



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**  
POSTGRADO EN FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

**ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE FOCOS Y  
GRADIENTES DE DISPERSIÓN DEL  
HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS (HLB),  
EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN**

**JORGE LUIS FLORES SÁNCHEZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

**2011**

La presente tesis, titulada: **Análisis Estructural de Focos y Gradientes de Dispersión del Huanglongbing de los Cítricos (HLB)**, en la Península de Yucatán, realizada por el alumno: **JORGE LUIS FLORES SÁNCHEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:



**DR. GUSTAVO MORA AGUILERA**

ASESOR:



**DR. EMILIANO LOEZA KUK**

ASESOR:



**DRA. PATRICIA RIVAS VALENCIA**

ASESOR:



**DR. NOÉ RUIZ GARCÍA**

**Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre 2011**

## RESUMEN

### ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE FOCOS Y GRADIENTES DE DISPERSIÓN DEL HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS (HLB), EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Jorge Luis Flores Sánchez

Colegio de Postgraduados, 2011

En México, el HLB inducido por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas) se detectó en Yucatán, en 2009. Debido al carácter devastador de esta enfermedad y que México es el principal productor de cítricos agrios, es necesario cuantificar el efecto de CLas en producción comercial. Este trabajo tuvo como objetivo estimar pérdidas productivas inducidas por CLas en limón persa (*Citrus latifolia*) mediante la evaluación de variables morfológicas y organolépticas. En Tizimin Yucatán, árboles de cuatro años de limón persa se seleccionaron por su condición de manejo y enfermedad verificada por PCR cuantitativo. Ocho variables morfológicas y organolépticas se evaluaron en un diseño de bloques con tratamientos apareados. Los valores de peso, tamaño, grosor de cáscara, volumen de jugo y pH fueron estadísticamente mayores en frutos de árboles sanos (T1) con respecto a frutos de ramas sintomáticas (T2) (Tukey,  $p=0.05$ ). Brix y acidez titulable no fueron estadísticamente distintos entre T1 y T2. Con excepción del tamaño, no se encontraron diferencias entre T2 y ramas asintomáticas (T3) de árboles enfermos. El rango de reducción en T2 con respecto a T1 fue de 6.16-18.62 % para las diferentes variables, mostrando mayor reducción en peso (17.31) y volumen de jugo (18.62). Se detectó un efecto detrimental cuadrático de las variables en función al grado de severidad (0=sano, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100 %) para todas las variables excepto en Brix y acidez titulable ( $R^2=0.81-0.87$ ). El modelo para peso y volumen de jugo, respectivamente, fue:  $y=217.21-4.2x+0.03x^2$ , ( $R^2=0.86$ );  $y=645.4-11.7x+0.09x^2$ , ( $R^2=0.82$ ). El efecto detrimental se asoció con el incremento en la concentración

bacteriana ya que esta tuvo una relación directamente proporcional con la severidad ( $y=1.1736+0.77x-0.0067x^2$ ,  $R^2=0.91$ ). Este es el primer reporte del efecto de CLas en limón persa.

Con el propósito de establecer la existencia de gradientes de dispersión a partir del área de detección del HLB en la Península de Yucatán, se definieron cuatro transectos: Yucatán N-S= 60 km, 11 sitios de observación (O), dirección Norte-Sur (N-S); Yucatán E-O= 140 km, 13 O, dirección Este-Oeste (E-O); Q. Roo N-S= 51 km, 5 O, dirección N-S; Q. Roo= 51 km, 6 O, dirección E-O. En cada sitio de observación se midió la intensidad de la enfermedad mediante la evaluación de incidencia y severidad, adicionalmente se colectó material vegetal e insectos para su detección molecular. Los datos de incidencia y distancia entre las áreas de inspección se analizaron con los modelos de exponencial negativo y Gregory para determinar la existencia de gradientes de dispersión. El modelo exponencial negativo ajustó a los gradientes Yucatán N-S ( $y= 1.30*-(0.5*dist)$ ,  $R^2=0.98$ ) y Q. Roo E-O ( $y=1.1*-(0.5*dist)$ ,  $R^2=0.91$ ), mientras que el modelo de Gregory ajustó al gradiente Yucatán E-O ( $y= 329.4*dist*-(2.19)$ ,  $R^2=0.73$ ) y Q Roo N-S ( $y=5.84*dist-(1.12)$ ,  $r^2=0.73$ ) (Figura 5). La direccionalidad E-O fue más inductiva para la dispersión de *D. citri*.

Considerando la condición de reciente ingreso del HLB en el país se justifica la implementación de medidas urgentes de manejo sanitario y la activa participación del sector oficial y privado.

**Palabras clave:** pérdidas, severidad, *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada que en gran medida es lo que hace posible la culminación del estudio de posgrado.

A la instancia financiadora del proyecto FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591, que permitió realizar esta investigación.

A los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de la Península de Yucatán por el apoyo logístico brindado. A Edwin Hernández Chan por su apoyo en campo y laboratorio. A miembros del GIIC por su apoyo en la planeación.

Al Dr. Gustavo Mora Aguilera por su gran apoyo y consejos, además de dirigir la planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

Al Dr. Emiliano Loeza Kuk por el apoyo brindado en cada salida de campo, siendo el contacto más importante en la zona de desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Patricia Rivas Valencia y Dr. Noé Ruiz García por sus acertadas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

A Gerardo Acevedo Sánchez y Noemi de la Rosa Sánchez por brindarme su sincera amistad además del invaluable apoyo brindado durante toda el periodo del posgrado

A mis compañeros y amigos del Postgrado en Fitopatología que hicieron de mi estancia en el Colegio de Postgraduados una agradable experiencia.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
2.1. Importancia de la citricultura.....	3
2.2. Antecedentes del Huanglongbing de los Cítricos.....	4
2.3. Distribución del HLB en el mundo.....	5
2.4. Distribución del HLB en México .....	5
2.5. Importancia económica del Huanglongbing.....	5
2.6. Rango de Hospedantes del HLB.....	6
2.7. Agente Causal.....	7
2.8. Especies causantes del Huanglongbing .....	7
2.9. Síntomas .....	10
2.10. Dispersión de especies de <i>Candidatus Liberibacter</i> .....	13
2.10.1 Vectores .....	13
2.10.1.1. Distribución mundial de psílidos .....	13
2.10.1.2 Distribución geográfica de <i>D. citri</i> en México .....	13
2.10.1.3. Biología de psílidos.....	14
2.10.2 Yemas vegetales.....	16
2.11 Manejo de HLB en el mundo .....	16
2.12 Manejo del HLB en México .....	18
2.13 Aspectos Epidemiológicos del HLB.....	19
2.13.1 Progreso temporal .....	19
2.13.2. Progreso espacial .....	20
2.14 Detección de <i>Candidatus Liberibacter</i> spp mediante PCR .....	23
2.14.1 Primers para detección de <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. ....	24
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1. Selección del sitio de estudio.....	26
3.2. Observación de síntomas y evaluación de severidad.....	26
3.3. Diagnóstico y cuantificación de la concentración de CLas mediante PCR cuantitativo.....	26
3.4. Evaluación de variables morfológicas y organolépticas en frutos .....	27
3.5. Análisis estadístico de datos de estimación de pérdidas.....	28
3.6. Selección de gradientes transectuales de dispersión del HLB.....	29

3.7. Análisis estadístico de gradientes de dispersión.....	30
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1. Descripción de los síntomas de HLB en limón persa.....	31
4.2 Diagnóstico y cuantificación de la concentración de CLas mediante PCR en tiempo real..	32
4.3 Estimación de pérdidas con análisis de varianza.....	34
4.4 Estimación de pérdidas con modelos correlativos.....	38
4.5 Gradientes de dispersión del HLB.....	41
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>46</b>
<b>VII. ANEXOS .....</b>	<b>60</b>
Anexo 1. 1.1 Distribución mundial del HLB.....	61
Anexo 1. 1.2 Distribución del HLB en México.....	62
Anexo 1. 1.3 Rango de hospedantes de <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. ....	63
Anexo 1. 1.4. Distribución mundial de vectores de <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. ....	64
Anexo 2. 2. 1. Protocolo de extracción de ADN por método CTAB (modificado al 75 % para tubos de 1.5 mL) .....	65
Anexo 3. 1.1 Gradientes transectuales Yucatán N-S y E-O Quintana Roo N-S y E-O definidos para evaluación de dispersión del HLB. ....	66
Anexo 3 1.2 Distancias entre Gradientes transectuales de dispersión.....	66

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1. Porcentaje de reducción de las variables morfológicas y organolépticas de frutos de ramas sintomáticas y asintomáticas de árboles enfermos con HLB y de frutos de árboles sanos de limón persa (<i>C. latifolia</i>). Tizimin, Yucatán 2011.....</b>	<b>36</b>
---	-----------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Síntomas de HLB en limón persa (<i>C. latifolia</i>) confirmados como positivos por PCR cuantitativo. (A) Moteado difuso; (B) Manchas angulares; (C) Manchas angulares y puntos cloróticos; (D) Engrosamiento y acorchamiento de nervadura; (E) Amarillamiento generalizado de la lámina foliar; (F) Frutos con amarillamiento putativo a HLB; (G) Fruto de ramas sanas. Tizimin, Yucatán, 2011.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 2. Correlación de la severidad del HLB con la concentración de CLAs (número de copias del gen ADNr 16s x 1000,000) estimada mediante la técnica PCR en .....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 3. Comparación de medias de peso (A), diámetro ecuatorial (B), diámetro polar (C), grosor de cáscara (D), volumen de jugo (E), pH (F), Brix (G) y acidez titulable (H) evaluadas en frutos de limón persa (<i>C. latifolia</i>) provenientes de árboles sanos y con HLB sintomáticos y asintomáticos. Para cada variable, barras con al menos.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 4. Correlación de severidad de HLB y variables morfológicas peso (A), diámetro ecuatorial (B), diámetro polar (C), grosor de cáscara (D) y volumen de jugo (E) y organolépticas pH (F), Brix (G) y acidez titulable (H), de frutos sanos y de ramas sintomáticas de árboles enfermos de limón persa (<i>C. latifolia</i>). La línea y el modelo representan el ajuste mediante una regresión cuadrática. Tizimin, Yucatán 2011.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 5. Gradientes de dispersión del HLB en Yucatán N-S (A), E-O (B), Quintana Roo N-S (C) y E-O (D). La línea y la ecuación representan el ajuste de los modelos exponencial negativo y Gregory. Península de Yucatán, 2010-2011.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 6. Número de muestras de psíldos positivos detectados en los gradientes transectuales de Yucatán (A) y Q. Roo (B) de mayo de 2010 a febrero de 2011.....</b>	<b>43</b>



## I. INTRODUCCIÓN

En México, el HLB se reportó por primera vez en 2009, en Tizimin, Yucatán, asociada a la bacteria '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLAs) (Robles *et al.*, 2009). Esta especie se dispersa por *Diaphorina citri* (DC) Kuwayana (Hemiptera: Psyllidae) (Bové, 2006) y se transmite por injerto (Lopes *et al.*, 2009). En México, se reporta mayor severidad de síntomas fisiológicos e histológicos en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y limón persa (*Citrus latifolia*) en comparación con naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Flores *et al.*, 2010; Esquivel *et al.*, 2010). Los síntomas en hojas de cítricos agrios inician con puntos cloróticos, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteado y clorosis difusa hasta un amarillamiento en lámina foliar generalizado y defoliación. En frutos, solo en limón mexicano se ha observado maduración irregular la cual inicia con un color amarillento en la parte basal y eventualmente caída de frutos (Robles *et al.*, 2010). A nivel histológico se presenta 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 *et al.*, 2010). La expresión de síntomas no ha sido bien asociada con la concentración bacteriana y no existen muchos estudios en HLB al respecto. Sin embargo, Li *et al.* (2008) lograron optimizar el método de cuantificación de '*Ca. L. spp*', con PCR en tiempo real al generar una curva estándar universal que garantiza el cálculo de la concentración de esta bacteria. Existen pocos reportes del impacto destructivo del HLB con sustento cuantitativo y epidemiológico, la mayoría se restringe a cuantificar los daños considerando el efecto de erradicación y control del vector en cítricos dulces (Ayres y Yamamoto, 2007; Brlansky *et al.*, 2009). En trabajos específicos para estimar pérdidas en producción por efecto del HLB se

encontró una reducción hasta del 41 % de producción en naranja dulce cv. Valencia, en Brasil (Bassanezi *et al.*, 2009). Posteriormente, Bassanezi *et al.* (2011) determinaron la relación de producción por efecto de la enfermedad, encontrando una tendencia detrimental aunque afectado por una fuerte variabilidad. En México, Salcedo *et al.* (2010) estimaron pérdidas en producción a nivel de toda la cadena productiva de limón mexicano, limón persa y naranja dulce en ausencia del HLB y medida mediante métodos multivariado y epidemiología comparativa aplicados a posibles escenarios epidémicos con base en situación endémica en Brasil y Florida. En este trabajo generaron pronósticos a tres y cinco años para intensidad epidémica de bajo, medio y alto impacto. Las pérdidas estimadas fueron de 17.6 % en agrios y 52.7 % en naranja dulce.

Con el ingreso de CLas y su dispersión en el Pacífico y en la Península de Yucatán, y la prevalencia en cítricos agrios es necesario realizar un estudio que permita establecer criterios para toma de decisiones del sector oficial y privado considerando el carácter regulatorio de la misma.

Por lo anterior los objetivos de este trabajo fueron:

1. Estimar pérdidas en la producción de limón persa por efecto de CLas mediante la evaluación de variables morfológicas y organolépticas en frutos, para determinar el nivel de daño causado bajo las condiciones de Yucatán.
2. Estudiar gradientes transectuales de dispersión de HLB a partir de focos iniciales de CLas en la Península de Yucatán que permitan establecer criterios de muestreo con fines preventivos y erradicativos en el contexto de un sistema de vigilancia epidemiológica regional.

## II. 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, 2010). Las principales especies cultivadas son naranja dulce (*Citrus sinensis* (L) Osbeck), limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (L) Swingle), mandarino (*Citrus reticulata* (L)) y pomelo (*Citrus paradisi* (Macf.) y se cultivan en diversos climas tropicales y subtropicales del mundo (Ramírez *et al.*, 2000).

México, ocupa el cuarto lugar en producción mundial de cítricos con alrededor de 539,957 hectáreas y una producción de 7'394,917 toneladas, con un valor estimado de 8,050 millones de pesos (Trujillo *et al.*, 2008; FAO, 2010; SIAP, 2010). Los principales estados productores son Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León y Colima, siendo los tres primeros quienes suman más del 90% de la superficie citrícola del país (SIAP, 2010). 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. La citricultura representa una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional, 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).

La citricultura es afectada por problemas fitosanitarios, comercialización, productividad, entre otros. En cuanto a problemas fitosanitarios, los cítricos son atacados por plagas y enfermedades de importancia cuarentenaria. Entre los casos diversos actualmente con regulaciones por parte del gobierno de México destacan: el virus tristeza de los cítricos (CTV) y su vector el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*) (Gottwald *et al.*, 1997), el virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) y sus vectores, ácaros pertenecientes al género *Brevipalpus* (Childers *et al.*, 2001); el Huanglongbing de los cítricos (HLB) y sus vectores los psílicos *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* (Garnier *et al.*, 2000; SENASICA 2010); siendo ésta última, la enfermedad considerada más devastadora. En 2009, en la península de Yucatán se detectó la presencia de *Candidatus Liberibacter spp.*, bacteria causante del Huanglongbing de los cítricos, lo que representa un grave riesgo para la sustentabilidad de la citricultura mexicana.

## **2.2. Antecedentes del Huanglongbing de los Cítricos**

El Huanglongbing 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 (CAB International, 2000; Brlansky, 2009). 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 indefinida etiológicamente (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 a todos los cítricos de casi todos los cultivares, causando grandes pérdidas al acortar el periodo de vida de los árboles afectados (Chen *et al.*, 2009).

Hasta la fecha se conocen tres especies patogénicas, *Candidatus Liberibacter africanus*, *Ca. Liberibacter asiaticus* y *Ca. Liberibacter americanus*. Los vectores son dos especies de la familia psyllidae (Hemiptera): *Trioza erythrae* para la especie africana y *Diaphorina citri* para las especies asiática y americana (Garnier *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2005b y 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).

### **2.3. Distribución del HLB en el mundo**

El HLB se encuentra distribuido en todas las zonas citrícolas a nivel mundial (Anexo 1 1.1), su presencia es determinada por las condiciones ambientales, disponibilidad de cítricos y de la actividad del vector de cada especie.

### **2.4. Distribución del HLB en México**

Desde el ingreso del HLB al país en Julio de 2009, la dispersión se ha dado en diferentes zonas citrícolas y urbanas, detectando a CLAs en material vegetal e insectos en la mayoría de los estados citrícolas del país (Anexo 1 1.2).

### **2.5. Importancia económica del Huanglongbing**

Debido a la falta de métodos de manejo eficientes, a la severidad sobre la producción y a la rapidez con la que se dispersa el 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 (Alemán *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 remplazados 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 erradicados de nuevo (Aubert, 1993).

Brasil y EUA son los países donde esta enfermedad ha causado las pérdidas más grandes, se han eliminado más de 5 millones de árboles con síntomas de la enfermedad, además los costos que genera las aplicaciones contra el vector superan los 279 dólares/ha (Ayres y Yamamoto, 2007; Brlansky, 2009).

En México, SENASICA (2010) reporta la eliminación de 379 árboles con síntomas de la enfermedad en los Estados de Yucatán, Quintana Roo, Jalisco y Nayarit. Sin embargo, Texeira *et al.* (2005b) menciona que cuando un árbol presenta los síntomas característicos de la enfermedad, al menos 5 árboles aledaños a este ya portan a la bacteria, por lo que en poco tiempo la incidencia de la enfermedad crecerá exponencialmente.

## **2.6. Rango de Hospedantes del HLB.**

Huanglongbing es una enfermedad que afecta a las plantas de la familia Rutaceae. Afecta severamente a la naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y tangerina (*Citrus*

*deliciosa*) pero muchas otras especies muestran más o menos síntomas pronunciados de la enfermedad. Las afectaciones son menores o inexistentes en naranja trifoliata con sus híbridos, lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) y pomelo (*Citrus paradisi*) (INISAV, 1999).

La relación de especies en las que se ha encontrado HLB y su nombre común (Halbert y Manjunath, 2004) (Anexo 1 1.3)

## **2.7. Agente Causal**

*Candidatus Liberibacter* es la bacteria causante del Huanglongbing de los cítricos, es una bacteria Gram-negativa restringida a los tubos cribosos del floema, con paredes celulares muy delgadas que le permiten pasar por los plasmodesmos. El género *Candidatus* pertenece a la subdivisión  $\alpha$  de la clase *Proteobacteria* (Jagoueix *et al.*, 1994; Texeira *et al.*, 2005b). El nombre de “*Candidatus Liberibacter*” se deriva del término “*Candidatus*” que se utiliza para asignar a los organismos que no se puedan cultivar y por lo tanto no pueden ser clasificados y caracterizados con las técnicas tradicionales (Murray y Schleifer, 1994; Murray y Stackebrandt, 1995) y por el nombre trivial de “*Liberobacter*” del latín *Liber* (corteza) y *bacter* (bacteria) (Jagoueix *et al.*, 1994).

## **2.8. Especies causantes del Huanglongbing**

Se conocen a tres especies, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus* y *Ca. Liberibacter americanus*. La primera es un problema grave en muchos países de Asia, Africa, en la península Arábiga, Brasil y EUA (Brlansky, 2007).

*Ca. Liberibacter asiaticus* es la especie más tolerante al calor, ya que puede infectar a temperaturas que superan los 30° C (32° C – 35° C) por periodos largos, pero no a los 38° C (Lopes *et al.*, 2009).

La especie africana *Ca. Liberibacter africanus*, se encuentra distribuida en el Este, Centro y Sur de África. Puede ser reprimida o perder su capacidad infectiva por altas temperaturas y alta humedad, por esta razón se explica porque la enfermedad es más severa en áreas frescas con temperaturas de 20 a 25° C, a alturas de 600 m donde la humedad relativa rara vez sobrepasa el 25%. A altitudes bajas la enfermedad es menos severa, y prácticamente no se presenta en alturas por debajo de los 200 m (Garnier *et al.*, 2000; Texeira *et al.*, 2005b).

*Candidatus Liberibacter americanus* solo se encuentra en Brasil, al principio se pensó que solo se trataba de *Ca. L. asiaticus*, sin embargo, se demostró que se trataba de una nueva variante más virulenta que la asiática, una especie nueva, la especie americana. El vector también es el psílido *Diaphorina citri* (Texeira *et al.*, 2005b). Esta especie comparada con *Ca. L. asiaticus* es menos tolerante al calor ya que puede infectar a los cítricos en un rango aproximado de 24 a 30 °C, pero nunca a temperaturas mayores (Lopes *et al.*, 2009). La detección de la nueva especie origina preguntas como, es una especie originaria del Sur de América ó fue introducida junto con la especie asiática. El incremento de la incidencia de la especie asiática sugiere que el medio ambiente es más adecuado para su desarrollo y que la especie americana no es un buen competidor y puede existir en otros lugares con incidencias muy bajas. Aunque la especie asiática fue probablemente introducida de Asia, no se sabe aún donde se originó la especie americana (Da Graca, 2008).



Las infecciones de *Ca. Liberibacter asiaticus* y *americanus* son más severas que la infección de *Ca. Liberibacter africanus* ya que pueden causar la muerte de los árboles (Jepson, 2008).

La variante americana, se asemeja a la variante asiática en la expresión y severidad de los síntomas; sin embargo, estudios realizados en Brasil indican que pudiera ser intolerante al calor como la variante africana, pudiendo no causar síntomas o mantenerse indetectable por PCR. Lo cual pudiera estar pasando actualmente, ya que a pesar de haber sido *Ca. Liberibacter americanus* la primera detectada en Sao Paolo, en 2004, esta situación se ha invertido hoy en día, pues son más los árboles enfermos detectados con *Ca. Liberibacter asiaticus* (Lopes *et al.*, 2009).

Estas características específicas de cada especie de Candidatus *Liberibacter* se muestran en el recuadro inferior:

<b>Especies</b>	<b>Vector</b>	<b>Distribución mundial</b>	<b>Temp. óptimas</b>	<b>Severidad</b>	<b>Cita</b>
<i>Ca. asiaticus</i>	L. <i>D. citri</i>	Asia, Florida, Lousiana, Belice, Cuba, R. Dominicana y México	30-35 °C	Muy severa, muerte del árbol	Da Graca, 2008; Lopes <i>et al.</i> , 2009
<i>Ca. africanus</i>	L. T. <i>erythrae</i>	Este, Centro y Sur de África	20-25 °C	Menos severa, no causa la muerte del árbol	Garnier <i>et al.</i> , 2000; Texeira <i>et al.</i> , 2005b; Phahladira, 2008
<i>Ca. americanus</i>	L. <i>D. citri</i>	Brasil	24-30°C	Muy severa, muerte del árbol	Texeira <i>et al.</i> , 2005b; Lopes <i>et al.</i> , 2009

## 2.9. Síntomas

Los síntomas descritos para el Huanglongbing de los cítricos son: defoliación de los árboles, amarillamiento, reducción del tamaño de los frutos, amarillamiento de las venas y moteado del follaje (Khairulmazmi *et al.*, 2008). Pero el síntoma más evidente de la enfermedad es la presencia de una o más ramillas terminales del árbol con apariencia clorótica, que contrasta con el color verde de las hojas de las ramas no afectadas (Fundecitrus, 2009).

Los síntomas son frecuentemente más severos en naranjo dulce, mandarina y sus híbridos; moderados en toronja, limón y naranjo agrio; mientras que en lima, pomelo y naranjo trifoliado están considerados como más tolerantes (Manicom y van Vuuren, 1990; Halbert y Manjunath, 2004).

Bove (2006), mencionó que en las hojas, se observa la aclaración de nervaduras, fuertes moteados tanto en el haz como en el envés, manchas de formas irregulares, verdes-claras o amarillas, mezcladas con el verde normal sin una clara división entre ellas (islas verdes). En algunos casos se observa el engrosamiento de las nervaduras de las hojas, tomando un aspecto corchoso. Las hojas jóvenes afectadas permanecen de tamaño pequeño con moteado y amarillamiento, se observan brotes múltiples con hojas pequeñas, pálidas y moteadas creciendo en posición erecta, a este síntoma se le llama “orejas de conejos”.

Se han observado otros síntomas, como la reducción del número de frutos en el árbol infectado, caída prematura, frutos producidos (asimétricos) con una línea curvada a la mitad del fruto (observada al cortar el fruto longitudinalmente) y con presencia de moteado (Bove, 2006; Brlansky *et al.*, 2009). Los frutos producen poca cantidad de jugo, además de poca concentración

de sólidos solubles y azúcares, por lo que son muy ácidos y no pueden utilizarse en la industria por su sabor amargo-salado desagradable (INISAV, 1999).

Las semillas pueden ser abortadas o cuando se producen son pequeñas, semidesarrolladas y atrofiadas, adquiriendo una coloración oscura (muy pocas logran buen desarrollo) (Bove, 2006; Gómez, 2008; Robles, 2008).

Texeira *et al.* (2008) señala que los síntomas severos en hojas y en frutos se asocian con altas concentraciones de la bacteria.

Los síntomas varían de acuerdo al tiempo de infección, la etapa de la enfermedad, condiciones de manejo de la planta y otros factores, y pueden ser confundidos o enmascarados con los síntomas de otras enfermedades o deficiencias de minerales como zinc, hierro, manganeso, calcio, azufre, boro y magnesio (Bove, 2006; Brlansky, 2007; Fundecitrus, 2009).

Recientemente árboles con moteado difusos fueron encontrados en Brasil negativos para *Liberibacter*, pero infectados con un fitoplasma (Texeira *et al.*, 2008). Hace algunos años, se asociaron a los fitoplasmas con la muerte regresiva en Australia, mostrando síntomas similares a los causados por HLB (Broadbent *et al.*, 1976). Los síntomas de stubborn, causados por *Spiroplasma citri* aunque no idénticos a HLB si muestran alguna semejanza (Bové y Garnier, 2000).

Quizás todos estos procariontes limitados al floema causan alteraciones similares en el metabolismo celular del hospedante, por lo que los síntomas son semejantes (Da Graca, 2008).

En México, de acuerdo con la normatividad y plan de acción para el manejo del Huanglongbing por parte de SENASICA, se han erradicado a la mayoría de los árboles positivos, por lo que los síntomas observados solo incluyen: moteados difusos en hojas, el síntoma conocido como orejas

de conejo, caída de hojas cuando éstas se vuelven amarillentas, acorchamiento de hojas, reducción del número de frutos, frutos asimétricos, maduración irregular iniciando por la parte basal, baja cantidad de jugo, también se han encontrado semillas atrofiadas con forma y color irregular (Robles *et al.*, 2009; SENASICA, 2009).

Estos síntomas son hasta el presente aparentemente más severos y con distribución generalizada en el dosel de cítricos agrios. A continuación se enfatizan los síntomas de HLB reportados en la literatura:

Órgano	Color	Tamaño	Forma	Localización
Hojas	Moteado, zonas amarillas rodeadas de verde normal	Se reduce el tamaño de hojas	Irregular	Irregular, puede iniciar en la parte basal pero no necesariamente
Brotes	Amarillo	Normal	Normal	En la zona basal del brote
Frutos	Se maduran de manera irregular, amarillándose primero el ápice	Puede ser pequeño o regular depende de la etapa de infección	Asimétricos	En la zona basal
Semillas	Café oscuro	Pequeño	Irregular	En toda la semilla
Árbol	Amarillo cuando la enfermedad está muy avanzada	Arboles jóvenes pueden permanecer pequeños hasta su muerte	Irregular, con ramas y hojas enfermas erectas	Dosel del árbol

## **2.10. Dispersión de especies de *Candidatus Liberibacter***

### **2.10.1. Vectores**

*Ca. Liberibacter* spp. es una bacteria persistente que se reproduce dentro del insecto y es capaz de transmitir a otras generaciones aunque en bajas de transmisión (Pelz-Stelinsky *et al.*, 2010). La bacteria se aloja en el floema de la planta impidiendo la circulación de los nutrientes por el taponamiento de los vasos floemáticos, provocando síntomas típicos de deficiencias nutritivas en la planta (Da Graca, 1991).

La principal forma de dispersión de la bacteria causante del HLB es a través de dos vectores: *Diaphorina citri* (Kuwayama) para las especies asiática y americana, y *Trioza erytreae* (Del Guercio) para la especie africana (Garnier *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2007; Hall, 2008).

#### **2.10.1.1. Distribución mundial de psílicos**

*D. citri* es el vector con mayor distribución mundial de CLAs, mientras que *Trioza erytreae* solo se ha reportado en el continente africano (Hall, 2008; Garnier *et al.*, 2000; Bove, 2006; Da Graca, 2008). (Anexo 1 1.4)

#### **2.10.1.2. Distribución geográfica de *D. citri* en México**

La primera detección del psílido asiático de los cítricos se realizó en el año 2002, en los estados de Campeche y Quintana Roo, desde esa fecha *D. citri* posiblemente se desplazó por todo el territorio mexicano y actualmente se encuentra distribuido en todas las zonas citrícolas de México (López-Arrollo *et al.*, 2008; Trujillo *et al.*, 2008).

Datos de densidad poblacional en diversas entidades federativas indican altas poblaciones en el rango de 15 a 20 de adultos y fluctuaciones durante todo el año con mayor concentración en los periodos de brotación (López *et al.*, 2005), lo que demuestra la adaptabilidad del insecto a las condiciones de México.

### 2.10.1.3. Biología de psílicos

*T. erythrae* es muy sensible al calor y al clima seco, le favorece el frío (20-24° C) y las condiciones que se presentan por arriba de los 500-600 msnm. Los huevos son depositados en la epidermis de las hojas, donde existan las condiciones de humedad necesarias. Las hembras permanecen fértiles de 11 a 16 días en ausencia de machos adultos y su máxima producción de huevos (2,000 por hembra) la alcanza entre los 17 a 50 días (Garnier *et al.*, 2000).

*D. citri* es más tolerante al calor y al clima seco, se desarrolla a temperaturas de 25-28°C. Tiene un periodo de vida corto y una alta fecundidad. Las hembras tienen un período de oviposición de 12 días y son capaces de depositar hasta 800 huevos en el transcurso de su vida. Los huevos eclosionan a los tres días en verano y hasta los 23 días en invierno. El ciclo completo es de 15 a 47 días, y puede presentar hasta 10 generaciones por año (Fung y Chen, 2006). Las características biológicas de cada vector se presentan en el recuadro inferior:

<b>Psílido</b>	<b>Longevidad adulto</b>	<b>No. de Instares</b>	<b>Tamaño Adulto</b>	<b>Tamaño Ninfas</b>	<b>No. de Huevos</b>	<b>Ciclo de Vida</b>	<b>Temp. de Desarrollo</b>
<i>D. citri</i>	40 días.	5 instares	3-4	1.5-1.7	8 x día,	15-47	25-28 °C.

		ninfales.	mm.	mm.	800 en toda la vida.	días.	
<i>T. erythraea</i>	30 días.	5 instares ninfales.	4 mm.	1.3-1.5 mm	2000 en toda su vida.	17-43 días	20-24 °C.

Un comportamiento típico del insecto adulto es saltar de las hojas cuando éstas son movidas, al estar sobrepobladas o cuando poseen pocas condiciones para su desarrollo, efectuando un vuelo de tres a cinco metros, y diseminando así al patógeno dentro de la plantación. En algunas ocasiones, estos vuelos toman una altura de 5 a 7 metros del suelo, de donde los insectos son arrastrados por las corrientes del aire y trasladados a distancias de 0.5 a 4 km, y aún mayores (Fung y Chen, 2006; Hall, 2008).

Estos insectos cuando se alimentan de los brotes tiernos, extraen gran cantidad de savia y provocan el desarrollo de fumagina, que obstaculiza la función fotosintética (González *et al.*, 2007). El proceso de transmisión de la bacteria en cada vector se muestra en el recuadro inferior:

<b>Psíidos</b>	<b>Eficiencia de Transmisión</b>	<b>Adquisición</b>	<b>Tipo de Transmisión</b>	<b>Multiplicación en Vector</b>	<b>Transmisión Transovarica</b>
<i>D. citri</i>	Alta (toda la	15-30 min.	Persistente	+	+

	vida).				
<i>T. erythrae</i>	Alta (toda la vida).	15-30 min.	Persistente	+	+

### 2.10.2. Yemas vegetales

Otra forma importante de diseminar el patógeno a grandes distancias es mediante el traslado de yemas y plantas contaminadas, razón por la cual algunos de los países afectados, como México (NOM-079-FITO-2002), han implementado programas de certificación estrictos, mediante los cuales garantizan que las plantas que llevan a campo están libres de éste y otros patógenos (Bove, 2006). El HLB fue primeramente transmitido experimentalmente mediante injerto (Chen, 1943).

### 2.11. Manejo de HLB en el mundo

A nivel mundial, las estrategias utilizadas para el manejo de la enfermedad son: la eliminación de árboles enfermos, uso de antibióticos como clorhidrato de tetraciclina para eliminar la bacteria, utilizar plantas sanas, aplicación de insecticidas y uso de enemigos naturales contra el vector (Aubert *et al.*, 1996; Da Graca y Kortsen, 2004).

Irey *et al.* (2008) menciona que es importante establecer un programa de manejo basado en reducir la cantidad de inóculo, controlar el vector y usar material vegetal libre de la enfermedad. Así mismo, inmediatamente después de la detección de HLB en las huertas, se debe revisar toda la plantación para determinar el grado de la infección de HLB establecido y los árboles infectados deben ser eliminados. También se debe implementar un programa agresivo en toda la plantación para controlar el psílido de los cítricos. Adicionalmente se debe establecer un vivero moderno



para producir plantas libres de la enfermedad en una localidad remota, usando material de propagación analizado como libre de la enfermedad. Los reportes de las estrategias de manejo utilizadas a nivel mundial se muestran en el siguiente recuadro:

Principio	Método	Lugar	Efecto	Cita
Exclusión	Estrategia cuarentenaria en el Norte de Australia, para evitar la introducción de <i>Diaphorina citri</i> y HLB.	Australia	La estrategia cuarentenaria en el Norte de Australia hasta el 2005 había sido un éxito y no se había detectado la presencia del psílido asiático de los cítricos. Una planta con los síntomas característicos de HLB resultó negativa.	Bellis <i>et al.</i> , 2005.
Erradicación	Eliminación de la bacteria, mediante un proceso de criopreservación.	Guang dong, China	El proceso de criopreservación, eliminó la bacteria en los cinco genotipos evaluados (plántulas) de cítricos, en más del 90%.	Ding <i>et al.</i> , 2008.
Protección	Control biológico de <i>D. citri</i> por <i>Tamarixia radiata</i> (parasitoide).	Florida, EUA	<i>Tamarixia radiata</i> , fue recuperada en el cuarto y quinto instar ninfal de <i>D. citri</i> , en 26 de las 28 muestras analizadas. Sin embargo, el porcentaje de incidencia de parasitismo varía durante el año, presentándose con mayor eficiencia de Septiembre a Noviembre (56%), y con menor eficiencia en la primavera y el verano (<20%).	Qureshi <i>et al.</i> , 2009.
	Repelencia de hojas de guayaba a <i>Diaphorina citri</i> .	China	Las hojas de Guava sp. secretan sustancias volátiles repelentes para el psílido de los cítricos, el cual reduce su presencia en los huertos de cítricos, al haber plantas de guayaba.	Zaka <i>et al.</i> , 2009.
	Control químico de <i>D. citri</i> , al combinar Silwet L-77 con Imidacloprid ó Abamectina.	Florida, EUA	Al combinar Silwet L-77 con Imidacloprid o Abamectina, se incrementa la mortalidad de huevecillo, ninfas y adultos en más del 90%.	Srinivasan <i>et al.</i> , 2008.
	Control biológico con el hongo <i>Isaria fumosorosea</i> .	Florida, U.S.	El hongo <i>Isaria fumosorosea</i> , infectó a todos los adultos de <i>D. citri</i> , expuestos al hongo.	Meyer <i>et al.</i> , 2008.
	Poda de cítricos.	Brasil	Se utilizó la poda como estrategia de manejo para la enfermedad (Huanglongbing), sin embargo los síntomas reaparecieron en las ramas previamente sintomáticas e incluso en las asintomáticas. A mayor severidad antes de la poda menor es el porcentaje de árboles que permanecieron asintomáticos después de la poda.	Lopes <i>et al.</i> , 2007a.

## 2.12. Manejo del HLB en México

Desde la detección del HLB en México, se han implementado algunas estrategias de manejo principalmente aplicadas por los CESV, las cuales se mencionan en el recuadro inferior:

Principio	Método	Lugar	Efecto	Cita
Exclusión	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eliminación de plantas hospederas de <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. y <i>Diaphorina citri</i>.</li> <li>• control químico del psílido de los cítricos.</li> <li>• 225 eventos de capacitación a productores, técnicos y público en general.</li> </ul>	Veracruz, Tamaulipas, Sonora, Michoacan, S. L. Potosí, Nuevo León, Baja California.	Hasta el momento no se han detectado muestras vegetales ni de insecto en estos estados	SENASICA, 2010.
Erradicación	Eliminación de 478 plantas de cítricos y 2932 de limonaria.	Yucatan, Quintana Roo, Campeche, Nayarit, Jalisco, Colima y Sinaloa.	Con la eliminación de los árboles positivos a HLB, se ha impedido hasta el momento, una dispersión más agresiva de la enfermedad, evitando así tener mayor número de árboles enfermos por foco de infección.	SENASICA, 2010.
Protección	Control químico de <i>D. citri</i> en 204215 plantas de cítricos y 37731 limonarias con el producto Citlali, ingrediente activo Imidacloprid.	Yucatan, Quintana Roo, Campeche, Nayarit, Jalisco, Colima y Sinaloa.	Controlando al vector de la bacteria causante del HLB se espera reducir en gran medida la dispersión de la enfermedad hacia las zonas libres de la enfermedad.	SENASICA, 2010.

## **2.13. Aspectos Epidemiológicos del HLB**

### **2.13.1 Progreso temporal**

Las epidemias de HLB son de varios años de duración y comúnmente en una plantación no se permite que la enfermedad avance a una alta incidencia, ya que antes los árboles son eliminados o se convierten en no productivos (Gottwald *et al.*, 1989; Gottwald *et al.*, 2007).

Gottwald *et al.* (1989) señaló que las dificultades para realizar estudios epidemiológicos cuantitativos sobre HLB, radican en lo complicado de localizar los sitios de estudio donde se encuentra la enfermedad, y donde las epidemias se pueden seguir a través de múltiples años para entender plenamente su potencial epidémico. Esto se debe a los efectos devastadores de HLB que se asocian con el rendimiento de los cítricos y las graves pérdidas de calidad.

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).

Gottwald *et al.* (1990) estimó el cambio en el progreso espacial de la epidemia de HLB a través del tiempo en huertas de Filipinas, cuyos cítricos provenían de viveros locales. En 17 meses de evaluaciones periódicas encontró que solo un bajo porcentaje (10-20%) de árboles originarios de viveros habían sido previamente infectados, y que la mayor dispersión de la bacteria se había dado a través del psílido vector durante los siguientes 2 ó 3 años hasta llegar a formar agregados amorfos.

En cuanto al progreso temporal de las epidemias de HLB, los síntomas y la severidad son variables muy importantes para evaluar, varios síntomas han sido observados de 1-5 años después

de la presencia del primer síntoma, esto depende de periodos de latencia y periodos de infección, de la bacteria, de la edad de los árboles, pero también del número de infecciones por árbol, las cuales son múltiples (Gottwald *et al.*, 1989; Aubert, 1992).

En estudios recientes en Vietnam, Florida y Brasil, en áreas donde la enfermedad es endémica y tiene gran cantidad de fuente de inóculo, las epidemias de HLB fueron más rápidas en plantaciones jóvenes, incluso con aplicaciones de insecticidas contra el vector (Bassanezi *et al.*, 2005; Gottwald *et al.*, 2007).

Mora-Aguilera *et al.* (1996) mencionó que la estructura temporal de una epidemia es definida por parámetros univariados ó multivariados asociados al progreso de una enfermedad, ya que determinan su forma, intensidad o localización temporal.

El análisis temporal de epidemias tiene como propósito medir el efecto de las interrelaciones de los subsistemas epidemiológicos por medio del uso de curvas de progreso de la enfermedad o de mediciones específicas, con criterios fenológicos, de intensidad de enfermedad en el tiempo. Los estudios pueden ser divididos en descriptivos e inferenciales.

### **2.13.2. Progreso espacial**

Las epidemias como procesos espaciales también tienen una estructura espacial. Ésta la determinan parámetros como índices de dispersión, índices de agregación, dependencias espaciales e intensidad de agregación, entre otros, los cuales definen el tamaño, localización y forma de agregados de plantas con algún atributo poblacional. Cuando un estudio espacial se realiza a intervalos temporales se pueden estimar otros atributos estructurales como velocidad de

expansión de focos infecciosos. Estos estudios se representan mediante mapas bi o tridimensionales (Mora-Aguilera *et al.*, 1996).

Conforme progresa una enfermedad en el tiempo, también se va diseminando espacialmente, dando lugar a diferentes patrones de distribución de la enfermedad en campo. Los patrones de distribución espacial más comunes en la naturaleza son la distribución al azar y la distribución agregada, también llamada distribución en parches (Arauz-Cavallini, 1998).

Los patrones de distribución espacial de una enfermedad están muy relacionados con los patrones de dispersión de la misma. La disminución de la cantidad de enfermedad en función de la distancia de la fuente de inóculo se denomina gradiente de dispersión. Los gradientes de dispersión se describen en función de la forma de un gráfico de cantidad de enfermedad contra distancia de la fuente de inóculo. Así un gradiente en el cual la cantidad de enfermedad desciende abruptamente con la distancia a partir de la fuente de inóculo se describe como un gradiente pronunciado, mientras que uno con descenso paulatino se describe como un gradiente gradual (Campbell y Madden, 1990; Arauz-Cavallini, 1998).

En enfermedades con gradientes de dispersión graduales el efecto de foco se pierde rápidamente en el curso de la epidemia, mientras que si el gradiente de dispersión del inóculo es pronunciada (esto es, el inóculo se mueve a distancias cortas), el efecto de foco es también pronunciado, aunque eventualmente los focos llegan a traslaparse y difíciles de determinar (Arauz-Cavallini, 1998).

Campbell y Madden (1990) menciona que las fuentes de inóculo de un gradiente de dispersión pueden ser de tres tipos: en un punto, en una línea y en un área. Estas fuentes de inóculo son

simplemente focos de infección, que varían en el tamaño de su estructura dando como resultado la dimensión en cuanto a tamaño de ese gradiente.

La localización de la fuente de inóculo primario influye sobre el patrón de distribución espacial de la enfermedad. Así, si el inóculo primario es una fuente lejana, la distribución espacial inicial tenderá a ser al azar, mientras que si el inóculo primario se encuentra dentro del campo, la distribución espacial primaria tenderá a ser más o menos agregada alrededor de las fuentes de inóculo (Arauz-Cavallini, 1998).

Una fuente de inóculo localizada en un campo contiguo resulta típicamente en una distribución espacial con predominancia de plantas enfermas hacia la orilla del campo. El desarrollo de ciclos secundarios da lugar al desarrollo de focos, los cuales serán más o menos pronunciados dependiendo de los mecanismos de dispersión del inóculo secundario (Arauz-Cavallini, 1998).

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

Bassanezi *et al.* (2005) caracterizó el progreso espacial de la epidemia de HLB en Sao Paulo, Brasil y encontró una gran similitud con el progreso espacial en Asia, un patrón de focos a distancias entre 25 y 50 metros, esto indica los mecanismos espaciales asociados con las grandes distancias que recorre el vector.

Lopes *et al.* (2007b) 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.

En Florida, desde la primera detección en la ciudades de Homestead y Florida, en 2005, el HLB se ha dispersado por todo el Estado, esto debido a la uniformidad de superficie citrícola y a la capacidad de dispersión del vector (Da Graca y Korsten, 2004; Brlansky, 2009).

#### **2.14. Detección de *Candidatus Liberibacter* spp mediante PCR**

La detección de esta bacteria es difícil mediante las técnicas tradicionales de laboratorio, esto debido a la baja concentración e irregular distribución de la bacteria en la planta (Tatineni *et al.*, 2008). Sin embargo, en 1996 se desarrolló una prueba rápida y sensible basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificarla (Jagoueix *et al.*, 1996; Hocquellet *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 1999).

La técnica PCR es utilizada extensivamente y con éxito para la amplificación de *Canididatus Liberibacter* spp. en material vegetal y en el psílido vector, en los países donde esta bacteria se encuentra presente (Jagoueix *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 1999; Garnier *et al.*, 2000).

Sin embargo, el utilizar solo la PCR convencional generaba dudas sobre la detección de falsos positivos ó negativos y se propuso la idea de generar otra prueba con mayor sensibilidad y confiabilidad, ya que este proceso era crítico para la detección temprana de la bacteria, lo cual es crucial para el manejo del Huanglongbing (Tatineni *et al.*, 2008). Por lo que se desarrolló PCR en tiempo real, la cual mejora la velocidad, sensibilidad, reproducibilidad, robustez y reducción en el riesgo de contaminación en comparación con la PCR convencional (Li *et al.*, 2006).

El desarrollo de PCR y PCR en tiempo real proporcionan una mayor sensibilidad de detección de Liberibacter, incluso en los tejidos asintomáticos de árboles infectados (Li *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2008)

Teixeira *et al.* (2008) menciona que la técnica PCR convencional es aún de utilidad con síntomas característicos de la enfermedad como moteado difuso. En hojas con este síntoma existe una concentración de  $10^7$  liberibacters por gramo de nervadura central (l/g). Cuando no hay presencia de estos síntomas típicos la técnica de PCR convencional es 100 veces menos sensible que PCR en tiempo real.

#### 2.14.1. Primers para detección de *Candidatus Liberibacter sp.*

Para la detección de las tres especies de '*Candidatus Liberibacter spp*' se han utilizado diferentes oligonucleótidos los cuales se enlistan en el recuadro inferior:

Primers	Secuencia 5' a 3'	Especie	Cita
OL1	TCTGTTTTCTTCGAGGTTGGTGAG	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Tian <i>et al.</i> , 1996
OL2	ACCGCAAGACTCCTTACCAGGAAG	<i>Ca. L. asiaticus</i>	
s/n	CACCGAAGATATGGACAACA	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Hung <i>et al.</i> , 1999
s/n	GAGGTTCTTGTGGTTTTCTG	<i>Ca. L. asiaticus</i>	
OI1	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Jagoueix <i>et al.</i> , 1994
OI2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	<i>Ca. L. asiaticus</i>	
A2	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT	<i>Ca. L. africanus</i>	Garnier <i>et al.</i> , 2000
J5	ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA	<i>Ca. L. africanus</i>	
HLB-65	TCCTGAGAATTACACACAAA	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Tatineni <i>et al.</i> , 2008



HLB-66	TCTAAGTCTATCCTGTAACCC	<i>Ca. L. asiaticus</i>	
OA1	GCGCGTATTTTATACGAGCGGCA	<i>Ca. L. africanus</i>	Jagoueix <i>et al.</i> ,
OI2c	ATGGGTTGCGAAGTCGCGAGGC	<i>Ca. L. africanus</i>	1996
GB1	AGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT	<i>Ca. L. americanus</i>	Teixeira <i>et al.</i> ,
GB3	GTATATTTGCCATCATTAAGTTGG	<i>Ca. L. americanus</i>	2005a

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Selección del sitio de estudio**

En un huerto de 30 ha de limón persa de 4 años de edad con manejo altamente tecnificado (riego por goteo, fertilización, poda, aplicación química contra DC, etc), en Tizimin, Yucatán, primera detección de HLB en México, se seleccionó un bloque de 0.5 ha con focos activos de enfermedad. El primer árbol positivo se detectó en enero de 2010 y tres meses después se censó talmente mediante evaluación visual.

#### **3.2. Observación de síntomas y evaluación de severidad**

Con el objetivo el aumentar la sensibilidad visual y confiabilidad de evaluación de severidad se integró un acervo fotográfico de síntomas de HLB para su caracterización y desarrollo de una escala de evaluación. La evaluación de severidad se realizó en el bloque seleccionada de 0.5 ha en 388 árboles. Se utilizó una escala aritmética de severidad en la cual se consideraron las siguientes clases: 0=sano, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100 %. El porcentaje de severidad se estimó dividiendo el dosel del árbol en cuatro secciones de 25 %. La severidad total (Sevt) por árbol fue la suma del porcentaje de cada sección (s).  $Sevt = \sum(Sevs)$ . Donde s= 1-4.

#### **3.3. Diagnóstico y cuantificación de la concentración de CLas mediante PCR cuantitativo**

El tejido vegetal se colectó en los arboles seleccionados, en la última semana de Marzo de 2011, época con temperaturas frescas favorables para la multiplicación de la bacteria y expresión de síntomas. En total se colectaron de las ramas cosechadas, ocho hojas sintomáticas y ocho asintomáticas en árboles enfermos y el mismo número en árboles sanos. El análisis molecular se

realizó en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario del sureste de la Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria en Mérida, Yucatán. El aislamiento de ADN se realizó mediante DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen ®) para 0.1 g de tejido vegetal y fue suspendido en 100 µL de Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-HCl, 1 M de EDTA, pH 8.0). La técnica PCR en tiempo real se llevó a cabo en un termociclador Biorad® CFX96, se utilizó el método TaqMan®, con sondas y primers específicos para CLas que amplifican una porción del gen ADNr 16s, polimerasa Taq platino (Invitrogen®), sonda y primers basados en la enzima citocromo-oxidasa (COX), buffer PCR, MgCl<sub>2</sub>, dNTP's y agua ultra pura (DGSV- CNRF, 2008; Li *et al.*, 2006). La cuantificación absoluta del genoma de CLas se realizó en 96 lecturas de cuatro repeticiones cada una, clonado en un plásmido PGEM®T (Easy vector system Promega®), para clonar el gen ADNr 16s, inserto en *E. coli*. El plasmido fue purificado y cuantificado por uv-espectrofotometría (nanodrop) para realizar diluciones seriales. Estas diluciones se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica donde  $y = (-6.221) * \ln(Ct) + 27.409$ . La determinación de la relación de la severidad de síntomas con la concentración bacteriana, en términos de número de copias del gen ADNr 16s, se realizó mediante el ajuste de un modelo cuadrático.

### **3.4. Evaluación de variables morfológicas y organolépticas en frutos**

Los frutos colectados debidamente etiquetados se conservaron en refrigeración hasta su evaluación entre el segundo y quinto día después de la cosecha. Las mediciones se realizaron en INIFAP Yucatán. Las variables morfológicas consistieron en peso (g) por fruto, medido con una balanza analítica; diámetro ecuatorial (DE); diámetro polar (DP) y grosor de cáscara (GC) (mm)

estimados mediante un vernier digital marca Truper®; volumen de jugo (VJ) (mL) calculado con 10 frutos por tratamiento. Las variables organolépticas se midieron con el jugo extraído de frutos determinándose la concentración de grados Brix utilizando un refractómetro digital marca Palette®, calibrado previamente con agua destilada estéril. Se determinó el pH utilizando un potenciómetro marca HACH®, previamente calibrado con los buffers de calibración. Se consideró la acidez titulable calculada con una solución indicadora fenolftaleína, la cual vira de incoloro a rosa al adicionar NaOH y se haya alcanzado la basicidad requerida (pH= 8.3).

### **3.5. Análisis estadístico de datos de estimación de pérdidas**

El experimento consistió en un diseño de bloques con tratamientos apareados, árboles sanos (T1) adyacentes a árboles enfermos, de los cuales se consideraron ramas sintomáticas (T2) y asintomáticas (T3). Se seleccionaron 32 árboles distribuidos en seis bloques en subrepeticiones incompletas con cuatro, seis y ocho árboles. Los bloques se seleccionaron en forma dirigida a focos de enfermedad. Esta metodología es análoga a la empleada por Cristóbal *et al.* (2006) para reducir la variabilidad de los datos por efectos de intensidad y periodos de infección, fertilidad de suelo y manejo agronómico del huerto. Por árbol se colectaron 10 frutos en T1, T2 y T3 para la evaluación de las variables morfológicas y organolépticas. Las medias de cada variable por árbol se organizaron por tratamientos, severidad y bloque para un ANVA y comparación de medias con Tukey ( $p=0.05$ ). Los análisis se realizaron con SAS V9.0.

Adicionalmente, se realizó un análisis correlativo de pérdidas, en el cual se seleccionaron 50 árboles tomando en cuenta un enfoque de selección de plantas individuales, 10 árboles por cada clase de severidad, esto permitió aumentar la variabilidad del efecto de producción en función del

daño para determinar el modelo correlativo. Previo al análisis correlativo se realizaron histogramas de frecuencia por variable y nivel de severidad para observar la distribución de los datos y detectar posibles observaciones fuera de tendencia que pudieran constituirse en puntos de influencia en la estimación de los parámetros estadísticos. Los valores de cada variable evaluada y el porcentaje de severidad de cada árbol se ajustaron independientemente a distintos modelos correlativos.

### **3.6. Selección de gradientes transectuales de dispersión del HLB**

Se establecieron cuatro gradientes transectuales en la Península de Yucatán, dos en Yucatán y dos en Q. Roo, Transecto N-S) El Cuyo -> Xcan, Transecto E-O) Xcan -> Kantunil; Transecto N-S) Chiquilá->San Pedro, Transecto E-O) San Pedro->Cancún (Anexo 3 1.1), a partir de los focos de infección originalmente detectados y erradicados por los Comités Estatales de Sanidad Vegetal (CESV). La metodología previamente fue empleada con amarillamiento letal del cocotero en México (Mora y Escamilla, 2001; Gongora *et al.*, 2004). Estos gradientes fueron definidos considerando los siguientes criterios: rutas de viento dominantes en la región, carreteras donde hay alta movilidad de productos cítricos y donde la llegada de psíidos infectivos se favorecía por la disponibilidad de cítricos adyacentes a estas carreteras. En total se seleccionaron 33 áreas de inspección para Yucatán y 17 para Q. Roo a distancias variables que corresponden a comunidades rurales seleccionadas por la naturaleza de la epidemia (Anexo 3 1.2). El 92% de las áreas corresponden a huertas de traspatio y el 8% a huertos comerciales.

De Mayo 2010 a Febrero 2011, se realizaron 10 muestreos por transecto. En cada área de muestreo, se colectaron cuatro hojas de cada punto cardinal del dosel del árbol, a la altura del

colector, independientemente de la especie de cítrico. El muestreo fue dirigido a síntomas de la enfermedad. En caso de presencia de DC se colectaron entre 10-30 especímenes. La intensidad de la enfermedad en cada área de inspección se determinó con incidencia y severidad. La incidencia se calculó con la proporción de cítricos enfermos en relación con el total de cítricos. La severidad se evaluó un cubo hueco de 125,000 cm<sup>3</sup> (PVC 50x50x50) el cual se colocó en los cuatro puntos cardinales del dosel del árbol y se contó el número de brotes sintomáticos y asintomáticos.

Las muestras vegetales y de insectos se analizaron en el Laboratorio de Biología Molecular del INIFAP-CE Mococho, Yucatán. La extracción de ADN vegetal se realizó con método CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) (Anexo 2) y se almacenó a -20°C (Murray and Thompson, 1980). En insectos se llevó a cabo mediante el kit y protocolo DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA). La sanidad de las muestras se determinó mediante la técnica PCR en punto final con el protocolo de Li *et al.* (2006).

### **3.7. Análisis estadístico de gradientes de dispersión**

Los datos de incidencia de la enfermedad y distancia entre las áreas de inspección se analizaron mediante los modelos exponencial negativo y Gregory para determinar la existencia de gradientes de dispersión de la enfermedad. La severidad evaluada se graficó de forma radial representando el dosel de árbol, para determinar si la disposición de brotes enfermos presentaba cierta homogeneidad en el dosel del árbol, como criterio para el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad, estos datos también se analizaron mediante histogramas de frecuencia con el mismo objetivo. La incidencia de psílicos positivos se integró por gradiente transectual para determinar su relación en la dispersión de la enfermedad.

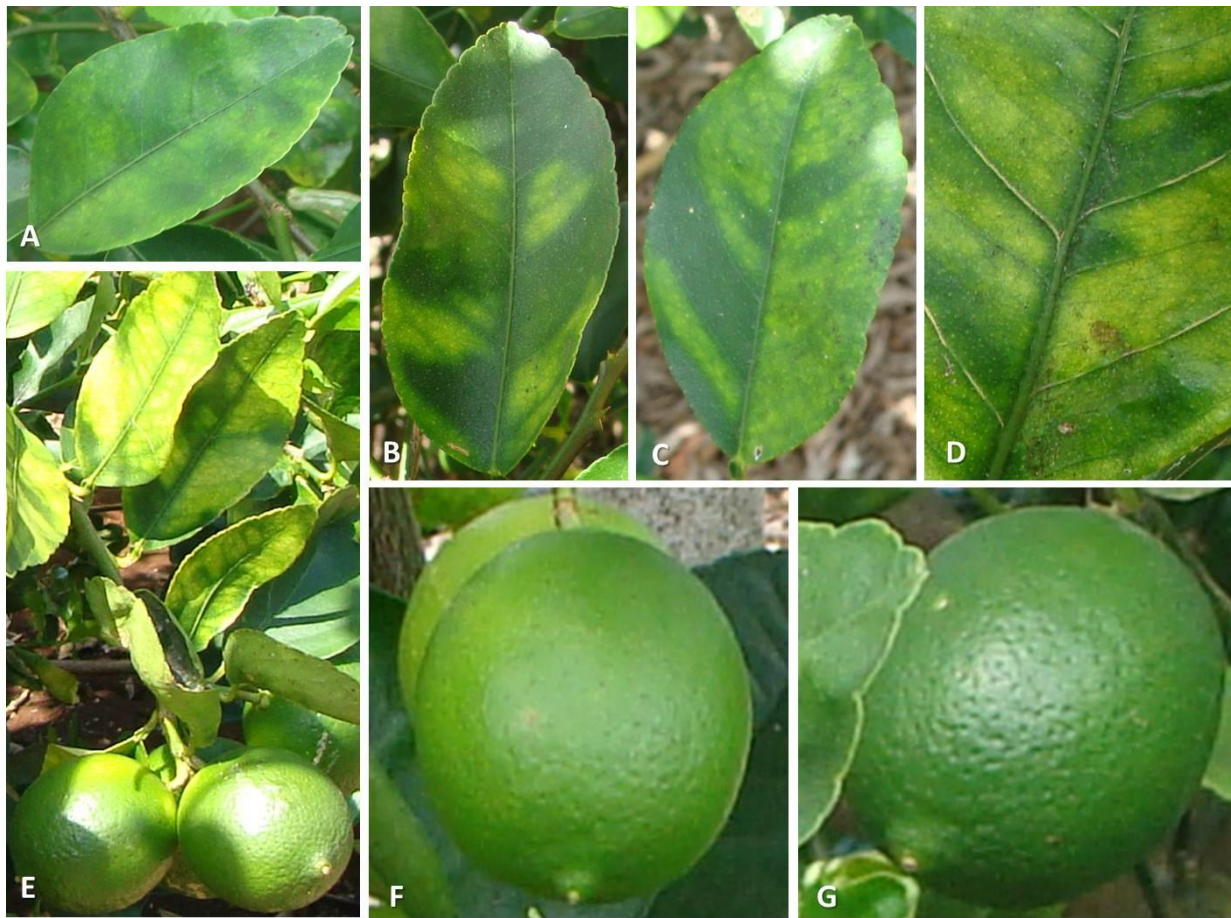
## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Descripción de los síntomas de HLB en limón persa

No se observó síntomas claros de HLB excepto por un amarillamiento y alargamiento en algunos frutos evaluados aún en severidades del 100 %. En limón mexicano donde sí se ha reportado el síntoma de maduración irregular en frutos y eventual caída (Robles *et al.*, 2010).

Los síntomas de HLB en limón persa en Yucatán se han detectado en hojas y sin un patrón de distribución en el dosel del árbol. Los síntomas (Figura 1) inician con moteados difusos (A) que van aumentando de tamaño hasta definirse claramente y formar manchas angulares internervales (B), que a su vez son distorsionadas por puntos cloróticos que invaden la lámina foliar (D). Con tiempos de infección prolongados se observa engrosamiento y acorchamiento de la nervadura central (E) dando un aspecto coriáceo; finalmente se aprecia un amarillamiento medianamente intenso y generalizado en la lámina foliar sin llegar a la abscisión como sucede en limón mexicano y cuyos síntomas ocurren con mayor velocidad (Robles *et al.*, 2010).

En naranja dulce, estos síntomas son menos marcados ya que el amarillamiento generalizado de la lámina foliar ocurre en poca frecuencia y no se ha observado defoliación de las mismas (Esquivel *et al.*, 2010). Estos autores también reportan esta tendencia en síntomas histológicos lo que sugiere que en México los cítricos agrios exhiben síntomas con mayor velocidad, intensidad y generalización en el dosel que los reportados en otros países (Bové, 2006; Brlansky *et al.*, 2008).



**Figura 1. Síntomas de HLB en limón persa (*C. latifolia*) confirmados como positivos por PCR cuantitativo. (A) Moteado difuso; (B) Manchas angulares; (C) Manchas angulares y puntos cloróticos; (D) Engrosamiento y acorchamiento de nervadura; (E) Amarillamiento generalizado de la lámina foliar; (F) Frutos con amarillamiento putativo a HLB; (G) Fruto de ramas sanas. Tizimin, Yucatán, 2011.**

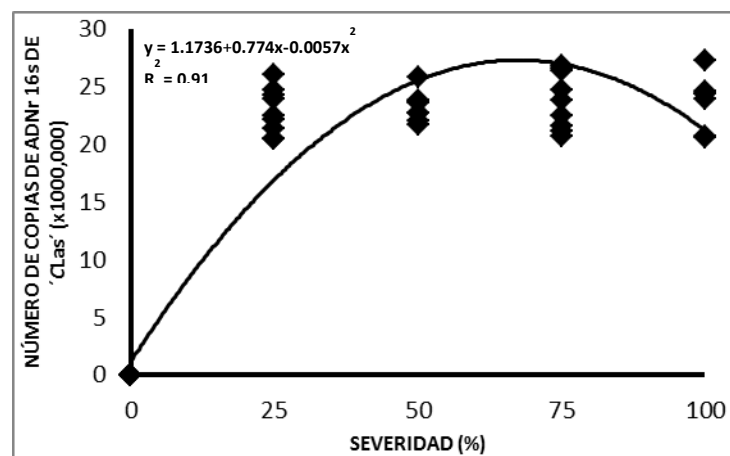
#### **4.2. Diagnóstico y cuantificación de la concentración de CLas mediante PCR en tiempo real**

PCR en tiempo real confirmó la condición de sanidad de los árboles seleccionados como sanos y enfermos. Estos últimos presentaron diferentes concentraciones estimadas de CLas con lo cual se



demostró que la intensidad de los síntomas observados eran inducidos por la actividad bacteriana y que el efecto evaluado en producción podría ser asociado directamente a esta bacteria. La asociación de la concentración de CLas y la severidad se demostró con el ajuste a un modelo de correlación cuadrático  $y = 1.1736 + 0.774x - 0.0057x^2$ ,  $R^2 = 0.91$  (Figura 2).

La relación de la concentración bacteriana con la severidad sugiere que la expresión de síntomas está directamente relacionada con la cantidad de inóculo de la bacteria.

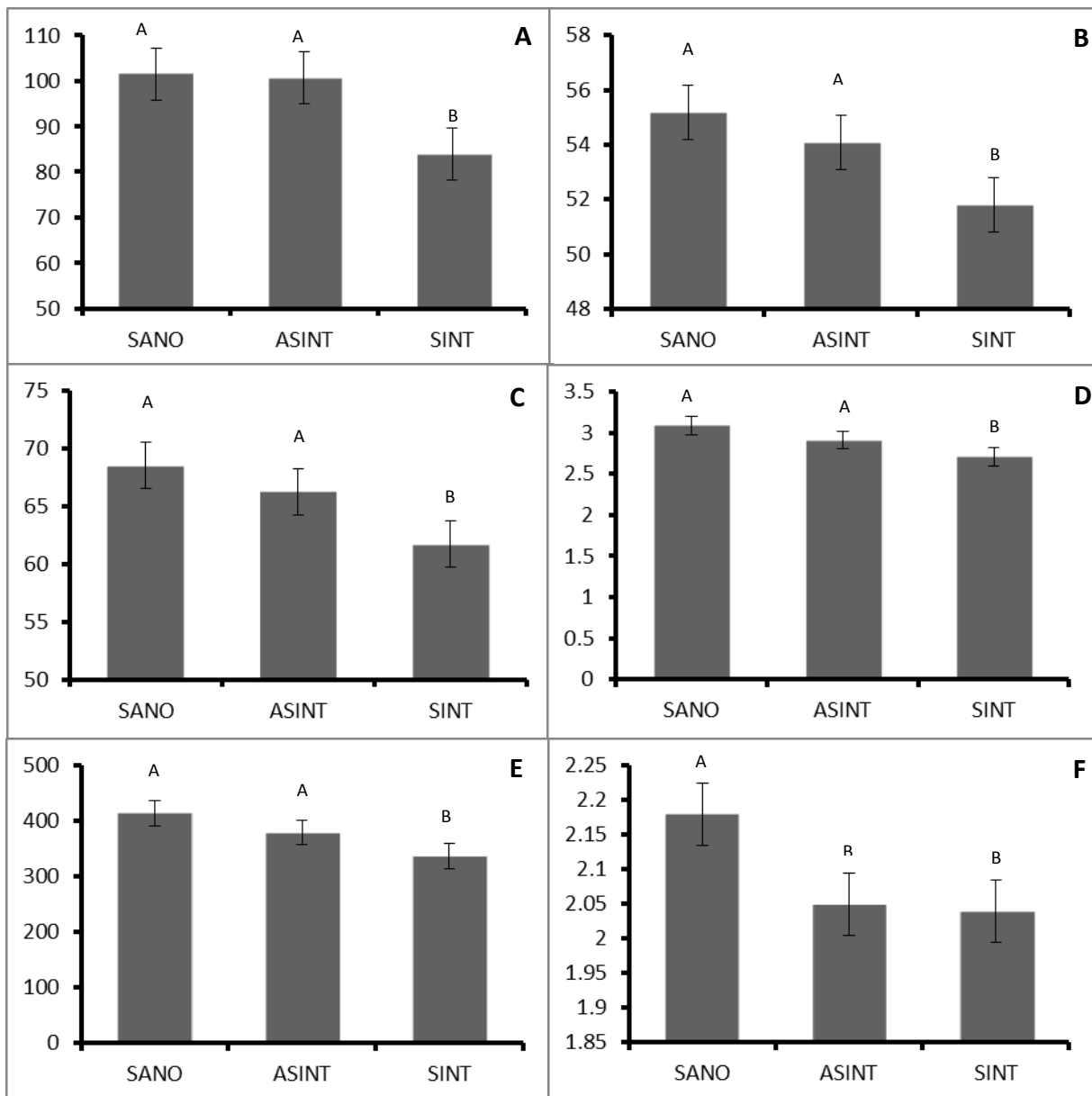


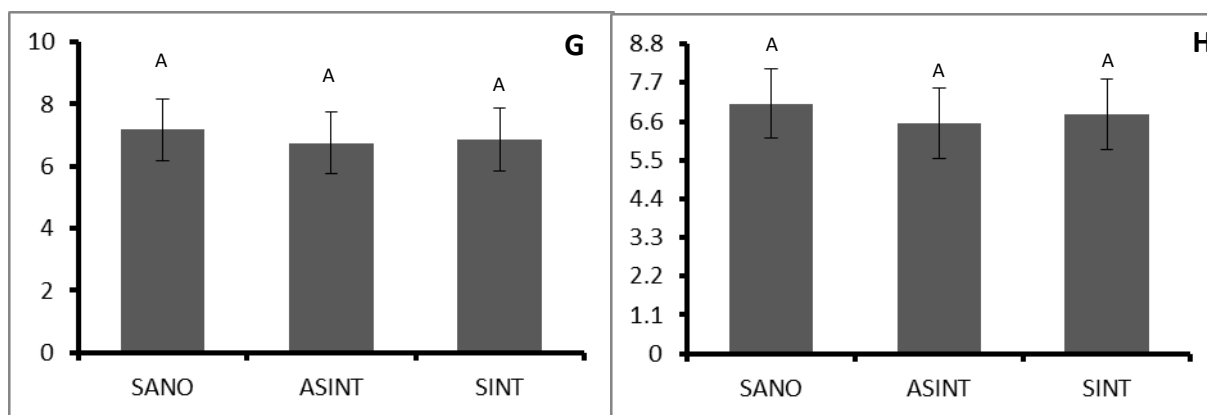
**Figura 2. Correlación de la severidad del HLB con la concentración de CLas (número de copias del gen ADNr 16s x 1000,000) estimada mediante la técnica PCR en tiempo real, en hojas de árboles sanos y enfermos con distinto grado de severidad de HLB. Limón persa (*C. latifolia*). La línea y el modelo representan el ajuste mediante una regresión cuadrática. Tizimin, Yucatán 2011.**

Esto confirma los resultados con PCR convencional en los cuales la detección solo se obtenía muestras con síntomas evidentes de enfermedad (Teixeira *et al.*, 2008). Adicionalmente, sustenta la dificultad de realizar la detección de infecciones latentes a concentraciones muy bajas mediante PCR cuantitativo (Li *et al.*, 2008). Estos autores sugieren el uso de esta técnica para estudios de interacción planta-patógeno.

### 4.3. Estimación de pérdidas con análisis de varianza

Las variables peso, diámetro ecuatorial y polar, grosor de cáscara, volumen de jugo y pH fueron estadísticamente mayores en árboles sanos (T1) con respecto a frutos de ramas sintomáticas (T2) (Tukey,  $p=0.05$ ) (Figura 3).





**Figura 3. Comparación de medias de peso (A), diámetro ecuatorial (B), diámetro polar (C), grosor de cáscara (D), volumen de jugo (E), pH (F), Brix (G) y acidez titulable (H) evaluadas en frutos de limón persa (*C. latifolia*) provenientes de árboles sanos y con HLB sintomáticos y asintomáticos. Para cada variable, barras con al menos una letra en común son estadísticamente iguales Tukey ( $p=0.05$ ). Las líneas en las barras representan el error típico. Tizimin, Yucatán, 2011.**

Estos resultados muestran que la concentración bacteriana, aún en un periodo de baja endemicidad (15 meses), influye en el efecto detrimental tanto en variables morfológicas como organolépticas. A este efecto influye el patrón productivo de los cítricos cuya producción se concentra en ramas con crecimiento secundario en la parte externa del dosel del árbol aún con crecimiento activo. Brix y acidez titulable no fueron estadísticamente distintos entre T1 y T2. Con excepción de los diámetros no se encontraron diferencias estadísticas entre T2 y T3, probablemente porque el efecto detrimental en un árbol enfermo no depende del alojamiento de CLas en el floema del tejido muestreado, ya que esta pudiera hacer el taponamiento en otra zona fuente de foto asimilados y que por consecuencia estos no lleguen a la ramas tanto sintomáticas

como asintomáticas. La reducción en T2 con respecto a T1 fue mayor en peso (17.31 %) y volumen de jugo (18.62 %). En el resto de las variables morfológicas la reducción fue de 12.2 % en grosor de cáscara, 6.16 % en diámetro ecuatorial y 9.95 % en diámetro polar. En el caso de las variables organolépticas solo en pH se detectó reducción 6.4 % (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Porcentaje de reducción de las variables morfológicas y organolépticas de frutos de ramas sintomáticas y asintomáticas de árboles enfermos con HLB y de frutos de árboles sanos de limón persa (*C. latifolia*). Tizimin, Yucatán 2011.**

FACTOR	PESO	DE	DP	GC	VJ	BRIX	PH	ACIDEZ
T1	101.511 a†	55.1879 a	68.5079 a	3.0874 a	413.79 a	7.17 a	2.18 a	7.11 a
T3	100.527 ab	54.0663 a	66.2363 a	2.9094 ab	380 ab	6.75 a	2.05 b	6.53 a
T2††	83.943 b	51.7888 b	61.694 b	2.7108 b	336.75 b	6.86 a	2.04 b	6.81 a
REDUCCIÓN†††	17.31	6.16	9.95	12.20	18.62	4.32	6.42	4.22

† Valores con al menos una letra en común en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey, p=0.05).

†† Factor T1 (sano), T2 (asintomático) y T3 (sintomático) fueron confirmados por PCR en tiempo real.

††† El porcentaje se calculó con la diferencia de medias entre frutos de árboles sanos y de ramas sintomáticas.

El detrimento detectado con mayor énfasis en las variables peso y volumen de jugo se explica posiblemente por la directa relación fisiológica entre estas variables, ya que a mayor volumen de jugo mayor es el peso de fruto (Davies y Albrigo. 1994). El efecto de CLas en T2 con respecto a T1 (Cuadro 1) sugiere pérdidas en la producción de hasta un 17.3 % por ciclo productivo, más de lo previamente estimado en ausencia de la enfermedad, en el estudio realizado por Salcedo *et al.* (2010), en donde calcularon un 17.6 % en cítricos agrios y 52.7 % en naranja dulce después de

cinco años del ingreso de CLas a México. Estos autores explican que el mayor impacto se tendría con naranja dulce (Halbert y Manjunath, 2004). Por otra parte no se tenía a nivel mundial escenarios epidémicos en cítricos agrios y se usó la información de epidemias en naranja dulce para fines comparativos.

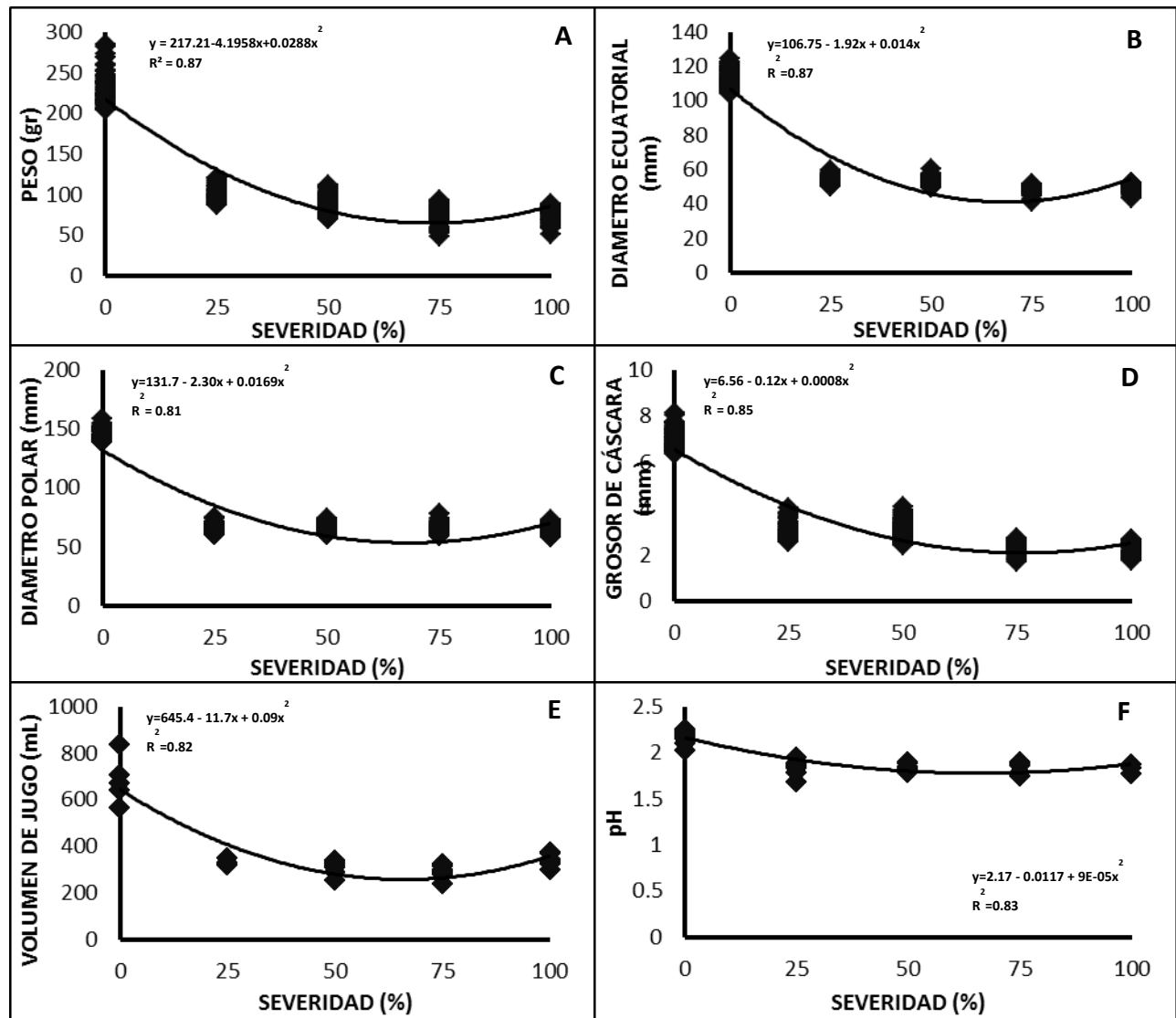
En Brasil, Bassanezi *et al.* (2009) detectaron pérdidas en peso entre de 17.5 % (Valencia temprana y 42.3 % (Valencia tardía) por efecto de '*Candidatus Liberibacter spp.*'. En esta región la enfermedad es endémica, lo que implica una prolongada exposición de los árboles a la infección bacteriana, ya que la detección se realizó en 2004. En este estudio, las pérdidas detectadas fueron similares a valencia temprana (17.3 vs 17.5 %) a pesar de que la plantación evaluada tuvo un periodo de 6-15 meses de exposición a la infección bacteriana. Por lo que las pérdidas en periodo de exposición similar a las de Brasil podrían ser mayores en limón persa, más aun considerando que la severidad de síntomas visuales e histológicos son más intensos que los reportados para naranja dulce (Esquivel *et al.*, 2010). Adicionalmente, la mayor frecuencia de brotación de los cítricos agrios podría permitir mayores periodos de infección e incremento de la bacteria, por efecto de la colonización del vector. En este trabajo severidades del 25% del dosel la estimación de la concentración bacteriana fue del 86% del máximo alcanzable (Figura 2). Aunque no existen estudios experimentales cuantitativos para la estimación de pérdidas en limón mexicano, estudios preliminares en Tecomán, Colima, región con la mayor intensidad epidémica del HLB en México, reportan pérdidas de aproximadamente 60.8 % en árboles de menos de un año de la expresión de síntomas. Lo cual pudiera estar en congruencia con la mayor intensidad de los síntomas de este cítrico (Robles *et al.*, 2010; Esquivel *et al.*, 2010).

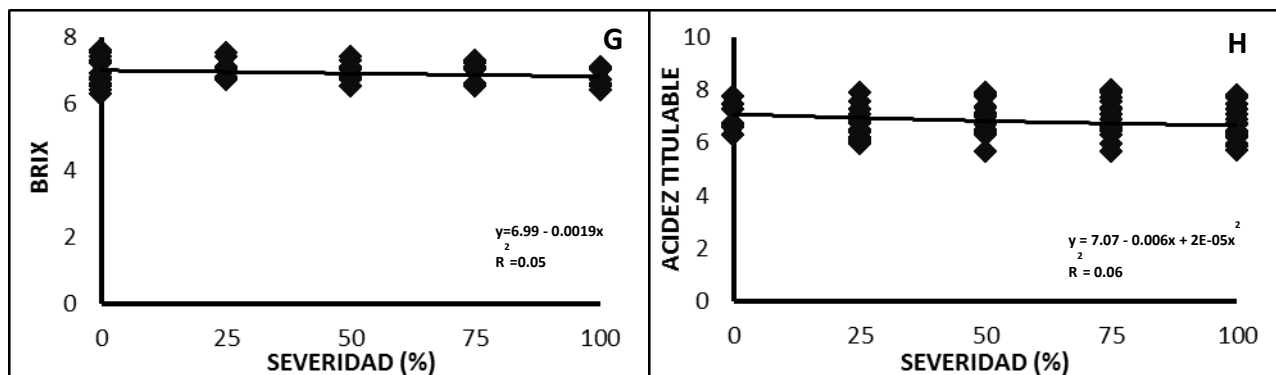
#### 4.4. Estimación de pérdidas con modelos correlativos

La asociación de la severidad con variables morfológicas y organolépticas se confirmó con el ajuste a modelos cuadráticos correlativos (Figura 4). A pesar de la selección apareada de árboles sanos y enfermos para evitar efectos de variabilidad en fertilidad y manejo fue necesario eliminar datos aberrantes los cuales se asociaron con árboles de bajo vigor (12/50). En un estudio similar Bassanezi *et al.* (2009) empleó de 14-21 árboles por periodo de cosecha y variedad. Las variables que mostraron mayor correlación con la severidad fueron las morfológicas ya que se ajustaron mejor al modelo cuadrático. Los modelos fueron los siguientes: peso= $217.21-4.1958x+0.0288x^2$ , ( $R^2=0.86$ ); diámetro ecuatorial= $106.75-1.92x+0.014x^2$ , ( $R^2=0.87$ ); diámetro polar= $131.7-2.30x+0.0169x^2$ , ( $R^2=0.87$ ); grosor de cáscara= $6.56-0.12x+0.0008x^2$ , ( $R^2=0.85$ ); volumen de jugo= $645.4-11.7x+0.09x^2$ , ( $R^2=0.82$ ). En las variables organolépticas solo pH se ajustó con  $pH=2.17-0.0117+9E-05x^2$ , ( $R^2=0.83$ ). Brix y acidez titulable no se asociaron significativamente con la severidad. No hubo un claro efecto de la bacteria sobre estas variables, posiblemente por su naturaleza fisiológica tan específica y requerirían una mayor concentración de la bacteria y periodo de infección para inducir una alteración detectable (Davies y Albrigo. 1994).

La variabilidad de los datos de producción en cuanto a vigor de árboles por efectos multifactoriales de manejo ya había sido reportada en un estudio similar realizado en Brasil, con cítricos dulces (*Citrus sinensis*) donde la dispersión de los datos en la correlación del peso de frutos con severidad fue alta y por lo tanto el coeficiente de determinación bajo ( $R^2=0.4$ ) (Bassanezi *et al.*, 2011).

Sin embargo, en estos estudios se combinaron cosechas de diferentes años (2004-2007) y por lo tanto distintos periodos de endemicidad (periodo de infección-colonización), lo cual pudo contribuir a la variabilidad encontrada.





**Figura 4. Correlación de severidad de HLB y variables morfológicas peso (A), diámetro ecuatorial (B), diámetro polar (C), grosor de cáscara (D) y volumen de jugo (E) y organolépticas pH (F), Brix (G) y acidez titulable (H), de frutos sanos y de ramas sintomáticas de árboles enfermos de limón persa (*C. latifolia*). La línea y el modelo representan el ajuste mediante una regresión cuadrática. Tizimin, Yucatán 2011.**

Las pérdidas estimadas en este estudio del 17.3 % pueden ser mayores ya que una infección sistémica induce un incremento del efecto detrimental con el periodo de endemicidad o infección crónica. Por otra parte, en un proceso epidémico el 100 % de incidencia eventualmente se alcanza después de varios ciclos de infección por lo que un modelo de pérdidas se debe integrar a un modelo temporal. Este principio fue aplicado en el estudio de Salcedo *et al.* (2010) donde las pérdidas se estimaron considerando el incremento gradual de la incidencia por el modelo de Weibull para un proceso epidémico de 3 y 5 años.



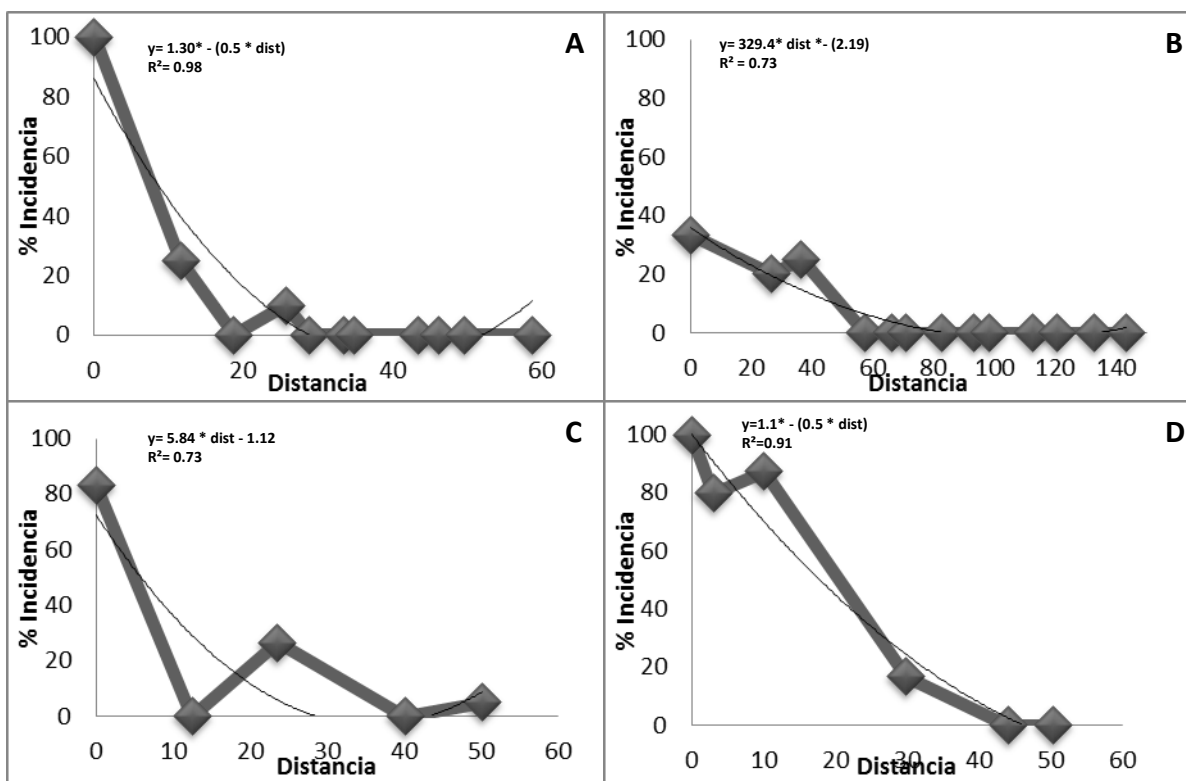
#### 4.5. Gradientes de dispersión del HLB

El HLB exhibió gradientes de dispersión con diferente intensidad a partir de los focos iniciales en México. En Yucatán, el gradiente N-S se prolongó espacialmente con 29 km, el gradiente E-O 80 km. En Q. Roo los gradientes se conformaron para N-S de 20-30 km y para E-O de 44 km. El modelo exponencial negativo ajustó a los gradientes Yucatán N-S ( $y = 1.30 * -(0.5 * \text{dist})$ ,  $R^2 = 0.98$ ) y Q. Roo E-O ( $y = 1.1 * -(0.5 * \text{dist})$ ,  $R^2 = 0.91$ ), mientras que el modelo de Gregory ajustó al gradiente Yucatán E-O ( $y = 329.4 * \text{dist} * -(2.19)$ ,  $R^2 = 0.73$ ) y Q Roo N-S ( $y = 5.84 * \text{dist} - (1.12)$ ,  $r^2 = 0.73$ ) (Figura 5). La direccionalidad E-O fue más inductiva para la dispersión de la enfermedad, posiblemente por el factor viento el cual juega un rol importante en la dispersión de *D. citri* (Figura 6). Estos resultados coinciden con los reportados en el estudio regional del Amarillamiento Letal del Cocotero donde encontraron mayor dispersión de la enfermedad en la dirección este-oeste de la Península de Yucatán, debido a la movilidad del vector inducido por los vientos predominantes (Góngora *et al.*, 2004). En este tipo de enfermedades donde el agente causal es transmitido mediante un vector, es común encontrar tasas de dispersión elevadas, las cuales espacialmente en un inicio tienen un confinamiento definido unidireccional y conforme avanza el tiempo pierden este arreglo y adquieren una distribución multidireccional.

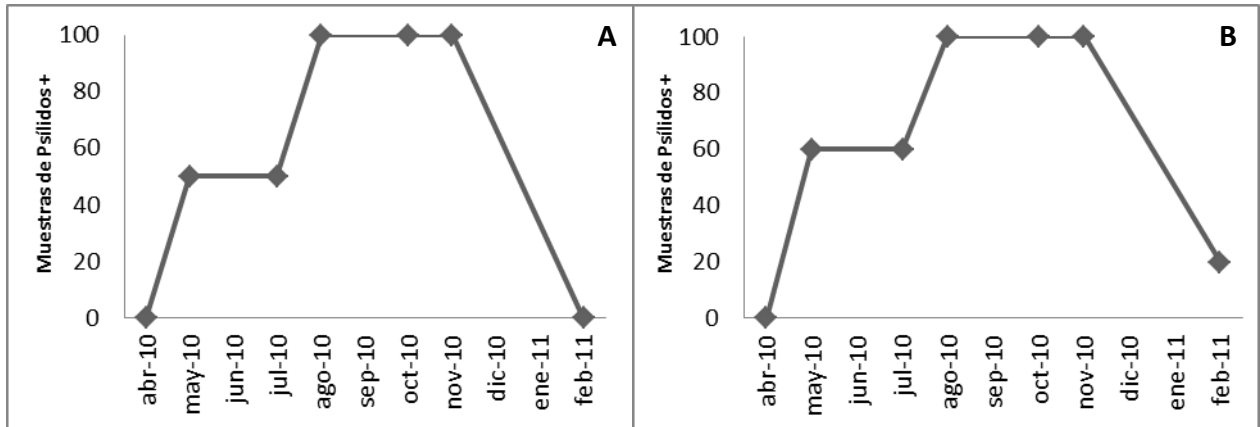
Sin embargo, el factor inóculo inicial es el que pudiera determinar la magnitud de la dispersión, ya que un foco de infección con elevado número de árboles enfermos induce mayor dispersión de la enfermedad que un foco de menor intensidad. Esto se observa claramente en los gradientes de dispersión de Yucatán con el efecto de erradicación implementado por el CESV, al mantenerse estable la incidencia durante todo el periodo de evaluación, mientras que en los gradientes de Q. Roo donde este principio de control no se aplicó con el mismo nivel de rigurosidad se observa un

incremento gradual de la incidencia y una alta actividad de vectores positivos corroborados por PCR.

Las gráficas radiales de severidad (Anexo 2.1) e histogramas de frecuencia indicaron que la disposición de brotes sintomáticos en el dosel de los cítricos evaluados fue heterogénea, lo cual es razonable considerando que el vector prefiere brotes tiernos y estos se encuentran en todo el dosel del árbol.



**Figura 5. Gradientes de dispersión del HLB en Yucatán N-S (A), E-O (B), Quintana Roo N-S (C) y E-O (D). La línea y la ecuación representan el ajuste de los modelos exponencial negativo y Gregory. Península de Yucatán, 2010-2011.**



**Figura 6. Número de muestras de psíidos positivos detectados en los gradientes transectuales de Yucatán (A) y Q. Roo (B) de mayo de 2010 a febrero de 2011.**

## V. CONCLUSIONES

A quince meses de la detección del HLB, enfermedad causada por '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', en un huerto de la región de Tizimin, Yucatán, México, se encontró un efecto detrimental en frutos de limón persa (*C. latifolia*) en variables de tamaño, grosor de cáscara, pH, volumen de jugo y peso. En estas últimas, se encontró la mayor reducción con 18.62 y 17.31 %, respectivamente, con relación a frutos de árboles sanos en un ciclo productivo. El detrimento estuvo en función del incremento de la severidad del HLB en el dosel del árbol ( $R^2=0.8$ - $R^2=0.87$ ), la cual a su vez estuvo asociada con la concentración bacteriana estimada por PCR cuantitativo. Este es el primer reporte del efecto de CLas en limón persa bajo la condición de reciente ingreso en el país, lo que obliga al establecimiento de medidas regulatorias y la participación activa del sector productivo.

La dispersión del HLB a nivel regional se detectó en dos direcciones mediante el análisis de gradientes transectuales, los cuales se ajustaron al modelo exponencial negativo para Yucatán N-S y Q. Roo E-O ( $R^2=0.98$  y  $R^2=0.73$ , respectivamente), mientras que Yucatán E-O y Q. Roo N-S fueron ajustados con el modelo de Gregory ( $R^2=0.73$  y  $R^2=0.91$ , respectivamente). Estos modelos prueban la existencia de gradientes y permite estimar incidencia a partir de un foco inicial en un área determinada, lo cual se puede aplicar para establecer áreas de manejo regional (*Wide Area Management*).

La detección de *Diaphorina citri* positivos por PCR en las áreas de inspección comprueba su implicación con la intensidad de dispersión y su variabilidad estacional en el número de insectos positivos siendo mayor en septiembre y octubre.

El ajuste de los modelos sugiere mayor dispersión hacia la direccionalidad E-O con distancias de 44 y 80 km para Q. Roo y Yucatán, respectivamente, posiblemente por la inducción de los vientos prevalecientes en la Península de Yucatán. Esta continuidad espacial de la enfermedad y la disposición de brotes enfermos generalizada en el dosel de los cítricos evaluados pudieran considerarse para la optimización de los muestreos y monitoreos dentro de un sistema epidemiológico regional.

## VI. LITERATURA CITADA

- Alemán, J., H. Baños, y J. Ravelo. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. *Protección vegetal* 22: 154-165.
- Arauz-Cavallini, L. F. 1998. *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 443 pp.
- Aubert, B., Garnier, M., Guillaumin, D., Herbagyandodo, B., Setiobudi, L. and Nurhadi, F. 1985. Greening, a serious threat for the citrus production of the Indonesian archipelago. Future prospects of integrated control. *Fruits* 40: 549-563.
- Aubert, B. 1992. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. Pages 817-820. *In: Proceedings of the 7th Congress of the International Society of Citriculture*. Acireale, Italy.
- 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.
- 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 13<sup>th</sup> Conference of International Organization of Citrus Virologist IOCV*, Riverside.
- Ayres, J. A. y Yamamoto, P. T. 2007. Survey of HLB (Greening) and control strategies in Brazil. FUNDECITRUS. Citrus Expo 2007-Florida.
- Bassanezi, R. B., Busato, L. A., Filho, A. B., Amorim, L. and Gottwald, T. R. 2005. Preliminary Spatial Pattern Analysis of Huanglongbing in Sao Paulo, Brazil. 341-355 pp. *In: 16 Conf. IOCV*. Riverside, California.

- 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.
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Godoy, G. M. C., Filho, A. B. and Amorin, L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in Sao Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130:577-586.
- Bellis, G., Hollis, D. and Jacobson, S. 2005. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), and huanglongbing disease do not exist in the Stapleton Station area of the Northern Territory of Australia. *Australian Journal of Entomology* 44: 68-70.
- Bové, J. M. & M. Garnier. 2000. Stubborn. *In: Compendium of Citrus Diseases*. 2nd ed. APS. S. Paul, Mn. USA. 48-50 pp.
- Bové, M. J. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
- Brlansky, R.H., Chung, K.R. and Rogers, M.E. 2007. Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/CG086>.
- 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.
- Broadbent, P., L. R. Fraser & J. McGechan. 1976. Australian citrus dieback. 141-146 pp. *In: Proceedings of the 7<sup>th</sup> Conference of International Organization of Citrus Virologist*". IOCV, Riverside.

- Campbell, C. L. and Madden, L. V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons. New York, USA. 532 pp.
- CAB International. 2000. Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK.
- Chen, Q. 1943. A report of a study on yellow shoot of citrus in Chaoshan. Quarterly Bulletin of New Agriculture 3: 142-175.
- 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. Phytopathology 99: 236-242.
- Cheng, K.-R & Brlansky, R. H. 2005. Citrus Diseases Exotic to Florida: Huanglongbing (Citrus Greening). University of Florida IFAS Extension. 210 pp.
- 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.
- 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.
- Cristobal A. J., Mora, A. G., Manzanilla, L. R. H., Marbán, M. N., Sánchez, G. P., Cid del Prado, V. I. y Evans, K. 2006. Epidemiology and integrated control of *Nacobbus aberrans* on tomato in Mexico. Nematology 8: 727-737.
- Da Graca, J. V. 1991. Citrus greening disease. Annu. Rev. Phytopathology 29: 109-136.
- Da Graca, J. V. and Korsten, L. 2004. Citrus Huanglongbing: Review, Present status and Future Strategies. Diseases of fruit and Vegetables 1: 229-245.



- Da Graca, J. V. 2008. Biology, History and World Status of Huanglongbing. 7 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.
- 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.
- Davies, F. S., y Albrigo, L. G. 2004. Citrus. Wallingford: CAB International. 254 p.
- Ding, F., Jin, S., Hong, n., Zhong, Y., Cao, Yi. and Wang, G. 2008. Vitrification–cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from in vitro adult shoot tips. *Plant Cell Reports* 27: 241-250.
- DGSV. 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.
- DGSV-CNRF. 2008. Protocolo de Diagnóstico de *Candidatus Liberibacter spp*. mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. DGSV. 17 p.
- Esquivel C, F., Valdovinos, P. L., Mora, A. G., Gómez, J. R., Velázquez, M. J. J. y López, A. J. I. 2010. Análisis histológico y epidemiológico del limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing). *In*: Memoria del 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, Nuevo León. pp: 99-103.

FAO. 2010. Consultado el 10 de Marzo de 2011.

<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.

Flores S, J. L., Mora, A. G., Loeza, K. E., Acevedo, S. G., Díaz, P. G., Ruiz, G. N., López, A. J. I., Rivas, V. P., Novelo, C. A., López, S. P. y Sánchez, R F. A. 2010. Análisis Estructural de Focos y Gradientes de Dispersión del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en la Península de Yucatán. *In: Memoria del 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, Nuevo León. pp: 104-118.*

Fung, Y. C. and Chen, N. C. 2006. Effects of temperature and host plant on population parameters of the citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). *Formosan Entomol* 26: 109-123.

Fundecitrus. 2009. Manual técnico de Greening. Folleto técnico. Brasil. 12 pp.

Garnier, M., S. 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.

Góngora-Canul, C., Escamilla- Bencomo, J. Pérez-Hernández, O. y Mora-Aguilera, G. 2004. Gradientes de diseminación del amarillamiento letal en cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Sisal Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22:370-376.

- González, C., Gómez, M., Fernández, M., D. Hernández, Tapia, J.L., Batista, L. 2007. *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae), behaviour and natural enemies in Cuban citriculture. Program and Abstracts of the XVII IOCV, Adana, Turkey: 180.
- Gottwald, T. R., Aubert, B. and Zhao, X. Z. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglongbin) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79:687-693
- 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.
- 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.
- Gottwald, T. R., Gonzales, G. I. and Mercado, B. G. 1990. Greening, Stubborn, and Other Diseases. 414-420 pp. *In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> Conference of International Organization of Citrus Virologist*. IOCV, Riverside.
- Halbert, S.E. and Manjunath K. L. 2004. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: A literature review and assessment of risk of Florida. *Florida Entomologist* 87(3): 330-353.
- Hall, D. G. 2008. Biology, History and World Status of *Diaphorina citri*. 11 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.

- Hocquellet A, Toorawa P, Bové JM, Garnier M, 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. *Molecular and Cellular Probes* 13: 373–379.
- Hung TH, Wu ML, Su HJ, 1999. Detection of fastidious bacteria causing citrus greening disease by non-radioactive DNA probes. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 65: 140–6.
- INISAV. 1999. La enfermedad del enverdecimiento de los cítricos y su vector (*Diaphorina citri* Kuwayana). *Boletín Técnico*. La Habana, Cuba. 5 (1).
- 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 Hunaglongbing de los Cítricos Candidatus Liberibacter spp) y el psílido asiático de los cítricos (Diaphorina citri)*. 7-9 de Mayo, 2008. Hermosillo, Sonora, México.
- Jagoueix, S., Bove, J.M. And Garnier, M. 1994. The Phloem-Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus Is a Member of the  $\alpha$  Subdivision of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 379-386.
- Jagoueix, S., Bové, J. M., and Garnier, M. 1996. PCR detection of the two ‘*Candidatus*’ liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular Cellular Probes* 10:43-50.
- Jepson, S. B. 2008. Citrus Greening Disease (Huanglongbing). OSU Plant Clinic, Oregon State University, Corvallis OR. USA. 97: 331-2903.
- Khairulmazmi, A., Kamaruzaman, S., Habibuddin, H., Jugah, K. and Syed R.O. 2008. Occurrence and spread of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of

- Huanglongbing disease of citrus in Malaysia. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4(1): 103-111.
- Lee, H. A. 1921. The relation of stocks to mottled leaf of citrus leaves. *Philippines Journal of Science* 18: 85-95.
- 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.
- Li, W., Hartung, J. S. and Levy, L. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of '*Candidatus Liberibacter* species' associated with citrus Huanglongbing. *Plant Disease* 91: 51-58.
- Li, W., D. Li, E. Twieg, J. S. Hartung, and L. Levy. 2008. Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR. *Plant Disease* 92: 854-861.
- Lopes, S. A., Frare, G. F., Yamamoto, P. T., Ayres, A. J. and Barbosa, J. C. 2007a. Ineffectiveness of pruning to control citrus huanglongbing caused by *Candidatus Liberibacter americanus*. *European Journal of Plant Pathology* 119: 463-468.
- Lopes, S. A., Frare, G. F., Wulf, N. A. and Fernandes, N. G. 2007b. 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.
- Lopes, A. S., Frare, F. G., Bertolini E., Cambra, M., Fernandes, G. N., Ayres, J. A., Marin, R. D. and Bové, M. J. 2009a. *Liberibacters* associated with citrus huanglongbing in Brazil:

*Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. Plant Disease 93: 257-267.

Lopes S. A., Bertolini, E., Frare, G. F., Martins, E. C., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., Fernandes, N. G. and Cambra. M. 2009b. Graft transmission efficiencies and multiplication of *Candidatus Liberibacter americanus* and *Ca. Liberibacter asiaticus* in citrus plants. Phytopathology. 99: 301-306.

López, A. I., Peña, M. A., Rocha Peña, M. A. y Loera, J. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), 68 pp. In: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Méx.

López-Arroyo, J. I., Jasso, J., Reyes, M. A., Loera, G. J. J., Cortez, M. E., Miranda, M. A. 2008. Perspectives for biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Mexico. In: Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing. Abstract 11.8. USDA, University of Florida. Orlando, Florida.

Manjunath, K.L., S.L. Halbert, C. Ramadugo, S. Webb and R.F. Lee. 2008. Detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida. Phytopathology 98:387-396.

Manicom, B. Q. and Van Vauuren, S. P. 1990. Symptoms of greening disease with special emphasis on African greening. 127-131 pp. In: proceedings of the 4<sup>th</sup> International Asia-Pacific Conference on Citrus Rehabilitation. FAO-UNDP, Chiang-Mai, Thailand.

Martínez, Y., Llauger, R., Batista, L., Luis, M., Iglesia, A., Collazo, C., Peña, I., Casín, J. C., Cueto, J. y Tablada, M. 2009. First report of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with Huanglongbing in Cuba. Plant Pathology 58: 389.

- Mead, F.W., 1977. The Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homptera: Psyllidae). Entomology Circular No. 180. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, USA. 4 pp.
- Meyer, J. M., Hoy, M. A. and Boucias, D. G. 2008. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 96-102.
- 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.
- Mora-Aguilera, G., Nieto-Angel, D., Campbell, C. L., Téliz, D. y García, E. 1996. Multivariate comparasions of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86: 70-78.
- Mora-Aguilera, G. y Escamilla-Bencomo, J. A., 2001. Potencial de dispersión del Amarillamiento Letal del Cocotero. Una enfermedad de importancia cuarentenaria en México. Ingenieros Agrónomos Parasitólogos (IAP). XXVII Simposio Nacional de Parasitología Agrícola. 26-28 sep. Uruapan, Michoacán, México. 221-226pp.
- Murray R. G. E., Schleifer K. H. 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *International Journal of Systemic Bacteriology* 44: 174-176.
- Murray, R. G. E. & Stackebrandt, E. 1995. Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. *International Journal System Bacteriology* 45:186-187.

- Otake, A. 1990. Bibliography of citrus greening disease and its vectors attached with indices, and a critical review on the ecology of the vectors and theirs control. Japanese International Cooperation Agency 16 p.
- Pels-Stelinsky, K. S., Brlansky, R. H., Ebert, T. A. and Rogers, M. E. 2010. Transmission Parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Arthropods in Relation to Plant Disease* 103 (5): 1531-1541.
- Qureshi, J. A., Rogers, M. E., Hall, D. G. and Stansly, P. A. 2009. Incidence of invasive *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and its introduced parasitoid *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Florida citrus. *Journal of Economic Entomology* 102: 247–256.
- 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.
- Raychaudhuri, S. P., Nariani, T. K., Ghosh, S. K., Viswanath, S. M. and Kumar, D. 1974. Recent studies on citrus greening in India. 53-57 pp. *In: Proceedings of the 6<sup>th</sup> Conference of International Organization of Citrus Virologist University of Florida Press, Gainesville.*
- Robles, G. P. 2008. Manual técnico para la detección y manejo del huanglongbing de los cítricos. Dirección General de Sanidad Vegetal. Senasica SAGARPA. 39 p.
- Robles G. P., Sánchez, A. H. y Delgadillo, V. I. 2009. Programa Nacional Para la Detección del Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) En México. Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA.



- Robles G, M. M., Velázquez, M. J. J., Manzanilla, R. M. A., Orozco, S. M., Flores, V. R. y Medina, U. V. M. 2010. Síntomas del Huanglongbing en Limón Mexicano. Primeras observaciones. En: Memoria del 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, Nuevo León. pp:141- 149.
- 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.
- Salcedo B, D., Hinojosa, R., Mora, A. G., Covarrubias, G. I., DePaolis, F., Cíntora, G. C., y Mora, F. S. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Documento interno. Departamento de Estadística. 2010. <http://www.siap.com.mx>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2009 y 2010. <http://www.senasica.gob.mx>
- Srinivasan, R., Hoy, M. A., Singh, R. and Rogers, M. E. 2008. Laboratory and field evaluations of Silwet L-77 and kinetic alone and in combination with Imidacloprid and Abamectin for the management of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera:psyllidae). The Florida Entomologist 91: 87-100.

- Tatineni, S., Sagaram, U. S., Gowda, S., Robertson, C. J., Dawson, W. O., Iwanami, T. and Wang, N. 2008. In Planta Distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. *Phytopathology* 98: 592-599.
- Teixeira, D. C., Danet, J. L., Eveillard, S., Martins, E. C., Jesus, W. C., Jr., Yamamoto, P. T., Lopes, S. A., Bassanezi, R. B., Ayres, A. J., Saillard, C., and Bové, J. M. 2005a. Citrus huanglongbing in São Paulo, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease. *Mol. Cell. Probes* 19:173-179.
- Teixeira, C. D., Saillard C., Eveillard S., Danet, L. J., da Costa, P., Ayres, J.A. and Bové, J. 2005b. *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1857–1862.
- Teixeira, D. C., C. Saillard, , C. Couture, E. C. Martins, N. A. Wulff, S. Jagoueix-Eveillard, P. T. Yamamoto, A. J. Ayres, J. M. Bové. 2008b. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:139-150.
- Tian, Y., Ke, S. and Ke, C. 1996. Polymerase Chain Reaction for Detection and Quantitation of *Liberobacter asiaticum*, the Bacterium Associated with Huanglongbing (Greening) of Citrus in China. 252-257 pp. *In: Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, Riverside.
- 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.

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.

Zaka, S. M., Zeng, X., Holford, P. and Charles, G. A. 2009. Repellent effect of guava leaf volatiles on settlement of adults of citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama, on citrus. *Insect Science* 1-7.

Zhao, X. Y. 1981. Citrus yellow shoot disease (Huanglongbing) - a review. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 1:466-469.

# **VII. ANEXOS**

## ANEXO 1

### Anexo 1 1.1 Distribución mundial del HLB

Lugar	Especie	Detección	Cita
China	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Finales del siglo XIX.	Zhao, 1981.
Taiwan	<i>Ca. L. asiaticus</i>	1920	Otake, 1990.
Filipinas	<i>Ca. L. asiaticus</i>	1920	Lee, 1921.
Sudafrica	<i>Ca. L. africanus</i>	Finales de 1920	Van der Merwe y Andersen, 1937.
Indonesia	<i>Ca. L. asiaticus</i>	1940	Aubert <i>et al.</i> , 1985.
India	<i>Ca. L. asiaticus</i>	1974	Raychaudhuri <i>et al.</i> , 1974.
Brasil	<i>Ca. L. americanus</i>	2004	Colleta-Filho <i>et al.</i> ,
Brasil	<i>Ca. L. asiaticus</i>	2004	2004; Teixeira <i>et al.</i> , 2005.
Florida	<i>Ca. L. asiaticus</i>	2005	Cheng y Brlansky, 2005.
Cuba	<i>Ca. L. asiaticus</i>	2006	Martínez <i>et al.</i> , 2009 y Da Graca, 2008.
Lousiana	<i>Ca. L. asiaticus</i>	2008	Jepson, 2008.
Belize	<i>Ca. L. asiaticus</i>	2008	SENASICA, 2009
R. Dominicana	<i>Ca. L. asiaticus</i>	2008	SENASICA, 2009
México	<i>Ca. L. asiaticus</i>	2009	SENASICA, 2009

## Anexo 1 1.2 Distribución del HLB en México

<b>Municipio/Estado</b>	<b>Especie detectada</b>	<b>Fecha de detección</b>	<b>Planta/Vector (P/V)</b>	<b>Literatura Citada</b>
Tizimin/Yucatan	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Julio, 2009	P/V	SENASICA, 2009
Rio Lagartos/Yucatan	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Agosto, 2009	V	SENASICA, 2009
Chemax/Yucatan	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Agosto, 2009	P/V	SENASICA, 2009
Lázaro Cardenas/Qroo	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Octubre, 2009	P	SENASICA, 2009
Benito Juarez/ Qroo	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Octubre, 2009	P	SENASICA, 2009
Solidaridad/Qroo	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Diciembre	P	SENASICA, 2010
Othón P. Blanco/Qroo	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Diciembre, 2009	V	SENASICA, 2009
B. Banderas/Nayarit	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Noviembre, 2009	P/V	SENASICA, 2009
San Blas/Nayarit	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Noviembre, 2009	P	SENASICA, 2009
Pto. Vallarta/Jalisco	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Noviembre, 2009	V	SENASICA, 2009
Sn. Sebastian/Jalisco	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Febrero, 2010	P	SENASICA, 2010
Tomatlán/Jalisco	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Febrero, 2010	P/V	SENASICA, 2010
Calakmul, Campeche	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Marzo, 2010	V	SENASICA, 2010
Tecomán/Colima	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Abril, 2010	P/V	SENASICA, 2010
Armeria/Colima	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Agosto, 2010	P/V	SENASICA, 2010
Manzanillo/Colima	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Agosto, 2010	V	SENASICA, 2010
Escuinapa/Sinaloa	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Junio/ 2010	V	SENASICA, 2010
Mazatlan/Sinaloa	<i>Ca. L. asiaticus</i>	Junio/ 2010	V	SENASICA, 2010

### Anexo 1 1.3 Rango de hospedantes de *Candidatus Liberibacter* sp.

Nombre científico	Nombre común
<i>Berbera (Murraya) koenigii</i> (L.)	Limonaria
<i>Calodendrum capensis</i> Thunb.	*
<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	*
<i>Citrus amblycarpa</i> Ochse	Mandarino Amblycarpa
<i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	Limón Mexicano
<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja Agrio
<i>Citrus depressa</i> Hayata	*
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	Pomelo
<i>Citrus jambhiri</i> Lushington	Limón Rugoso
<i>Citrus junos</i> Sieb. ex Tanaka	Yuzu
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Limón Persa
<i>Citrus limettioides</i>	Lima Dulce
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Limón
<i>Citrus medica</i>	Cidro
<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Mandarina
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	Naranja Dulce
<i>Citrus sunki</i> Hort. ex Tanaka	Mandarino Sunki
<i>Citrus volkameriana</i>	Limón Volkameriana
<i>Citrus unshiu</i> (Mack.) Marc	Mandarino Satsuma
<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.	Toronjo
<i>Cuscuta australis</i> R. Br.	Cuscuta
<i>Fortunella</i> spp.	Kumquat
<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack	Limonaria

\* No se conoce el nombre común de esa especie de Rutaceae.

**Anexo 1 1.4. Distribución mundial de vectores de *Candidatus Liberibacter* sp.**

Especie/Psílido	Distribución Mundial	Cita
<i>D. citri</i>	China	Mead, 1977; Halbert y Majunath, 2004
	Filipinas	
	Indonesia	
	Tailandia	
	Pakistán	
	Hong Kong	
	Afganistán	
	Arabia Saudita	
	Reunión	
	India	
	Brasil	
	Islas Guadalupe	
	Bahamas	
	Islas Caimán	
	EUA	
	República Dominicana	
	Cuba	
	Puerto Rico	
	México	
	Venezuela	
	Argentina	
	Costa Rica	
Belice		
Honduras		
<i>T. erythrae</i>	Continente Africano.	Garnier <i>et al.</i> , 2000; Bove, 2006; Da Graca, 2008.



## ANEXO 2

### Anexo 2. 1. Protocolo de extracción de ADN por método CTAB (modificado al 75 % para tubos de 1.5 mL)

1.- Pesar 0.1 g de tejido vegetal en un tubo de 2 mL. Colocar la muestra en mortero y adicionar 300 µL de CTAB y una pizca de PVPP (polivinilpirrolidona).

\*la pizca de PVPP evita la liberación de fenoles.

2.- Añadir 680 µL de buffer CTAB precalentado a 65°C con β-MERCAPTOETANOL (10 µM). Mezclar vigorosamente en vortex e incubar los tubos a 65°C durante 45 minutos.

\*se prepara una mezcla usando 20 µL de β-MERCAPTOETANOL por cada 10 mL de buffer CTAB.

3.- Adicionar 525 µL de CLOROFORMO: ALCOHOL-ISOAMILICO 24:1 y mezclar vigorosamente en vortex.

4.- Centrifugar a 13,000 RPM durante 20 minutos a 4°C.

5.- Colectar fase acuosa (aprox. 525 µL) en tubos de 1.5 mL y adicionar 450 µL de CLOROFORMO, mezclar vigorosamente en vortex y centrifugar a 13,000 RPM durante 10 min a 4°C.

6.- Colectar fase acuosa (aprox. 450 µL) en tubos de 1.5 ml y adicionar  $\frac{1}{10}$  de ACETATO DE SODIO (3M) (aprox. 45µL) agitar suavemente, a continuación agregar 600 µL de ISOPROPANOL y mezclar por inversión 3 veces.

\*el ISOPROPANOL no necesita estar en frio.

7.- Incubar a -20°C de 30 a 40 minutos para continuar o a 4°C durante toda la noche.

---

8.- Centrifugar a 13,000 RPM durante 20 minutos a 4°C, decantar el sobrenadante y lavar la pastilla 2 veces con ETANOL al 70% usando 500 µL frio y centrifugarlo las 2 veces a 13,000 RPM por 2 minutos a 4°C.

\*despegar la pastilla del tubo agitándolo para un mejor lavado con el ETANOL al 70% frio para quitar sales, repetirlo en los 2 lavados.

9.- Secar la pastilla a temperatura ambiente y resuspender en 50 o 100 µL de buffer TE (10:0.1 mM) (dependiendo del tamaño de la pastilla para efectos de disolución).

10.- Adicionar RNasa (10 mg/ml) incubar a 37°C por 30 minutos o hasta 6 horas para resuspender.

\*hacer una mezcla usando: 49 µL del buffer TE y 1 µL de RNasa= 50µL. Esto multiplicado al total de muestras procesadas.

## ANEXO 3



### Anexo 3 1.1 Gradientes transectuales Yucatán N-S y E-O Quintana Roo N-S y E-O definidos para evaluación de dispersión del HLB.

### Anexo 3 1.2 Distancias entre Gradientes transectuales de dispersión

ESTADO	GRADIENTE	DIRECCIÓN	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	DIST	INCIDENCIA
Yucatán	1	N-S	Cuyo	21.514880°	87.679310°	0	100
			Moct	21.411300°	87.710270°	11.68	25
			Samaria	21.357140°	87.747390°	18.82	0
			SntaRosa	21.297540°	87.767840°	25.73	10
			Samaria	21.261310°	87.748350°	28.94	0
			ColYuc	21.214850°	87.726910°	33.55	0
			Sierra	21.200890°	87.720100°	34.94	0
			Sn. Manuel	21.122010°	87.675290°	43.45	0
			Isidro	21.096420°	87.762230°	46.17	0
			Monte	21.065810°	87.677510°	49.67	0
	Popolna	20.994270°	87.567090°	58.74	0		
	2	E-O	Xcan	20.860010°	87.659810°	0	33.3
			Catzin	20.713980°	87.866220°	26.74	20
			Chemax	20.655350°	87.934710°	36.47	25
			Vallad	20.691610°	88.215790°	57.53	0
			Ebtun	20.666040°	88.260620°	66.07	0
Cuncu			20.642440°	88.299090°	70.72	0	
Kaua			20.621680°	88.412380°	82.61	0	
Xcala	20.651860°	88.528260°	93.22	0			

			Piste	20.696820°	88.586360°	98.04	0
			Yodzo	20.710450°	88.731790°	112.71	0
			LUnión	20.707290°	88.809140°	120.72	0
			Holca	20.756950°	88.932080°	132.79	0
			Kantunil	20.796360°	89.034770°	143.13	0
			Chiquila	21.425620°	87.336460°	0	83.3
			Solfe	21.354300°	87.428170°	12.5	0
	3	N-S	SAngel	21.235400°	87.435790°	23.61	26.6
			Kant	21.092620°	87.486370°	40.16	0
			SPedro	20.983310°	87.492070°	50.21	5
			Canp1	21.104800°	86.934410°	0	100
			Canp2	21.095570°	86.978710°	3	80
			Canp3	21.050090°	86.905560°	10	87.5
	4	E-O	L.Vicario	20.990190°	87.194900°	29.87	16.6
			VNuevo	20.945300°	87.322260°	43.97	0
			Espe	20.971720°	87.396770°	50.21	0