

T
632.96
COR



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Monitoreo de Síntomas, Diagnóstico Molecular y Determinación
de la Presencia del Vector del Huanglongbing de los Cítricos en la
Costa del Ecuador”

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO AGRÍCOLA Y BIOLÓGICO

Presentada por:

Juan Francisco Cornejo Franco

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2014

AGRADECIMIENTO

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y a todas las personas que de una u otra forma colaboraron con la realización de este trabajo, de manera especial al Dr. Eduardo Chica Martínez y a la Blg. María Fernanda Ratti por su valiosa colaboración.

DEDICATORIA

AL PADRE CELESTIAL, A
TODA MI FAMILIA,
COMPAÑEROS Y
A MI PAÍS.

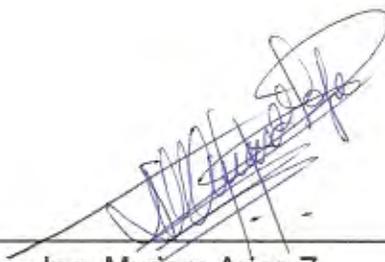
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Dr. Kleber Barcia V., Ph. D.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE



Eduardo Chica M., Ph.D.
DIRECTOR DE TESIS



Ing. Myriam Arias Z.
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)


Juan Francisco Cornejo Franco

RESUMEN

En nuestro país, el desarrollo del cultivo de cítricos, se ha incrementado sustancialmente en los últimos años, siendo considerado como un cultivo de vital importancia para algunos sectores del Litoral Ecuatoriano. Un ejemplo de esto es Caluma cuyo distintivo oficial es la naranja, siendo esta, el emblema oficial de la ciudad y motivo de grandes emprendimientos. Las Naves, Quinsaloma son otras ciudades donde destaca la producción de cítricos, así como también, aunque en menor cantidad, encontramos en la provincia de Manabí - Portoviejo plantaciones de este género.

En los últimos años el interés se ha centrado en una enfermedad conocida con el nombre de Huanglongbing, altamente destructiva y causada por una bacteria fastidiosa vascular del género *Candidatus Liberibacter*. Esta es transmitida por el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*.

Conociendo la gravedad de la enfermedad y la presencia en países vecinos de la misma y su vector, este estudio se encargó de evaluar la hipótesis de que tanto la enfermedad del HLB como su vector no están presentes en la costa del Ecuador; esto se realizó mediante diagnósticos visuales, muestreos

y el uso de técnicas moleculares en sectores citrícolas y urbanos del Litoral Ecuatoriano.

Para este estudio se tomaron en cuenta 26 sitios de muestreo distribuidos en zonas tropicales y subtropicales de 6 provincias del Ecuador: Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, Bolívar, Guayas y Santa Elena. Los sitios fueron escogidos en su mayor parte por guías de la zona. En cada plantación se evaluaron al menos 30 árboles ubicados principalmente en las 5 primeras filas de la plantación, colindantes con carreteras o bordes. En cada sitio se realizó un diagnóstico visual y se colectaron muestras de hojas con síntomas sospechosos de HLB y en las ocasiones en que no se detectaron síntomas sospechosos se tomaron muestras al azar para su posterior diagnóstico molecular. También se realizó una prospección del psílido en los sitios visitados.

Los resultados esperados de este trabajo fueron la determinación de la presencia o ausencia de la enfermedad y su insecto vector, y en caso de haberse detectado la presencia de cualquiera de los dos se esperó obtener una descripción de la distribución de estos en la costa.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
1. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD	3
1.1 Características generales	3
1.2 Agente causal	4
1.3 Epidemiología	5
1.4 Desarrollo de la enfermedad	6
1.5 Interacción planta – patógeno	8
1.6 Daños e importancia económica	10
1.7 Distribución mundial	12
1.8 Control	14
CAPÍTULO 2	16
2. VECTOR DE LA ENFERMEDAD	16
2.1 Nombre y Taxonomía	16
2.2 Biología y características morfológicas	17
2.3 Distribución geográfica mundial	20
2.4 Plantas hospederas	20
2.5 Daños e importancia económica	21
2.6 Interacción bacteria – vector	21
2.7 Control	23
CAPÍTULO 3	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Ubicación del Ensayo	27
3.2 Materiales	31
3.3 Metodología	32
3.4 Diseño del muestreo	34
CAPÍTULO 4	36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36

CAPÍTULO 5.....	44
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
ANEXOS	
BIBLIOGRAFÍA	

ABREVIATURAS

β-ME	beta mercapto etanol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
HLB	Huanglongbing
Mg	miligramo
Min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
ng	nanogramo
M	molar
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Rpm	revoluciones por minuto

SIMBOLOGÍA

%	porcentaje
°C	grados centígrados
HCl	cloruro de hidrógeno
KCl	cloruro de potasio
NaCl	cloruro de sodio
μl	microlitro
μg	microgramo

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Diferencias de hojas con HLB y deficiencias de Zinc y Magnesio.....	6
FIGURA 1.2	Ramas afectadas por HLB mostrando amarillamiento y defoliación.....	7
FIGURA 1.3	Frutos afectados por HLB.....	8
FIGURA 2.1	Adultos de <i>Diaphorina citri</i> en hojas de <i>Murraya</i>	17
FIGURA 2.2	Ninfa de <i>Diaphorina citri</i> , excretando túbulos cerosos.....	19
FIGURA 4.1	Hojas de cítricos mostrando una inusual clorosis	37
FIGURA 4.2	Distribución de <i>Diaphorina citri</i> en la ciudad de Guayaquil	38
FIGURA 4.3	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR dúplex	39
FIGURA 4.4	Ubicación de los sitios de muestreo y diagnóstico final de La presencia/ausencia de HLB en muestras de cítricos.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Sitios de muestreo, distribuidos en 5 provincias del Litoral Ecuatoriano.....	28
---------	---	----

INTRODUCCIÓN

La producción citrícola representa aproximadamente el 22% de la producción mundial de frutas, siendo los países del hemisferio norte los principales productores y consumidores (45). Dentro de los mayores productores se destacan: Angola, Arabia Saudita, Australia, Brasil, Cuba, China, EE.UU., España, India, Irán, Japón, México, Nigeria, Perú, Sierra Leona, Sudáfrica y Tanzania (16).

Desde el 2004 los citricultores de América enfrentan una gran amenaza que podría reducir drásticamente la producción de cítricos a nivel mundial, debido a la diseminación de Huanglongbing (HLB), una enfermedad altamente destructiva tanto por la severidad de sus síntomas como por la rapidez con la que se dispersa, afectando a todas las especies comerciales de cítricos (10). El HLB es causado por una bacteria fastidiosa vascular, limitada al floema de las plantas, del género *Candidatus Liberibacter* y transmitida por el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) (11).

Los métodos más efectivos para combatir la enfermedad son los preventivos, ya que en la actualidad no se registra reporte de alguna cura definitiva. La eliminación del vector, erradicación de árboles enfermos, la adquisición de plántulas en viveros certificados y las cuarentenas en zonas de ingreso, son los más utilizados (14).

El presente estudio tuvo la finalidad de demostrar la presencia o no de la bacteria causante del HLB, mediante el uso de técnicas moleculares, realizadas en hojas que fueron recolectadas en sectores citrícolas de la Costa del Ecuador así como determinar la presencia o no del vector de la enfermedad, *Diaphorina citri*, en la misma zona.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES DE LA ENFERMEDAD

1.1 Características generales

Huanglongbing (HLB) que en chino significa "Enfermedad del dragón amarillo" o "Enfermedad de los brotes amarillos", fue reportado por primera vez en China, en 1919 y está presente en diferentes países de África, Asia, América y Oceanía (4). Es la enfermedad más destructiva de los cítricos, por lo que es considerada como una grave amenaza para la industria citrícola a nivel mundial. También es conocida como Citrus Greening, Dieback, Yellow Branch, Vein Phloem Degeneration y Mottle Leaf (4). Es causada por una bacteria Gram negativa, perteneciente al género *Candidatus Liberibacter*. Se propaga a través de insectos o por

yemas infectadas (material de propagación). Presenta dos vectores naturales: *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri*. Es de diseminación rápida y hasta el momento no tiene cura. Con el transcurso del tiempo, la planta presenta un pobre desarrollo y finalmente muere. La bacteria puede ser identificada mediante microscopía electrónica y técnicas moleculares como PCR (4).

1.2 Agente causal

Actualmente existen 3 agentes causales pertenecientes al género *Candidatus Liberibacter*, para la enfermedad conocida como HLB y son:

- ✓ *Candidatus L. Asiaticus* (30).
- ✓ *Candidatus L. Africanus* (30).
- ✓ *Candidatus L. Americanus* (49).

Siendo la especie asiaticus la más común a nivel mundial, la especie africanus más limitada al continente africano y la especie americanus restringida en Brasil. Estas son bacterias fastidiosas vasculares, imposibles de reproducir en laboratorio. *Candidatus L. Asiaticus* y *Candidatus L. Americanus* son típicamente transmitidas por *Diaphorina citri*, mientras que *Trioza erytreae* es el vector típico de *Candidatus L. Africanus* (4).

1.4 Desarrollo de la enfermedad

Una vez que el vector pica la planta y se alimenta por algunos minutos se transmite la bacteria. La bacteria se reproduce en el floema y termina obstruyendo los tubos cribosos limitando el transporte normal de fotosintatos, produciéndose eventualmente el desarrollo de los síntomas típicos de la enfermedad en varias partes de la planta (14,21).

En hojas, el síntoma típico es el desarrollo de una clorosis con distribución irregular (moteado); el engrosamiento y aclaración de las nervaduras, que al cabo de un tiempo presentan un aspecto corchoso y la abscisión foliar (Figura 1.1). También puede observarse asimetría de colores en las nervaduras. Por su aspecto, estos síntomas son fácilmente confundidos con deficiencias minerales como zinc y magnesio (9).



FIGURA 1.1. Diferencias en hojas con HLB y deficiencias de Zinc (A) y Magnesio (B) (Tomado de Estación Exp. Agroindustrial Obispo Colombres).

En ramas, cuando la enfermedad se desarrolla, se produce una intensa caída de hojas de las ramas afectadas, los síntomas como el amarillamiento comienzan a aparecer en otras ramas, llegando inclusive a tomarse toda la copa, donde las puntas pueden secarse o morir (Figura 1.2) (4).



FIGURA 1.2. Ramas afectadas por HLB mostrando amarillamiento (A) y defoliación (B) (Tomado de Estación Exp. Agroindustrial Obispo Colombres).

En frutos algunos síntomas típicos son: la deformación; presencia de manchas circulares verde – amarillentas, que contrastan con el verde intenso del fruto, disminución del tamaño y la caída de los mismos (Figura 1.3). La deformación se produce en las ramas afectadas por la enfermedad. En su interior puede observarse diferencia de maduración y semillas abortadas; desviación del eje y

amarillamiento de las venas. Suele presentarse ensanchamiento de la parte blanca de la cáscara o albedo (4). También se evidencia baja cantidad de jugo, poca concentración azúcares, por lo que son muy ácidos y no aptas para el consumo por su sabor amargo desagradable (29).

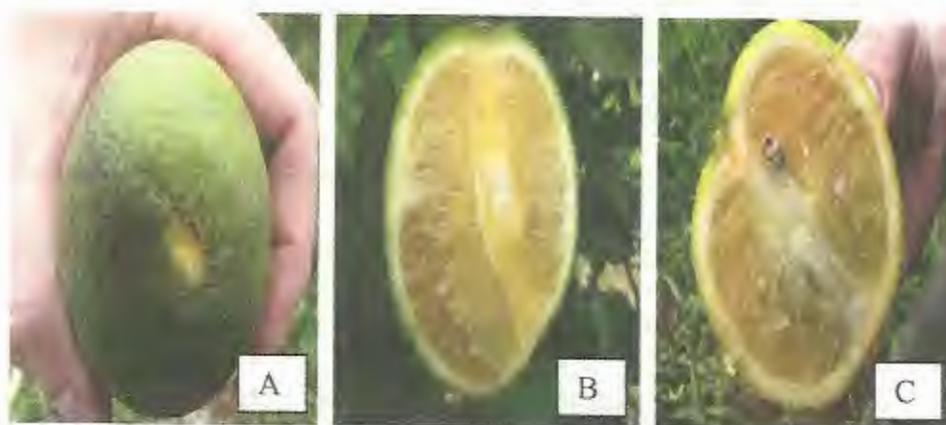


FIGURA 1.3. Frutos afectados por HLB mostrando un color anaranjado o marrón anaranjado en el punto de inserción del pedúnculo (A). Corte longitudinal mostrando además de la asimetría, un color anaranjado atípico en la columela (B). Semillas oscurecidas y deformes (semilla abortada) y la parte blanca bajo la cáscara (albedo) algo engrosada (C). (Tomado de Estación Exp. Agroindustrial Obispo Colombres).

1.5 Interacción planta – patógeno

Una planta joven afectada por la enfermedad no llega a su etapa productiva y una adulta demora entre 2 a 4 años en dejar de producir. El daño producido es permanente y conduce a la muerte de la planta (47).

En comparación con otras enfermedades conocidas, en esta la poda parcial resulta no ser efectiva. La mejor solución para una planta que manifieste síntomas evidentes es su erradicación definitiva lo más rápido posible, ya que es una fuente de inóculo (47).

En cuanto a la estacionalidad del patógeno, estudios realizados en México han demostrado que a mayor porcentaje de humedad relativa se detectan menor cantidad de psílicos positivos a *Candidatus Liberibacter*. La reproducción bacteriana en *Diaphorina citri* se ve favorecida durante los períodos de menor humedad relativa registrados durante estos meses (17). De la misma manera, se analizaron datos de temperaturas medias mensuales en el estado de Colima y se encontró una correlación negativa, por lo que a temperaturas bajas mayor reproducción del patógeno en el psílido (17). También se presupone que los períodos de adquisición de la bacteria por *Diaphorina citri* son más eficaces durante los meses de brotación ya que la distribución de los síntomas se presentan de manera homogénea en las ramas del árbol afectado (18).

Esta enfermedad afecta severamente a la naranja dulce (*Citrus sinensis*) y mandarina (*Citrus reticulata*). Las afectaciones son

menores en naranja trifoliada con sus híbridos, lima mexicana (*Citrus aurantifolia*) y pomelo (*Citrus paradisi*) (29).

1.6 Daños e importancia económica

Los daños más frecuentes son: Disminución del peso de los frutos, alteración del nivel de azúcar (parámetro para la industria), aumento del nivel de acidez, decaimiento del porcentaje de jugo, alteración del color, forma y tamaño de los frutos, hasta puede llegar a ocasionar la muerte de los árboles (48).

Las tres especies de '*Candidatus Liberibacter*' (*asiaticus*, *africanus* y *americanus*) son importantes por ser razas patogénicas, así como provocar la muerte de los árboles en un lapso de 1-2 años (56). Esta bacteria cuando se establece, puede infectar a todas las especies de cítricos, causando grandes pérdidas al acortar el periodo de vida de los árboles afectados (13).

Huanglongbing es considerada una de las enfermedades más destructivas para la industria citrícola a escala mundial. El Instituto Nacional de Sanidad Vegetal de Cuba (29), hace referencia de los daños producidos por esta enfermedad en diversas partes del mundo:

- En China, fueron erradicadas 960 mil plantas de cítricos por causa del HLB, durante el período comprendido entre 1977 y 1981, en la localidad de Guangdong, lo que originó una disminución de la producción de 450.000 a 5.000 toneladas, afectando gravemente a esta región (29).

- En Sudáfrica también ocasiona pérdidas notables, alcanzando anualmente reducciones de producción del 30 al 90%, siendo la enfermedad más importante que afecta a los cítricos en ese país (29).

- En Filipinas, los registros muestran que en 1971 esta enfermedad causó la muerte de un millón de árboles en una sola provincia de ese país, la producción de cítricos disminuyó de 11.700 toneladas a 100 toneladas de 1960 a 1970 por el ataque de este patógeno (29).

- En Tailandia y en Isla Reunión se han reportado plantaciones abandonadas por los efectos que causa el HLB (29).

- En Arabia Saudita todas las plantaciones de mandarinas y naranja dulce desaparecieron durante la década de 1975 a 1985 (29).
- En Taiwán se reporta que gran parte de la citricultura ha sido destruida por esta enfermedad (29).
- En la India la industria cítrica está siendo destruida lentamente por esta enfermedad (29).

En Estados Unidos el HLB está presente en los 32 condados productores de cítricos comerciales en Florida. Los economistas de la Universidad de Florida estiman que el HLB causó daños económicos por U\$S 4.500 millones, y que ha eliminado 8.200 puestos de trabajo desde que fue descubierto en el 2005 (32).

1.7 Distribución mundial

Asia, Sureste Asia y Oceanía.

Tanto el agente de HLB (*Candidatus L. asiaticus*) como el vector de este (*Diaphorina citri*) son tolerantes al calor por lo que ha sido encontrado desarrollándose exitosamente en diferentes regiones de Asia, sureste de Asia y Oceanía. Identificación realizada mediante técnicas de PCR dando positivo en: el subcontinente Indio (India,

Pakistán, Nepal, Bután, Bangladesh, Sri Lanka), Indochina en el sureste Asiático (Myanmar, Tailandia, Malasia, Camboya, Laos, Vietnam), Sureste de China, Taiwán, sur de Japón (Ryukyu islands, Okinawa), Filipinas, Indonesia (Java, Sumatra, este de Kalimantan, sur de Sulawesi, Bali), este de Timor, Papúa Nueva Guinea (39,4).

África e Isla de Madagascar.

Otro agente responsable de causar HLB es la bacteria *Candidatus L. africanus* y su único vector es el *Trioza erythrae* también perteneciente a la familia Psyllidae. Ambos son sensibles al calor y por ello solo se desarrollan en regiones con climas templados. En regiones del este y sur de África donde *Candidatus L. africanus* ha sido detectado por PCR tenemos: Sur África (Zimbabue, Malawi, Burundi, Kenya, Somalia, Etiopía). Al Oeste de África, solo Camerún reportó la enfermedad (4).

Sur América.

Brasil fue el primer país en las Américas en reportar HLB en el 2004. El vector asignado es *Diaphorina citri*, presente en este país por casi 70 años. Mediante técnicas moleculares, fueron detectadas 2 bacterias, la ya conocida como *Candidatus L. asiaticus* y una nueva a la cual se denominó *Candidatus L. americanus*. En estudios

realizados se determinó la gran virulencia de la nueva especie, al estar presente en el 92% de los árboles que presentaron HLB, mientras que la especie *Candidatus L. asiaticus* afectó tan solo al 6% de los árboles, y la combinación de ambas en el 2% (4).

Norte América.

El estado de la Florida (USA), es considerado como el segundo en la región de las Américas donde se reportó HLB, en el 2005. *Diaphorina citri* fue reportado 7 años antes en esta localidad. La especie encontrada de *Candidatus Liberibacter* es la *asiaticus* (4). Otro país de esta región que ha sufrido el ataque de esta enfermedad es México, en donde fue detectada la especie *asiaticus* (47).

1.8 Control

No existen disponibles métodos curativos para HLB, el control es preventivo y esta basado en gran medida en la eliminación del inóculo mediante la erradicación de árboles enfermos y la eliminación de los vectores mediante control químico. Estrictas medidas de cuarentena son requeridas para impedir una mayor propagación internacional de agentes de HLB y sus vectores (4). El uso de plántulas provenientes de viveros certificados constituye una

herramienta clave en el control de esta enfermedad. La eliminación de hospederos alternativos de la bacteria, como por ejemplo plantas de *Murraya paniculata* es otro factor a considerar (4).

CAPÍTULO 2

2. VECTOR DE LA ENFERMEDAD

2.1 Nombre y Taxonomía

Nombre científico: *Diaphorina citri* Kuwayama (11).

Nombres vernáculos: Psílido asiático de los cítricos, chicharritas.

Determinación taxonómica:

Clase: Insecta

Orden: Hemiptera

Suborden: Sternorrhyncha

Superfamilia: Psylloidea

Familia: Psyllidae



FIGURA 2.1. Adultos de *Diaphorina citri* en hojas de *Murraya paniculata* (cortesía de Eduardo J. Chica).

2.2 Biología y características morfológicas

Biología

Los psílidos son insectos pequeños que poseen un ciclo de vida incompleto, que inicia en huevo, pasa por 5 estados ninfales y termina en la etapa de adulto (22).

Diaphorina citri es tolerante al calor y le favorece el clima seco, desarrollándose a plenitud en temperaturas de 25-28 °C. Poseen una elevada tasa de fecundidad, siendo las hembras capaces de depositar hasta 800 huevos durante su ciclo de vida (20). A una temperatura de 25 grados centígrados los huevos eclosionan en un periodo de 4 días (51).

Su ciclo biológico puede variar entre 15 – 47 días y puede alcanzar hasta 10 progenies por año. El periodo de oviposición dura alrededor de 12 días y los huevos eclosionan de manera tardía en invierno (20).

Cuando son perturbados o sacudidas las hojas, tienden a saltar o volar pequeñas distancias (37). En ocasiones, estos desplazamientos pueden llegar a una altura de 5 a 7 metros del suelo, por lo que fácilmente son arrastrados por las corrientes de aire y trasladados a distancias de 0.5 a 4 km o aún mayores, como en el caso de huracanes o tornados (20,23).

Características morfológicas

Los huevos presentan una forma oval, algo alargada y un extremo pronunciado en punta. Un tamaño promedio de 0.31 mm de largo x 0.14 mm de ancho (51). Presentan una tonalidad brillante amarillo-naranja (22).

Esta especie presenta 5 instares ninfales de color naranja, su tamaño va de 0.25 a 1.7 mm (22). Se alimentan exclusivamente de brotes tiernos, cuando las hojas tienden a endurecerse la población baja drásticamente (22). Durante la alimentación producen túbulos cerosos que sirven para la expulsión de una especie de mielecilla, la

cual facilita la aparición y desarrollo de fumagina, que constituye uno de los indicadores de la presencia del insecto (Figura 2.2) (22).



FIGURA 2.2. Ninfa de *Diaphorina citri*, excretando túbulos cerosos (cortesía de Eduardo J. Chica).

Los adultos de esta especie son de tono marrón con una longitud aproximada de 3-4 mm (22). El cuerpo del adulto presenta un color pardo, recubierto de una especie de polvillo; su cabeza un color más claro; los ojos presentan un tono rojizo; en su extremo el primer par de alas se manifiestan con un borde más ancho. Las antenas presentan la terminación con un color negro, dándose a notar dos manchas color marrón claro en la parte central (22).

Las hembras son levemente más grandes que los machos y con la punta del abdomen bien marcada. En promedio el tamaño de los machos es de 2,7 mm de largo y 0,8 mm de ancho, mientras que el de las hembras es de 3,3 mm de largo y 1 mm de ancho (22).

2.3 Distribución geográfica mundial

El psílido asiático de los cítricos está presente en regiones tropicales y subtropicales de Asia, el Medio Oriente y las Américas (22). En las Américas, *Diaphorina citri* está presente en el sur de los Estados Unidos (52), la cuenca del Caribe y Centro América (6,24,54), la mayoría de los países del este de los Andes (2,8,11) y Colombia (28). *Diaphorina citri* ha sido reportado en algunos países cercanos a Ecuador, tales como: Brasil (11), Venezuela (8), Honduras (6), Costa Rica (54), República Dominicana, Cuba (24), Puerto Rico (44), entre otros.

2.4 Plantas hospederas

El psílido asiático de los cítricos cuenta con una gama restringida de plantas hospederas, se limita a las Rutáceas, tanto las especies silvestres como los cítricos comerciales, especialmente limones (*Citrus limon*), naranjos (*Citrus sinensis*), naranja agria (*Citrus*

aurantium), toronja (*Citrus paradisi*), limas (*Citrus aurantifolia*), mirto o jazmín naranja (*Murraya paniculata*), entre otras. Esta última se utiliza a menudo como ornamental y es su hábitat preferido (25,12).

2.5 Daños e importancia económica

El mayor daño causado por *Diaphorina citri* es la transmisión de la bacteria denominada *Candidatus Liberibacter* spp. causante de HLB. Esta enfermedad tiene alta incidencia en África y Asia, siendo considerada como un factor limitante para la producción de cítricos en estos continentes (31).

Otro daño causado es la extracción de grandes cantidades de savia de las plantas en las que se alimentan, produciendo una especie de mielecilla que origina problemas fitosanitarios como la fumagina. Adicionalmente al alimentarse inyecta una toxina que se encuentra presente en la saliva y que paraliza el crecimiento terminal de la hoja, produciendo malformaciones foliares (22).

2.6 Interacción bacteria – vector

Existe muy poca información relacionada con la adquisición, desarrollo y transmisión de la bacteria causante del HLB por parte de *Diaphorina citri*, encontrándose mucha información que varía

significativamente en relación a la transmisión y período de latencia, debido quizás a las diferencias entre especies y razas de vectores y bacterias involucradas (7,41,5).

Las ninfas que se desarrollan en árboles infectados son capaces de adquirir la bacteria durante los estadios 4 – 5 y los adultos provenientes de estas ninfas son portadores y transmisores del patógeno causante de la enfermedad. Los primeros estadios 1 – 2 - 3 no transmiten la bacteria, solo lo hacen los últimos instares 4 – 5 (54). Es probable que muchos adultos que se encuentran en árboles infectados hallan adquirido el patógeno en sus últimos estados ninfales que como adulto, lo que incrementa la rapidez de la distribución de la enfermedad en los cultivos (55).

Adultos de *Diaphorina citri* libres del patógeno y que se alimentan de árboles enfermos, pueden adquirir el patógeno en un tiempo que va de 30 minutos a 5 horas (7,55). Según reportes de investigaciones realizadas en laboratorio, cuando *Diaphorina citri* fue expuesta con plantas infectadas con HLB, menos del 5% reportaron positivo para *Candidatus L. asiaticus* a la prueba de PCR a los 7 días y de 20 al 30% reportaron positivo a los 30 días (5).

Después de ser adquirido el patógeno, este se multiplica dentro del vector y este permanece infeccioso durante toda su vida (55,27). Puede presentarse un periodo de latencia de hasta 21 días para que el adulto sea capaz de transmitir el patógeno (41). Otras investigaciones hablan de entre 8 – 12 días (7).

Varias investigaciones demostraron que el patógeno no se disemina de manera transovárica, ninfas provenientes de adultos infectados fueron puestas en plantas saludables y estos no presentaron síntomas de la enfermedad al cabo de un año (55).

2.7 Control

➤ Químico

El control químico es el principal criterio utilizado para el control de *Diaphorina citri*. En México, algunos estudios muestran que insecticidas como abamectina e imidacloprid aplicados al follaje reducen drásticamente la población de ninfas hasta los veinte días posteriores a la aplicación, con una eficacia del 90%. El spiromesifén también es recomendado para el control de ninfas, ya que a los 7 y 14 días de su aplicación muestra una eficacia de 83% y 88% respectivamente (46).

En Florida, la erradicación de esta plaga se hace imposible, el control químico es usado para disminuir los daños causados por el insecto en los tejidos de los árboles jóvenes. Generalmente solo son tratados los viveros y plantaciones jóvenes, ya que los árboles maduros soportan los daños físicos causados por el insecto (22). Para la protección de los arboles jóvenes se utiliza comúnmente imidacloprid como un insecticida sistémico (22). La dosis requerida para la aplicación depende del tamaño del árbol y del tipo de suelo, ya que árboles pequeños absorben de manera rápida este producto (22). Debido a que la acción del imidacloprid es lenta, es común utilizarlo en combinación con algún producto de amplio espectro, como por ejemplo algún piretroide, para obtener un control inmediato (22).

➤ Biológico

En México, investigaciones recientes han identificado 17 géneros y 15 especies de coccinélidos relacionados a *Diaphorina citri* (33). Los depredadores más abundantes son diferentes especies de arañas, *Chrysoperla rufilabris*, *Zelus renardii* (40). En huertas de limón persa, los enemigos naturales están presentes durante todo el año, sin demostrar ser eficaces en el control. Sin embargo, se demostró que *Tamarixia radiata* redujo significativamente el número de ninfas del

psílido (46). Así también, se han encontrado depredadores y hongos entomopatógenos asociados a *Diaphorina citri* (42).

En Florida, las poblaciones de psílidos sirven de alimento a una gran cantidad de artrópodos depredadores como arañas, crisopas, moscas y sírfidos. También son atacados por un gran número de parásitos (38). Los coccinélidos ejercen el mayor control sobre las poblaciones de *Diaphorina citri*, especies como *Harmonia axyridis* son bien conocidas como depredadores extraordinarios, tanto en la etapa inmadura como en la de adulto. Dos especies de pequeñas avispas que parasitan las ninfas de *Diaphorina citri* han sido importadas, investigadas y liberadas en Florida, estas son: *T. radiata* y *Diaphorencyrtus aligarhensis*, importadas desde Vietnam y Taiwán respectivamente. Ambos parásitos fueron liberados en Florida pero solo estableciéndose *T. radiata* (36). La avispa deposita sus huevos en el interior de la ninfa de *Diaphorina citri* y la larva se alimenta de la ninfa matándola en poco tiempo. El parásito emerge en estado adulto por un orificio que realiza en el cuerpo de la ninfa (22).

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del Ensayo

La primera parte de este ensayo contó con diferentes ubicaciones, comúnmente fincas del litoral ecuatoriano donde se recolectaron muestras, en la siguiente tabla se detallan los sitios tomados en cuenta para este experimento:

TABLA 1.
SITIOS DE MUESTREO, DISTRIBUIDOS EN 5 PROVINCIAS DEL
LITORAL ECUATORIANO.

Numero de muestra	Coordenadas geográficas	Provincia Localidad	Tipo de muestra
01	S 01° 14.64' W 079° 17.62'	Bolívar Las Naves	Naranja
02	S 01° 16.49' W 079° 19.57'	Bolívar Las Naves	Naranja
03	S 01° 15.30' W 079° 18.87'	Bolívar Las Naves	Naranja
04	S 01° 12.24' W 079° 17.56'	Los Ríos Quinsaloma	Naranja
05	S 01° 13.35' W 079° 20.16'	Los Ríos Quinsaloma	Naranja
06	S 02° 13.95' W 079° 11.02'	Guayas Bucay	Naranja
07	S 02° 07.72' W 079° 14.37'	Guayas Bucay	Naranja

08	S 02° 06.03' W 079° 12.95'	Guayas Bucay	Naranja
09	S 02° 06.78' W 079° 13.17'	Guayas Bucay	Naranja
10	S 01° 37.57' W 079° 15.40'	Bolívar Caluma	Naranja
11	S 01° 35.51' W 079° 17.46'	Bolívar Caluma	Naranja
12	S 01° 38.18' W 079° 19.09'	Bolívar Caluma	Naranja
13	S 01° 26.88' W 079° 19.15'	Bolívar Echandía	Naranja
14	S 01° 26.65' W 079° 13.63'	Bolívar Echandía	Naranja
15	S 01° 54.80' W 080° 39.98'	Santa Elena Barcelona	Limón
16	S 02° 07.10' W 079° 28.64'	Guayas Milagro	Naranja

17	S 02° 10.00' W 079° 53.00'	Guayas Guayaquil	Naranja
18	S 01° 10.03' W 080° 23.03'	Manabí Portoviejo	Naranja
19	S 01° 10.05' W 080° 23.05'	Manabí Portoviejo	Naranja
20	S 01° 09.18' W 080° 17.03'	Manabí Ayacucho	Naranja
21	S 00° 57.42' W 079° 39.77'	Esmeraldas Esmeraldas	Limón
22	S 00° 52.08' W 079° 37.87'	Esmeraldas Vía San Mateo	Limón
23	S 00° 50.10' W 079° 37.46'	Esmeraldas Tatica	Toronja
24	S 00° 50.08' W 079° 37.47'	Esmeraldas Tatica	Naranja
25	S 00° 53.81' W 079° 48.29'	Esmeraldas Tonsupa	Limón

	S 00° 43.43'	Esmeraldas	
26	W 079° 55.22'	Aguacate	Limón

La segunda parte de este ensayo se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ubicado en el km 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador.

3.2 Materiales

Para la recolección de muestras se utilizó:

- Sistema de posicionamiento global (GPS).
- Fundas para guardar muestras.
- Marcadores y libreta de apuntes.
- Hielera para conservar las muestras.

Para la extracción de ADN se utilizó:

- Centrifuga
- Incubadora
- Pipetas y micro pipetas
- Mortero
- Tubos de eependorf

- Cámara de olores (Sobona).
- Reactivos
- Congeladores (-20 y -80)

Para la PCR se utilizó:

- Termociclador (tiempo final)
- Cámara de flujo laminar
- Micro pipetas
- Reactivos
- Primers
- Transiluminador Bio Rad (USA).

3.3 Metodología

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo patentado por el CIBE denominado: "Protocolo para la extracción de ADN para plantas y hongos filamentosos", el mismo que fue desarrollado por el Dr. Efrén Santos a partir de protocolos que se citan al final del párrafo. Brevemente, se tomaron aproximadamente 300 mg de tejido fresco (nervadura central), el mismo que fue pulverizado en un mortero usando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino y este fue transferido a un tubo de eppendorf de 2 mL. Se adicionó 1 mL del buffer de extracción (concentración final): 100mM Tris pH 8.0, 50mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β -ME (0.7 μ l de 99.9% de

pureza) y 2% PVP10.000. Se adicionaron 80 μ l (53 μ l) 20% (30%) SDS (1.32% final), se agitaron los tubos mediante vortex y pasaron a incubación por 10 min a 55°C. Se adicionaron 330 μ l 5 M K-Ac (1.17 M final), se agitó con vortex brevemente y se centrifugó por 10 min a 12.000 rpm a 4°C. Se removió el sobrenadante evitando los debris. Se adicionaron 750 μ L de 6M NaCl y se agitó mediante vortex por 30 segundos. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf (resistente a cloroformo). Se adicionó un volumen igual de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) y se invirtió muchas veces el tubo. Se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Se adicionó un volumen igual de isopropanol al sobrenadante, se mezcló bien e incubó las muestras a -20°C por 14 horas. Se Centrifugó a 12.000 rpm a 4°C por 20 min. El pellet resultante fue lavado con etanol al 70%, se centrifugó por 5 min a 4°C y se secó brevemente. El pellet fue disuelto en 30 μ L de agua ultra pura (15,1).

Para la PCR se utilizaron dos pares de cebadores: rplA2 - rplJ5 (24) para *Candidatus* L. africanus y asiaticus y GB1 - GB3 (48) para la especie *Candidatus* L. americanus, a este procedimiento se lo conoce como PCR Dúplex. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de reacción de 40 μ l conteniendo: Buffer de PCR 1X

(20 μ M de Tris-HCl pH 8.4, 50 μ M KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de los primers rplA2, rplJ5, GB1, GB3, 200 μ M de dNTPs, 1U de Taq ADN polimerasa y 500 ng/ μ l de ADN. Se llevó a cabo el siguiente programa de PCR en un termociclador Eppendorf (Germany): una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, 38 ciclos de desnaturalización, 94 °C durante 45 segundos, acoplamiento, 58 °C durante 45 segundos y polimerización, 72 °C durante 60 segundos y una extensión final de 72 °C por 5 minutos. Se aplicaron 12 μ L de los productos de amplificación en gel de agarosa al 1.5%, teñido con Sybr safe (1X) y se observaron en un transiluminador Bio Rad (USA) con luz ultravioleta. Se utilizó un patrón de peso molecular 100pb Promega (34).

3.4 Diseño del muestreo

Para este estudio se tomaron en cuenta 26 sitios de muestreo distribuidos en zonas tropicales y subtropicales de 6 provincias del Ecuador: Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, Bolívar, Guayas y Santa Elena. Los sitios fueron escogidos en su mayor parte por guías de la zona. En cada plantación se evaluaron al menos 30 árboles ubicados principalmente en las 5 primeras filas de la plantación, colindantes con carreteras o bordes. En cada sitio se realizó un diagnóstico visual y se colectaron muestras de hojas con síntomas sospechosos

ocasiones en que no se detectaron síntomas sospechosos se tomaron muestras al azar para su posterior diagnóstico molecular. A la vez que se realizó el muestreo en árboles, también se revisó la presencia de *D. citri* en los sitios visitados.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

❖ Resultados

- En la recolección de muestras se pudieron apreciar síntomas aparentes en hojas, específicamente clorosis asimétrica. No se encontró síntomas en frutos (Figura 4.1).

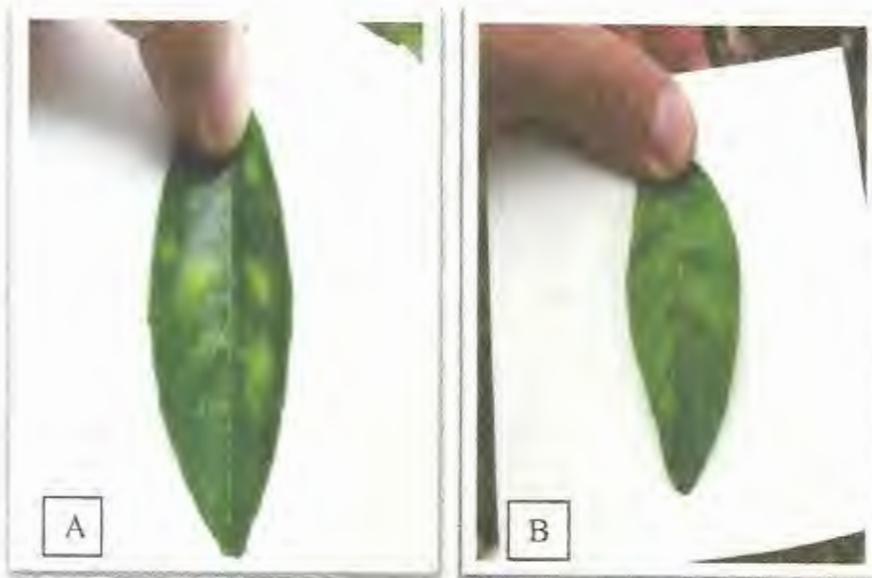


FIGURA 4.1. (A, B) Hojas de cítricos mostrando una inusual clorosis asimétrica (cortesía de Eduardo J. Chica).

- En cuanto a la presencia del psílido, este fue encontrado por primer vez el 20 de Enero de 2013 en el cantón Guayaquil, se encontraba en un arbusto de *Murraya paniculata* en una acera pavimentada del norte de la ciudad ($2^{\circ}10'28.16''S$, $79^{\circ}53'54.31''W$). En posteriores prospecciones se determinó que el mismo se encontraba ampliamente distribuido por toda la ciudad, después fue encontrado en el cantón Samborondón y en el cantón Durán. En la Figura 4.2 se presenta un mapa con los sitios donde se ha reportado la presencia de *Diaphorina citri* en Guayaquil.



FIGURA 4.2. Distribución de *Diaphorina citri* en la ciudad de Guayaquil entre Enero y Mayo de 2013.

- El estudio de PCR arrojó negativo para la presencia de la bacteria, en las muestras sujetas a investigación. En la Figura 4.3 se muestra la fotografía del gel donde claramente se puede apreciar la banda solo en el control positivo o muestra inoculada con la bacteria. Por tanto, no se detectaron árboles infectados por HLB en los sitios muestreados (Figura 4.4).

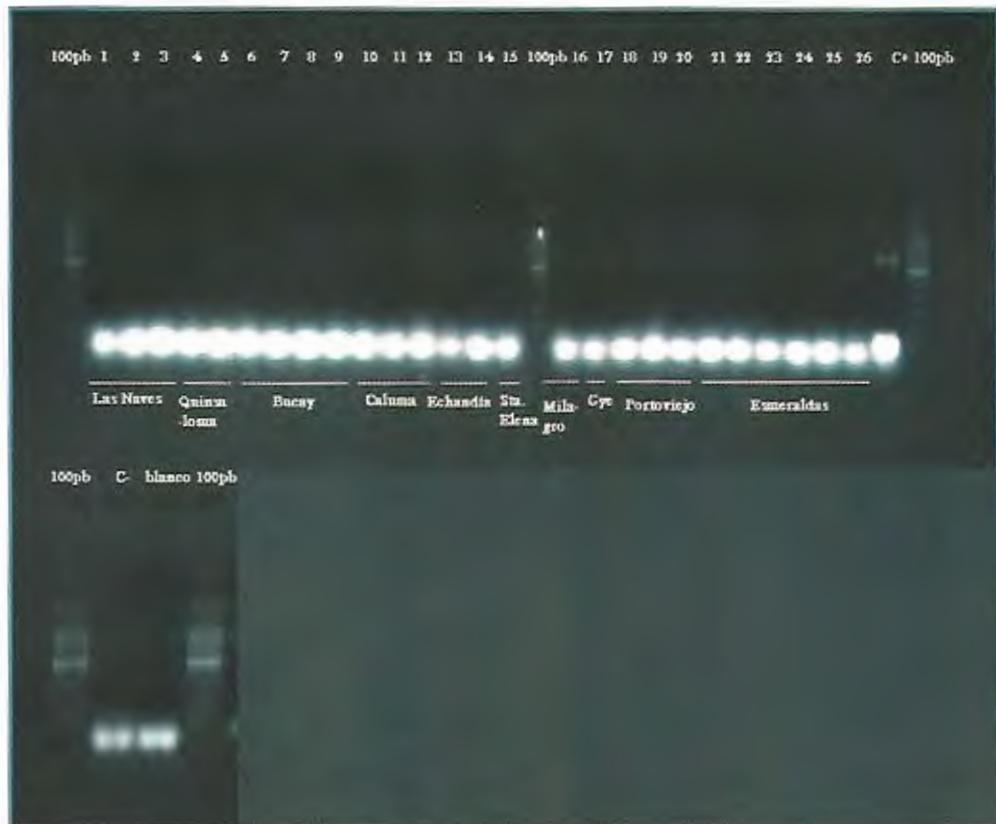


FIGURA 4.3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de la PCR dúplex. Carriles de los extremos: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega), carriles 1-26: ADN de hojas con síntomas de moteado asimétrico difuso, carril C+: ADN de *Candidatus* L. asiaticus, carril C-: ADN aislado de planta sana, carril blanco: agua.

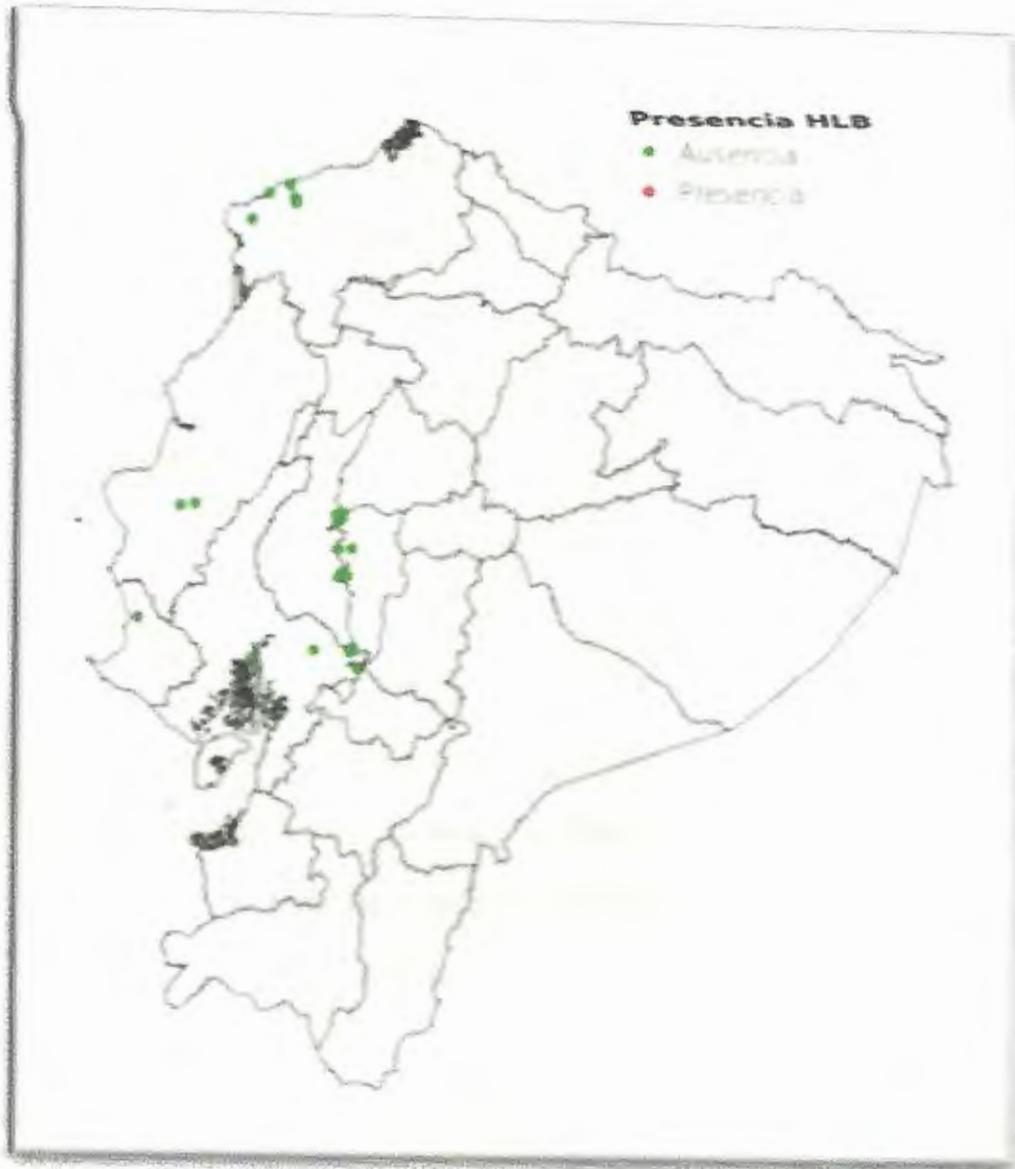


FIGURA 4.4. Ubicación de los sitios de muestreo y diagnóstico final de la presencia/ausencia de HLB en muestras de cítricos.

❖ Discusión

Los resultados de este estudio indican que en los sitios visitados no hay evidencia de la presencia de la bacteria causante del HLB, pero sí de su vector. Precisamente, debido a la presencia del vector es necesario reforzar los monitoreos de la dinámica de las poblaciones del insecto y la presencia o ausencia de HLB en otras zonas no visitadas durante este estudio, ya que por lo general primero se reporta el vector y después de algunos años se detecta la presencia de la bacteria. Así como es el caso de algunos países como Brasil donde *Diaphorina citri* fue reportado durante los años 40's (11), pero HLB no se observó hasta el 2004 (10). Desde los años 90's el psílido ha invadido a varios países del Caribe, Las Antillas y América, incluyendo los Estados Unidos de Norteamérica donde se encontró durante el 2005 y tiempo después se detectó la enfermedad (23).

Un detalle a tener en cuenta es la cercanía que existe entre los sitios donde se ha reportado *Diaphorina citri* y las zonas rurales donde se concentran los cultivos citrícolas, además el alto flujo de transporte terrestre circulando todos los días ida y vuelta haría muy fácil la diseminación de la plaga, más aún cuando no existen controles en los caminos.

En cuanto al cultivo en sí, se debe trabajar con materiales enanizados que permitan un adecuado monitoreo de los síntomas de la enfermedad, así como también un adecuado control del vector al facilitar la aplicación de insecticidas.

Es muy común observar que la adquisición de plántulas se la hace en viveros que no cuentan con infraestructuras apropiadas que garanticen la producción de árboles sanos, libres de HLB (y otras enfermedades transmitidas por material de propagación). Debería efectuarse una campaña para promover la construcción de lugares propicios para el desarrollo de material limpio, que cuenten con una certificación estatal y un monitoreo constante de los técnicos responsables del área.

Por último refiriéndonos al control del vector, esta es una tarea difícil ya que una de las principales medidas de prevención del HLB, es la eliminación o fumigación constante del arbusto conocido como Mirto (*Murraya paniculata*) que es el principal hospedero de *Diaphorina citri*. Los arbustos de mirto se encuentran ampliamente distribuidos en parques y parterres de las ciudades, así como también se encuentra como material de adorno de muchas viviendas del país donde es difícil aplicar programas de control de plagas agrícolas.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

❖ Conclusiones

1. Los muestreos realizados pudieran ser insuficientes o no representativos para la superficie total del país, además el trabajar en una sola región (costa), es una limitante para la investigación.

2. La intervención por parte de organismos estatales relacionados con el tema debe ser prioritaria, ya que una intervención oportuna y efectiva es de vital importancia para evitar el ingreso y propagación de la enfermedad.

3. Al momento los productores y campesinos no cuentan con la información técnica necesaria para la detección y manejo de la enfermedad.

4. No existe un manejo preventivo por parte de los viveristas.

5. El manejo por parte de los productores es inadecuado, ya que no realizan las actividades culturales necesarias para un buen desarrollo del cultivo.

❖ Recomendaciones

1. Los muestreos tanto para detección de la bacteria como para determinar la presencia del vector deberían continuar y extenderse a las demás regiones del país.
2. El apoyo estatal es de suma importancia para la capacitación de los productores, que conduzca a una oportuna intervención en los campos.
3. La implementación de controles para la certificación de viveros, también es un aspecto que hay que considerar en un plan estratégico de prevención.
4. Se recomienda realizar investigaciones que ayuden a encontrar métodos de control y erradicación de esta enfermedad.

5. La unión de los centros de investigación, las comunas y los productores también debe considerarse como una medida de acción efectiva.

6. La creación de puntos de control o medidas cuarentenarias internas (intranacionales) puede ayudar a la detección temprana o contenimiento del vector o la enfermedad para limitar su diseminación a zonas libres del vector o enfermedad.

ANEXOS

ANEXO I

(Tomado del Manual Técnico para la detección de HLB en los cítricos (Senasica, 2008))

Anexo 1

Sintomas ocasionado por HLB

Fotos 1 y 5 cortesía de Hilda D. Gomez, USDA-APHIS-PPQ.

Fotos 2, 3, 4 y 8 cortesía de Pedro L. Robles, SAGARPA-SENASICA-OGSV.

Foto 6 cortesía de Bernardo Reyes, CESV Michoacán.

Foto 7 cortesía de Tim Gottwald (tomada de Gottwald (2007)).



1. Hojas con moteado.



2. Hojas con aclaramiento de nervaduras.



3. Hoja con nervaduras corchosas.



4. Amarillamiento y muerte regresiva.

Síntomas ocasionado por HLB



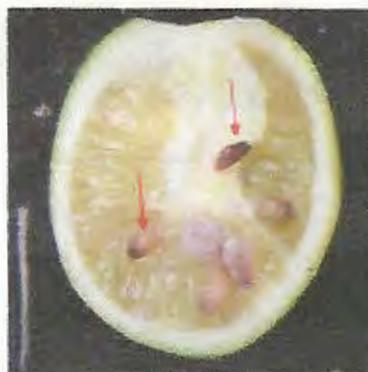
5. Frutos deformes.



6. Tinción amarilla de la región vascular



7. Frutos con coloración irregular.

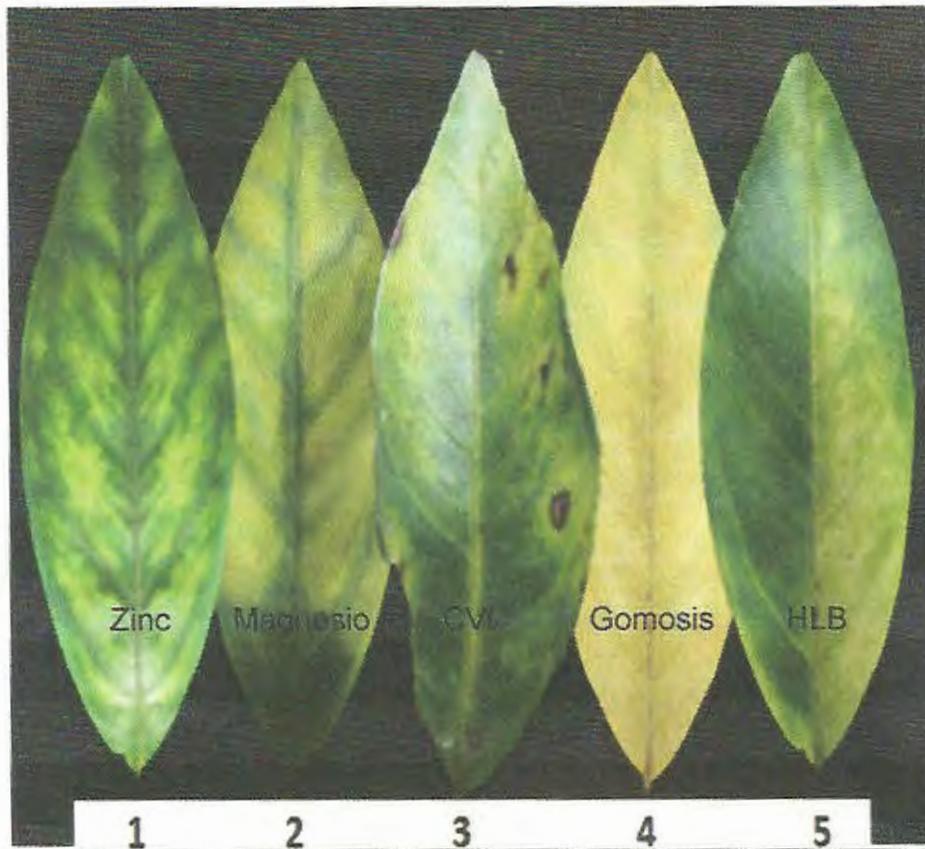


8. Semilla atrofiada y abortada.

ANEXO II

Diagnóstico diferencial

(Tomado de Estación Exp. Agroindustrial Obispo Colombres)



ANEXO III
Adulto de *Diaphorina citri*
(Cortesía de Eduardo J. Chica)



ANEXO IV
Adulto de *Diaphorina citri*
(Cortesía de Eduardo J. Chica)





Florida Department of Agriculture and Consumer Services
Division of Plant Industry
ENTOMOLOGY SPECIMEN REPORT

ANDREW H. PUTNAM
 COMMISSIONER

Section 570.32 (1), F.S.
 1911 SW 34th St./P.O. Box 147100, Gainesville, FL 32614-7100/(352)372-3505/Fax (352) 334-0737

Sample Information	
Sample Number: E2013-882-1	Date Received: 2/13/2013
Priority: Routine Purpose: Voucher Academic	Via State/Country:
Diagnosis/Determination	
Determined By: Halbert, Susan	Determination Date: 14-Feb-13
Order: HEMIPTERA	Disposition: 40 - Molecular Analysis, 4 - Pinned
Family: PSYLLIDAE	Life Stage: 44 - ADULT
Genus: Diaphorina	Determiners Comments:
Species: citri	TRIOLOGY. 40 adults to Immokalee for citrus greening analysis. 4 adults pinned for vouchers. SEH
Subspecies:	
Describer: Kuwayama	
Common Name: Asian citrus psyllid	
Confirmed by:	Confirmed Date:
Host Information	Plant Part:
Family: Rutaceae	Severity:
Genus: Murraya	Collection Method: Hand Catch
Species:	Plants Involved/Affected: /
acculata (L.) JACK	Acres Involved/Affected: /
Common Name: ORANGE-JESSAMINE, ORANGE-JASMINE, C	Non Plant Host Common Name:
Notes:	Non Plant Host Order:
	Non Plant Host Family:
	Non Plant Host Genus:
	Non Plant Host Species:
Collector/Sender Information	Specimen Location Information
Collection Date: JAN 25 2013	Nursery Number:
Simon Farah	Business/Individual Address:
	Resguardada Farmacia Fybeca
Date: FEB 3 2013	Guayaquil, Guayas-Ecuador
Stansly UF	Ecuador
	Section - Township - Range:
	Latitude: -2.17451408 Longitude: -79.898304738
Collector/Sender Comments:	Send Report To:
Ecuador Guayaquil 25 Jan 2013 Simon Farah. Ex Murraya acculata. P. Stansly	S Farah, P Stansly
Typist: cjc	Completed By: cjc
	Date completed: 15-Feb-13

BIBLIOGRAFÍA

1. Aljanabi SM, Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
2. Augier, L., Gastaminza, G., Lizondo, M., Argañaraz, M. and Willink, E. 2006. Presencia de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en el Noroeste Argentino (NOA). *Rev. Soc. Entom. Argentina* 65:67-68.
3. Berg, M.V. (1999): Measures to reduce citrus psilla populations and the spread of greening disease. *Neltropika Bulletin*. 303: 3-6.
4. Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88: 7-37.
5. Brlansky, R. H. and M. E. Rogers. 2007. Citrus huanglongbing: understanding the vector-pathogen interaction for disease management. APSnet. <http://www.apsnet.org/online/feature/HLB/>
6. Burckhardt, D., and M. Martinez. 1989. Note sur la présence su Honduras d'un redoutable ennemi dès citrus: *Diaphorina citri*

Kuwayama [Hom. Psylloidea Psyllidae]. Bulletin de la Société Entomologique de France 94:65-66.

7. Capoor, S.P., D.G. Rao, and S.M. Viswanath. 1974. Greening disease of citrus in the Deccan Trap Country and its relationship with the vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. Proceedings of the 6th Conference International Organization of Citrus Virologists. 43-49.
8. Cermeli, M., P. Morales, and F. Godoy. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (hemíptera: Psyllidae) en Venezuela. Boletín Entomología Venezolana 15: 235-243.
9. Coelho, M.V. y Marques, A. (2002): "Citrus greening" Uma bacteriose quarentenária que representa ameaça potencial à citricultura brasileira. Comunicado Técnico 58. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 4 pp.
10. Coletta-Filho, H. D., Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu, J., Jr, Machado, M. A., Amaral, A. M. & Muller, G. W. 2004. First report of the causal agent of huanglongbing ('*Ca. Liberibacter asiaticus*') in Brazil. Plant Dis 88, 1382.

11. **Costa Lima AM. da.** 1942. Homópteros. Insetos do Brazil 3: 1-327.
Esc. Na. Agron. Min. Agr.
12. **Chakraborty, N.K., P.K. Pandey, S.N. Chatterjee and A.B. Singh.**
1976. Host preference in *Diaphorina citri* Kuwayama, vector of greening disease in India. Indian J. Entomol. 38:196-197.
13. **Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, H., and Civerolo, E.** 2009. A Phytoplasma Related to "Candidatus Phyto-plasma asteri" Detected in Citrus Showing Huanglongbing (Yellow Shoot Disease) Symptoms in Guangdong, P. R. China. Phytopathology 99: 236-242.
14. **Chiou-Nan Chen** (1998): Ecology of the Insect Vectors of Citrus Systemic Diseases and Their Control in Taiwan. FFTC Publication Database. www.agnet.org/library/eb/459a/ (Consulta: 20-9-2007).
15. **Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB.** 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reports 1: 19-21.
16. **FAO.** (2005): Principales productores de alimentos y prod. agrícolas <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html;jsessionid=94FD1EA6512C46E206369CA85A0F571E?item=512&lang=es&year=2005>. (Consulta: 3-9-07).

17. **Félix-Portillo, M., Martínez-Quintana, J.A. and Arredondo-Bernal, H.** 2011. Estacionalidad de la Infectividad de HLB en Colima. Segundo Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. México.
18. **Flores-Sánchez, J. L.** 2011. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing de los cítricos (HLB) en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
19. **Fundecitrus.** 2009. Manual técnico de Greening. Folleto técnico. Brasil. 12 pp.
20. **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.
21. **García, Clara.** (2006): Huanglongbing (HLB-Greening). Dirección de Vigilancia y Monitoreo. <http://www.senasa.gov.org> (Consulta: 20-9-07).
22. **Grafton-Cardwell, E., Godfrey, K.E., Rogers, M.E., Childers, C.C., and Stansly, P.A.** 2006. Asian Citrus Psyllid. Publication 8205. University of California-Riverside. Division of Agriculture and Natural Division.

23. Hall, D. G. 2008. Biology, History and world status of *Diaphorina citri*. I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter spp*) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) Hermosillo, Sonora. México.
24. Halbert, S. E., and Núñez, C. A. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. Florida Entomol. 87:401-402.
25. 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 in Florida. Florida Entomol. 87:330-353.
26. Hocquellet A., Toorawa P., Bové J.M., Garnier M. 1999. Detection and identification of the two '*Candidatus Liberibacter*' species associated with the citrus Huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. Mol. Cell. Probes 13: 373-379.
27. Hung, T. H., S. C. Hung, C. N. Chen, M. H. Hsu and H. J. Su. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. Plant Pathology. 53: 96-102.

28. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2012. Vigilancia oficial del psilido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Colombia. Subgerencia de Protección Vegetal. <URL:http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-agricola/HUANGLONGBING/BOL_HLB_DIC_21_2012.aspx> Last accessed 14 Feb. 2013.
29. INISAV. 1999. La enfermedad del enverdecimiento de los cítricos y su vector (*Diaphorina citri* Kuwayana). Boletín Técnico (La Habana) 5 (1).
30. Jagoueix, S., Bové, J.M. And Garnier, M. 1994. The Phloem-Limited Bacterium of Greening Disease of Citrus Is a Member of the α Subdivision of the Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 379-386.
31. Jagoueix S., Bové J.M., Garnier M., 1996. PCR detection of the two 'Candidatus' *liberibacter* species associated with greening disease of citrus. Molecular Cellular Probes 10: 43-50.
32. La Gaceta. 2013. (En línea). Disponible en <http://www.lagaceta.com.ar/nota/534840/nuevas-estrategias-para-luchar-contra-hlb.html>

37. Mead, F.W. 1977. The Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homóptera: Psyllidae). Entomology Circular 180. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. 4 pp.
38. Michaud, J. P. 2004. Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homóptera: Psyllidae) in central Florida. Biological Control 29: 260-269.
39. Miyakawa T., Tsuno K., 1989. Occurrence of citrus greening in the southern islands of Japan. Annual Phytopathology Society Japan 66: 667-670.
40. Miranda-Salcedo, M. A. y López-Arrollo, J. I. 2010. Fluctuación Poblacional del Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* Kuwayana (HEMIPTERA:PSYLLIDAE) y sus enemigos naturale. En memoria del 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 13-18 pp.
41. Moll, J. N. and S. P. Van Vuuren. 1977. Greening disease in Africa. Proc. Int. Soc. Citriculture. 3: 903-912.
42. Ortega-Arenas, L. D., Villegas-Monter, A., Orduño-Cruz, N., Vega-Chávez, J., Lomeli-Flores, J. R. y Rodríguez-Leyva, E. 2010.

sobre investigación para el manejo del Psilido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 30-31 pp.

47. **Senasica.** (2009-2010). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasica.gob.mx>
48. **Senasica.** (2011). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasica.gob.mx>
49. **Teixeira, D. C., Ayres, A. J., Kitajima, E. W., Tanaka, F. A. O., Danet, J. L. Jagoueix, E. S., Saillard, C. and Bové, J. M.** 2005. First report of huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new liberibacter species, 'Candidatus Liberibacter americanus', with the disease. *Plant Disease* 89: 107.
50. **Teixeira D.C., Saillard C., Couture C., Martins E.C., Wulff N.A., Eveillard-Jagoueix S., Yamamoto P. Ayres A.J. Bové J.M.** 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Mol. Cell. Prob.* 22: 139-150.
51. **Tsai, J.H. and Y.H. Liu.** 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homóptera: Psyllidae) on four host plants. *J. Econ. Entomol.* 93 (6): 1721-1725.

52. **USDA.** 2010. Citrus Greening And Asian Citrus Psyllid. *Plant Health*.

<URL:http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/citrus_greening/downloads/pdf_files/nationalquarantinemap.pdf> Last accessed 14 Feb. 2013.

53. **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.

54. **Villalobos, W., Hollis, D., Godoy-Cabrera, C., and Rivera-Herrero, C.** 2005. Primer informe de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en Costa Rica. *Insecta Mundi*. 19:191-192.

55. **Xu, C. F., Y. H. Xia, K. B. Li and C. Ke.** 1988. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Timmer, L. W., Garnsey, S. M., and L. Navarro (eds.), *Proceedings of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists*. International Organization of Citrus Virologists, Valencia, Spain, pp. 100-108.

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

