Colima, B) el nivel de cronicidad de infección de CLas, el cual se asocia por cercanía a los huertos evaluados en el estudio *in situ* de la cronicidad regional; y C) el nivel de tecnificación del huerto.

A partir de los datos de cronicidad y nivel de tecnificación de los huertos se muestra el nivel de pérdida productiva que presentaría su huerto; sin embargo, para evitarlo o reducirlo se emite una recomendación de manejo agronómico considerando un paquete de manejo agronómico integral, el cual se basará en paquetes tecnológicos desarrollados por

investigadores a nivel nacional e internacional (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2011; Stansly *et al.*, 2014) quienes señalan que niveles adecuados de nutrición, frecuencia de riego, altas densidades de plantación, renovación frecuente de plantaciones y control regional de DC mediante productos químicos y biológicos el control regional de DC, reducirían los impactos productivos de CLas y se podría mantener la rentabilidad de la actividad citrícola.

Adicionalmente, el productor podrá realizar evaluaciones de campo *in situ* de la cronicidad del HLB, las cuales podrá cargar al sistema por medio del usuario que registró, para actualizar la recomendación de manejo. Esta característica de retroalimentación permite que SIREMI-HLB sea un sistema dinámico y adaptativo y concebido para un desarrollo en etapas, el cual ya fue planteado como modelo conceptual para la generación de sistemas analíticos WEB aplicados a la vigilancia epidemiológica fitosanitaria (Guzmán-Hernández *et al.*, 2015). Este sistema también confiere otras ventajas como el generar un padrón citrícola actualizado, ya que los registros de los productores se complementan con información relacionada con las características del huerto como: superficie del huerto, especie, edad, si el productor es propietario o renta el terreno, o si tiene más de un huerto en producción.

Sin embargo, actualmente estos componentes se encuentran en desarrollo y requieren la complementación con insumos generados en otras líneas de investigación; un ejemplo de ello es el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Roya del Café en México, el cual fue generado en ambiente WEB con un enfoque de gestión y análisis de datos en forma *quasi-real* para optimizar la toma de decisión con fines de alerta temprana y prevención de riesgos de epidemias de esta enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Entre las ventajas de este sistema es que es integrativo, es decir, que otros componentes pueden adicionarse en función de los insumos disponibles; lo cual es deseable y en SIREMI-HLB sería de utilidad en los componentes como: ARCOs, población de *D. citri*, datos climáticos con el fin de generar algoritmos de pronóstico de riesgos para coadyuvar a la definición de épocas de aplicación para el control regional en las ARCOs o pronóstico de focos a nivel de huertos para control local en complemento a la escala regional.

Existen otras plataformas con un enfoque de base de datos con la integración de información técnica y científica generada a nivel mundial, como lo es la de la Universidad

de Florida, la cual es de gran pertinencia a nivel de gestores, analíticos e investigadores, pero no de productores y técnicos locales; Otro tipo de plataforma lo constituyen las generadas para llevar trazabilidad de las acciones de control regional de DC, como lo son para Florida las CHMAs (Citrus Health Management Areas) (Rogers *et al.*, 2011), en Brasil con áreas amplias (Bassanezi *et al.*, 2014b) y en México con el SIMDIA (Sistema de Monitoreo de *Diaphorina citri*) (SENASICA, 2015); sin embargo, todos los casos se basan en integrar información e insumos para el control regional de DC con la incorporación del productor como usuario, pero carecen de un enfoque holístico sobre el manejo integrado del cultivo basado en nutrición, riego, densidades adecuadas de plantación, control de DC, etc., lo cual se intenta realizar con esta propuesta SIREMI-HLB, adicionalmente otro objetivo de este sistema es adicionar plagas de carácter cuarentenario como la Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC), mancha negra (*Guignardia citricarpa*), entre otras con fines de prevención y sustentabilidad de la citricultura de Colima y México.

4.4. CONCLUSIONES

El Sistema Regional para el Manejo Integrado del HLB (SIREMI-HLB) en Colima constituye la primera propuesta de plataforma WEB para coadyuvar al manejo del HLB a nivel regional, bajo un enfoque holístico de manejo integrado del cultivo, por lo que su diseño se basa en el HLB como estudio de caso, pero con una visión de desarrollo por etapas para permitir la adición de otras plagas de carácter cuarentenario de los cítricos, así como insumos y elementos que mejoren la interacción con los usuarios.

El SIREMI-HLB intenta ser una herramienta útil, por su naturaleza dinámica y expedita en la recomendación de manejo agronómico bajo las condiciones indicadas por los productores. Sin embargo, aún requiere seguir trabajando varios elementos en ese enfoque de mejoras y adiciones en etapas.

En complemento el SIREMI-HLB genera un padrón citrícola actualizado, el cual es de gran utilidad en estudios de análisis de la cadena productiva limón mexicano y podría emplearse como metodología para su uso en otros patosistemas.

4.5. REFERENCIAS

1. Ahmad, K., Sijam, K., Hashim, H., Rosli, Z., and Abdu, A. 2011. Field assessment of calcium, copper and zinc ions on plant recovery and disease severity following infection of Huanglongbing (HLB) disease. *African Journal of Microbiology Research* 5(28): 4967-4979.
2. Baggio, T. Z., Barreto, T. P., Canteri, M. G., LeiteJunior, R. P. 2014. Resistência sistêmica adquirida em citros para controle de Huanglongbing. *In: 47° Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. 6_2. Del 17 al 22 de Agosto de 2014. Londrina, Paraná. Brasil.
3. Bassanezi, R. B., Montesino. L. H., Matos, D., Quaggio, J. A., Boaretto, R. M., and Bové, J. M. 2014a. Three years of nutritional management on Huanglongbing epidemics and crop loss in sweet orange grove. *In: 47° Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. 494_1. Del 17 al 22 de Agosto de 2014. Londrina, Paraná. Brasil.
4. Bassanezi, R. B., Miranda, M. P. and Santos, F. L. 2014b. Alerta Fitossanitário- *Diaphorina citri*: Ferramenta de apoio ao manejo regional do Huanglongbing dos citros. *In: 47° Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. 17 al 22 de agosto. Londrina, Paraná, Brasil.
5. Bassanezi, R. B., Montesino. L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto. P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., Bergamin, Filho. A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796.
6. Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Godoy, G. M. C., Filho, A. B., Amorin, L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in Sao Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130(4): 577-586.
7. Belasque, J. J., Filho, B. A., Bassanezi, B. R., Barbosa, J. C., Fernandes G. N., Yamamoto, T. P., Lopes, A. S., Machado, M. A., Pereira Leite, J. R., Ayres, J. A., and Massari, C. A. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*. 34(3): 137-145.

8. Bové, M. J. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88: 7-37.
9. Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Flores-Sánchez, J. L. y López-Arroyo, J. I. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782.
10. Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., López-Arroyo, J. I. y Robles-García, P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.
11. Guzmán-Hernández, E., Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., González-Gómez, R. y López-Buenfil, A. 2015. Modelo Conceptual y Metodológico para el Desarrollo de Sistemas Analíticos WEB Aplicados a la Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. *Revista Mexicana de Fitopatología (Suplemento)* 34.
12. López-Arroyo, J. I., Díaz-Martínez, S., Torres-Acosta, R. I., Reyes-Rosas, M. A. y Loera-Gallardo, J. 2012. Nuevos registros de depredadores del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama, en el Noreste de México. En *Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing*. p: 287. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.
13. Manzanilla-Ramírez, M. A., Robles-Gonzalez, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Orozco-Santos, M. y Carrillo-Medrano, S. H. 2012. Experiencias y perspectivas del Huanglongbing en Limón Mexicano. In *Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing*. p: 406-414. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.
14. Mora-Aguilera, G., Acevedo, G., Flores, J., Domínguez, S., Coria, J., Hernandez, A., González, R., López, A., Sánchez, H., Feria, J., Trujillo, J., López, E., Méndez, A., Matuz, J. and Martínez, M. 2014. Epidemiological Surveillance System for Coffee Rust Disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: a Regional Approach. In: *The 25th International Conference on Coffee Science*. 42-47 pp. September 8-14. Armenia, Colombia.

15. Nguyen, V. H., Tran, M. H., Nguyen, T. B., Bui, N. L., and Nguyen, M. C. 2013. Results on attempts in management of HLB under small scale in Vietnam and initiation in screening for HLB tolerant from varieties/clones belonging to Rutaceae. IRCHLB III Proceedings. P 10.13.
16. Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal. J. J., Manzanilla-Ramírez. M. A., Orozco-Sánchez. M., Medina-Urrutia. V. M., López-Arroyo, J. I. y Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1): 15-31.
17. Rogers, M. E., P. A. Stansly and L. L. Stelinski. 2011. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a Psyllid Management Plan. University of Florida, IFAS Extension, Gainesville, FL. <http://www.crec.ifas.ufl.edu/chma/>
18. Sandoval-Reyes, F., Arriaga-Gaona, M. L., Hernández-Limón, L., Hernández-Romero, I. Guzmán-González, F. I. 2013. Actividad biológica en campo del extracto etanólico de *Melia azedarach*, *Psidium guajava*, *Datura stramonium*, *Piper auritum* y *Azadirachta indica a juss* sobre la *Diaphorina citri*. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 9: 22-29.
19. Skaria, M. and Hanagriff, R. D. 2008. Micro-budded, High Density Citrus Planting: Is There an Opportunity for HLB Control and Financial Returns?. IRCHLB Proceedings. P 365-368.
20. Spann, T. M., Schumann A.W., Rouse B., Ebel B. 2011. Foliar nutrition for HLB. Citrus Industry. June. P. 6-10.
21. Stansly, P. A., Arevalo, H. A., Qureshi, J. A., Jones, M. M., Hendricks, K., Roberts, P. D. and Roka, F. M. 2014. Vector control and foliar nutrition to maintain economic sustainability of bearing citrus in Florida groves affected by Huanglongbing. Pest Management Science 70: 415-426.
22. SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe Diciembre, 2015. Revisado en web el 27 de diciembre 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
23. Stuchi, E. S., Reiff, E. T., Sempionato, O. R., Parolin, L. G., and Toledo, D. A. 2013. Evidence that 'flying dragon' trifoliate orange delays HLB symptom expression for

- four sweet orange cultivars, Tahiti lime and Okitsu mandarin. IRCHLB III Proceedings. P 10.18.
24. Stuchi, E. S and Girardi, E. A. 2010. Use of horticultural practices in citriculture to survive Huanglongbing. Documentos, 189/Embrapa Cassava & Fruits, ISSN 1809-4996.
 25. Xia, Y., Ouyang, G., Sequeira, R. A., Takeuchi, Y., Baez, I., and Chen, J. 2011. A review of Huanglongbing (Citrus Greening) management in citrus using nutritional approaches in China. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2010-1003-01-RV.
 26. Xu, M., Liang, M., Chen, J., Xia, Y., Zheng, Z., Zhu, Q., and Deng, X. 2011. Preliminary research on soil conditioner mediated citrus Huanglongbing mitigation in the field in Guangdong, China. European Journal of Plant Pathology doi: 10.1007/s10658-013-0238-z.