

**UNIVERSIDAD DE MATANZAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE  
LOS FRUTOS EN PLANTACIONES DE POMELOS  
CON HUANGLONGBING EN JAGÜEY GRANDE**

**DIANA ROSA HERNÁNDEZ POLLEDO**

**Trabajo presentado en opción al Título de  
Especialista en Fruticultura**

**Jagüey Grande  
2018**





UNIVERSIDAD DE MATANZAS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



# EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE LOS FRUTOS EN PLANTACIONES DE POMELOS CON HUANGLONGBING EN JAGÜEY GRANDE

Tesis presentada en opción al Título de  
Especialista en Fruticultura

**Autor:** Ing. Diana Rosa Hernández Polledo

**Tutor:** Dr. C. Miguel Aranguren González

Jagüey Grande  
2018

## **DEDICATORIA**

A mis hijos por ser mi luz y hacerme sentir la mamá más dichosa de este mundo.

A mi esposo y compañero por ayudarme en todo este tiempo de sacrificios y por vivir junto a mí cada etapa con amor incondicional.

A mi madre y hermano por confiar en mí y apoyarme en mi formación sin mostrar cansancio en este empeño.

A mi padre le dedico los éxitos obtenidos durante estos años de estudio, y estés donde estés quiero que sepas que cumplí con sus sueños.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor Dr. C. Miguel Aranguren González por su esfuerzo y guía acertada durante el desarrollo de este trabajo de diploma; por su constante atención y preocupación durante la preparación y elaboración del trabajo.

A los compañeros de la Unidad Científico Tecnológica de Base Jagüey Grande y la Empresa Agroindustrial Victoria de Girón que colaboraron con este trabajo.

A los profesores que contribuyeron a mi formación profesional.

**A todos muchas gracias**

## RESUMEN

La Empresa de Agroindustrial “Victoria de Girón” de Jagüey Grande, ubicada en la provincia Matanzas, se destaca como una de las más importantes en la producción de cítricos con destino a la comercialización en el mercado interno y externo de frutos frescos y productos industrializados. La presencia de enfermedades de alto impacto en el cultivo de los cítricos, como el Huanglongbing (HLB) que se informa en esta empresa a finales del año 2007, ha representado desde ese momento, una seria amenaza a la sostenibilidad de la citricultura. Este trabajo tuvo como objetivo contribuir al conocimiento del efecto del HLB sobre los rendimientos y la calidad de los frutos en plantaciones de pomelos en las condiciones de Jagüey Grande. Se trabajó con bases de datos históricos de la evolución de los rendimientos en plantaciones diagnosticadas con la enfermedad y se tomaron los datos de los estimados de producción realizados durante las campañas 2007-2017 de plantaciones de pomelo ‘Marsh’ ubicadas en la empresa. Se evaluaron 10 plantas al azar que se clasificaron según los síntomas típicos del HLB en cuatro grados de intensidad, para correlacionar esta variable con los rendimientos obtenidos. Se determinaron además los rendimientos, caídas de frutos y las diferentes variables de calidad de los pomelos procedentes de plantas con diferente título bacteriano e intensidad de la enfermedad HLB. Los resultados mostraron una disminución de los rendimientos con el tiempo de enferma la plantación y mayores pérdidas en frutos en el cultivar de pomelo ‘Marsh’ con respecto a los otros; además, se encontró una correlación directa entre la disminución de la producción y el incremento de la intensidad de la enfermedad en plantaciones de fomento y producción. Las caídas de frutos fueron superiores en plantas enfermas por HLB y se asociaron a otros patógenos como *Diplodia* sp. Se observaron afectaciones en algunos parámetros de calidad de frutos de plantas con diferente intensidad de HLB. Este trabajo ofrece los primeros resultados de la relación del HLB con los rendimientos y la calidad de los frutos de pomelos en Jagüey Grande.

**Palabras clave:** HLB, título bacteriano, rendimiento, calidad.

<b>INDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Generalidades sobre el Huanglongbing .....	5
2.1.1. Antecedentes y distribución mundial de la enfermedad.....	5
2.1.2. Informe y situación del Huanglongbing en Cuba .....	7
2.2. Sintomatología del Huanglongbing.....	8
2.2.1. Síntomas foliares .....	8
2.2.2. Síntomas en frutos.....	10
2.2.3. Síntomas generales en el árbol .....	11
2.3. Identificación del patógeno y diagnóstico .....	13
2.3.1. Caracterización del patógeno .....	13
2.3.2. Métodos de diagnóstico de la enfermedad .....	13
2.4. Susceptibilidad de cultivares cítricos y hospederos .....	16
2.4.1. Cultivares más susceptibles .....	16
2.4.2. Otros hospederos .....	17
2.5. Vectores, transmisión y epidemiología del Huanglongbing .....	17
2.5.1. Vectores más eficientes.....	17
2.5.2. Transmisión del patógeno.....	17
2.5.3. Aspectos epidemiológicos .....	19
2.6. Daños y pérdidas estimadas por el Huanglongbing .....	21
2.6.1. Afectaciones al rendimiento y la calidad de los frutos.....	21
2.6.2. Daños económicos .....	22
2.7. Estrategias de manejo de la enfermedad .....	23
2.7.1. Cuarentena y certificación .....	23
2.7.2. Manejo de insectos vectores y control químico .....	24
2.7.3. Empleo de controles biológicos .....	25
2.7.4. Eliminación de árboles enfermos.....	26
2.7.5. Manejo fitotécnico de la plantación.....	27
2.7.6. Aplicación de antibióticos e inductores de resistencia .....	29

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1. Ubicación del trabajo de investigación .....	30
3.2. Características generales de las plantaciones .....	30
3.3. Influencia del Huanglongbing en el rendimiento y crecimiento en pomelos .....	31
3.3.1. Evolución de los rendimientos en una plantación de pomelo con HLB.....	31
3.3.2. Crecimiento de las plantas en tres cultivares de pomelo con HLB .....	31
3.4. Influencia del Huanglongbing en la producción y caída de frutos.....	33
3.4.1. Relación del número de frutos con la severidad de los síntomas .....	33
3.4.2. Relación del número de frutos con el título bacteriano en la planta.....	33
3.4.3. Cambios en la dinámica de abscisión de frutos asociada al HLB.....	34
3.5. Efectos del Huanglongbing en la calidad de los frutos .....	35
3.5.1. Comparación de la calidad en frutos con síntomas y asintomáticos.....	35
3.5.2. Proporción de los cambios en la calidad del fruto asociados al HLB.....	36
3.6. Valoración económica de las pérdidas potenciales por HLB.....	36
3.7. Programa estadístico utilizado .....	36
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
4.1. Influencia del Huanglongbing en el rendimiento y crecimiento en pomelos .....	37
4.1.1. Evolución de los rendimientos en una plantación de pomelo con HLB.....	37
4.1.2. Crecimiento y producción en tres cultivares de pomelo con HLB .....	38
4.2. Influencia del Huanglongbing en la producción y caída de frutos.....	42
4.2.1. Relación del número de frutos con la severidad de los síntomas .....	42
4.2.2. Relación del número de frutos con el título bacteriano en la planta.....	44
4.2.3. Cambios en la dinámica de abscisión de frutos asociada al HLB.....	45
4.3. Efectos del Huanglongbing en la calidad de los frutos .....	47
4.3.1. Comparación de la calidad en frutos con síntomas y asintomáticos.....	47
4.3.2. Proporción de los cambios en la calidad del fruto asociados al HLB.....	50
4.4. Estimación económica de las pérdidas potenciales por el HLB .....	53
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>57</b>

### 1. INTRODUCCIÓN

Los rendimientos en el cultivo de los cítricos, pueden estar limitados por un conjunto de factores, bióticos y abióticos entre los que se destacan: clima, suelo, potencial genético de los cultivares, uso de patrones, nutrición, riego, control de malezas, presencia de plagas agrícolas (Luck *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 2001; Spreen, 2003). Dentro de las más limitantes se encuentran, el cancro o cáncer de los cítricos, virus de la tristeza de los cítricos, leprosis y el Huanglongbing; constituyendo la principal limitante para el incremento y calidad de la producción (Santos, 2013).

La citricultura en muchos países de la región, como México, Colombia y Cuba presenta un complejo panorama fitosanitario tras la llegada de la enfermedad bacteriana Huanglongbing (HLB) y de otras ocasionadas por hongos y algas, esta situación ha propiciado el desarrollo integral de investigaciones y la aplicación de tecnologías, para mitigar las afectaciones que estas enfermedades causan a las plantaciones cítricas (Cabrera *et al.*, 2017).

El HLB también conocido como enfermedad de los brotes amarillos, se considera como la más devastadora de los cítricos (Bové, 2012, Canales *et al.*, 2017, Ramadugu *et al.*, 2017). En los últimos diez años, se reporta más grave que el virus de la tristeza y representa una gran amenaza para las regiones cítricas (Velázquez, 2011; Alberch y Bowman, 2012).

A nivel mundial, el impacto epidémico del HLB es elevado, con niveles de incidencia desde 26% (Brasil) hasta 100% (China). Adicionalmente, las pérdidas reportadas desde el punto de vista cuantitativo y epidemiológico, varían con respecto a la especie evaluada. Se informan pérdidas del 42% en naranja dulce, 62% en limón mexicano y 17.3% en limón persa (Gottwald *et al.*, 2010; Robles *et al.*, 2013). En La Florida (USA) la producción de cítricos ha declinado en más del 60% y las pérdidas de los rendimientos continúan incrementándose, como ocurre en la mayoría de las citriculturas con presencia del HLB en lo subtropicos de Las Américas, incluyendo Cuba (Graham y Alferez, 2017).

Esta enfermedad causada por la bacteria endógena *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), es transmitida en el continente americano por el Psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama, y parasita el floema de la planta con obstrucción del flujo desde las hojas hacia otras partes del vegetal (Moreno *et al.*, 1996; Bové, 2012; González *et al.*, 2017).

Los síntomas más típicos de esta enfermedad son: la presencia de brotes amarillos, con un patrón de áreas amarillas y verdes, carentes de límites claros, que se desarrollan en las hojas afectadas dando una apariencia de “moteado” que generalmente resulta asimétrico respecto a las dos mitades de la hoja, estas son más gruesas, con nervaduras alargadas y corchosas en su apariencia y en etapas posteriores, pueden aparecer síntomas de deficiencia de zinc, seguidas por caídas de hojas y muerte regresiva de las ramitas finas (Bové, 2006; Fernández, 2015).

Los síntomas característicos de la enfermedad son: hojas con moteado asimétrico, nervios cloróticos y engrosados, en ocasiones corchosos (McClellan y Schwarz, 1970); en estados avanzados de la enfermedad, las hojas jóvenes afectadas son pequeñas y erectas, con clorosis intensa que pueden confundirse con los síntomas que aparecen en otras enfermedades o carencias de nutrientes como zinc, hierro y manganeso (Bové, 2006).

Con el avance de la enfermedad, aparece una excesiva caída de frutos con afectaciones en los rendimientos, los frutos son más pequeños, torcidos y en la medida que maduran el extremo estilar permanecen de color verde. En su interior aparecen semillas abortadas de color oscuro, y los haces vasculares en el eje del fruto son decolorados. Los frutos pierden calidad en cuanto a sabor, contenido de sólidos solubles y acidez. Al final el árbol infectado muere trayendo consigo grandes pérdidas económicas si no se maneja adecuadamente la enfermedad (Bassanezi *et al.*, 2006; Fernández, 2015).

El diagnóstico más certero de la enfermedad se realiza por métodos moleculares como varios formatos de la PCR o técnicas de diagnóstico indirecto, como la presencia de almidones en los tejidos infectados (Luis, 2014). Las estrategias de

manejo del HLB se dificultan considerablemente debido a que no se han encontrado fuentes de resistencia a la enfermedad; su manejo se complica por la presencia del vector y la producción se reduce con el aumento de la severidad de las afectaciones a las plantas. Las principales estrategias que se emplean están encaminadas a programas de certificación, aislamiento geográfico, supresión de plantas enfermas y regulación de los insectos vectores (Bassanezi *et al.*, 2011; González *et al.*, 2017).

No existen medidas de control que sean extrapolables a todas las regiones cítricas y cada región debe asumir según sus características específicas, un plan de medidas que le permitan prolongar la vida productiva de las plantaciones cítricas de forma tal que sea rentable la producción de este cultivo (Aubert, 1990).

Los países de América Latina y el Caribe, colaboran en la implementación de una estrategia regional, con el fin de contribuir a la sostenibilidad de la citricultura en zonas de alta vulnerabilidad. Dado el riesgo que esta epifitía representa, es necesario una defensa coordinada y vigorosa que disminuya su amenaza para la sustentabilidad de la citricultura en los países del área. El HLB se informa en Cuba a finales del año 2006 y desde esa fecha ha representado una seria amenaza, que implica la urgencia en la toma de decisiones para el establecimiento de estrategias de manejo de esta devastadora enfermedad (Luis *et al.*, 2017).

La presencia del Huanglongbing en las plantaciones de cítricos, constituye un reto para la citricultura y aunque de forma general, se ha avanzado en los estudios de esta enfermedad, se conoce muy poco sobre su distribución e impacto sobre los rendimientos y la calidad de los frutos en las condiciones de Cuba.

### **Problema**

¿Cómo influye la enfermedad Huanglongbing (HLB) de los cítricos en los rendimientos y calidad de los frutos en plantaciones de pomelos de la Empresa Agroindustrial Victoria de Girón en Jagüey Grande?

### **Hipótesis**

Si se determina la influencia de la severidad del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en algunos componentes del rendimiento y la calidad de los frutos de pomelos, entonces se podrán determinar las afectaciones que causa esta enfermedad a esta especie en las condiciones de Jagüey Grande.

### **Objetivos**

Objetivo general

Determinar la influencia del Huanglongbing de los cítricos, sobre la producción y calidad de los frutos en plantaciones de pomelos de la Empresa Agroindustrial Victoria de Girón en Jagüey Grande.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la influencia del Huanglongbing (HLB) sobre los rendimientos y crecimiento de las plantas en cultivares de pomelo con diagnóstico positivo.
- Relacionar la severidad de los síntomas de HLB en plantas de pomelo con los rendimientos y la caída de los frutos según el título bacteriano.
- Evaluar el efecto de la enfermedad sobre la calidad de los frutos de pomelo procedentes de plantas establecidas en condiciones de producción.
- Valorar las pérdidas potenciales a causa del Huanglongbing (HLB) por la reducción del rendimiento y la calidad de los frutos en pomelos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Generalidades sobre el Huanglongbing

#### 2.1.1. Antecedentes y distribución mundial de la enfermedad

El Sur de China se ha considerado históricamente como el área de origen de la forma asiática del Huanglongbing (HLB), sin embargo, descripciones realizadas con anterioridad sobre la muerte regresiva aparecida en los cítricos de las provincias centrales de la India indican, que esta enfermedad estuvo presente allí desde mucho antes y su presencia se estima desde el siglo XVIII (Capoor, 1963).

En estas condiciones la muerte regresiva apreciada se atribuyó en primera instancia al virus de la tristeza de los cítricos al realizar algunos estudios de indexing biológico, pero más tarde, Raychaudhuri *et al.* (1969), Raychaudhuri *et al.* (1974) demostraron que el HLB era un componente fundamental del declinamiento observado. En 1919 Reinking citado por Zhao (1981), describió desde finales del siglo XIX los síntomas de una enfermedad que apareció en el Sur de China, que se caracterizaba por el amarillamiento y moteado foliar, llamada por los campesinos con el nombre de “Huanglongbing” de los cítricos. Halbert y Manjunath (2004) indican que se traduce al inglés como “yellow dragon disease” (enfermedad del dragón amarillo) aunque Zhao (1981) y Zhao, (2006) lo llamó en inglés “yellow shoot disease” (enfermedad del brote amarillo), que este es el significado correcto.

Husain y Nath (1927) atribuyeron el declinamiento y muerte de los cítricos en Punjab, la India, a los daños ocasionados por psílicos al alimentarse de la planta, aunque existe la posibilidad de que los daños fueran causados por el HLB. Este informe pudiera ser el primero que involucra un insecto con la enfermedad, y se indica que es muy probable que el HLB se haya establecido en la India antes que en China.

Beattie *et al.* (2006) establecieron la hipótesis de que la enfermedad HLB realmente pudo tener su origen en un asentamiento europeo de la costa oriental de África, en un hospedante asintomático como *Verpris lanceolata* desde donde se transmitió a los cítricos por un insecto, y desde allí hace 300 o 500 años se traslada al

subcontinente en material de propagación infectado, desde donde con posterioridad pasa a la China.

Desde los años 20 se describen en numerosos países de Asia, “nuevas enfermedades de los cítricos”, todas con síntomas similares a los del HLB, por ejemplo, en Filipinas se informó la presencia de una enfermedad llamada moteado amarillo (Lee, 1921), en Taiwán una llamada “Likubin” alrededor de 1930 (Ôtake, 1990), y en Indonesia la degeneración del floema durante los años 40.

En 1929, citricultores sudafricanos informaron de un trastorno similar al HLB (Van der Merwe y Andersen, 1937; Oberholzer *et al.*, 1965). En el noroeste del país lo llamaron “rama amarilla”, mientras que en el Noreste, en un lugar próximo a una estación experimental de cítricos ubicada en Nelspruit, la llamaron “greening” (enverdecimiento) debido a cambios en el desarrollo del color amarillo en el fruto durante la maduración (Van der Merwe y Andersen, 1937).

El término “greening” se generalizó en la literatura científica debido por los científicos de Nelspruit, y no fue hasta 1955 que en el Congreso de la Asociación Internacional de Virólogos de Cítricos (IOCV), celebrado en China, se tomó la decisión de adoptar oficialmente el término original en chino “huanglongbing” (Moreno *et al.*, 1996).

Durante muchos años se consideró que la enfermedad era causada por deficiencias nutricionales, toxicidad, o por inundaciones, y no por un patógeno, sin embargo, investigadores como Lin (1956) y McClean y Oberholzer (1965b) demostraron su transmisión por injerto. Con posterioridad McClean y Oberholzer (1965a) confirmaron que HLB era transmitido por el psílido *Trioza erytreae* Del Guercio.

Experimentos realizados en la India y Filipinas demostraron que otra especie de psílido, *Diaphorina citri* Kuwayama, también era vector de la enfermedad en Asia (Capoor *et al.*, 1967; Martínez y Wallace, 1967). Antes del año 2004, se sabía que el HLB estaba presente en Asia, que había entrado al este de Japón a través del Sur de China, el sureste asiático y que también se encontraba en el subcontinente Indio hasta Pakistán. También existe en la península Arábiga, pero no en Irán. En África,

puede encontrarse en todo el este, la parte central y sur; mientras en esa época en Brasil, sólo se detectó el vector *D. citri* (Halbert y Núñez, 2004).

En el año 2004, el HLB fue detectado en São Paulo, Brasil (Colleta - Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005a); luego en la Florida en el 2005 (Halbert, 2005). Estos hechos evidencian y justifican las preocupaciones sobre las amenazas que enfrentan los cítricos ante la rápida diseminación y agresividad de las enfermedades emergentes que afectan el cultivo.

### **2.1.2. Informe y situación del Huanglongbing en Cuba**

Huanglongbing (HLB) se informó por primera vez en Cuba en el año 2007, cuando se observaron plantaciones de diferentes cultivares de cítricos con los síntomas característicos de la enfermedad a lo largo del país, y la expresión de los síntomas de HLB en las plantas de cítricos infectadas en las condiciones cubanas, se corresponden con los informados en la literatura (Llauger *et al.*, 2008).

Con la técnica de diagnóstico PCR se ha demostrado la presencia de la bacteria *Candidatus* (Ca.) *Liberibacter* (L.) *asiaticus* en las plantas sintomáticas. Se observaron por microscopía electrónica los corpúsculos membranosos típicos en el floema, mientras que las pruebas de ADN y 16S rRNA en adultos de *Diaphorina citri* colectados en las plantas infectadas permitieron identificar la presencia del patógeno *Candidatus* *Liberibacter* *asiaticus* (Llauger *et al.*, 2008; Luis *et al.*, 2017).

Desde que el psillido (*Diaphorina citri* Kuwayama), se detectó en todo el país en 1999 y considerado la situación actual de la enfermedad, se implementó un programa dirigido a la inspección continua de las plantaciones para identificar las plantas infectadas y realizar su erradicación, se potenció el empleo de yemas certificadas y se desarrollan estrategias de manejo y control químico de vectores (Llauger *et al.*, 2008; López *et al.*, 2014; González *et al.*, 2017).

En la actualidad se desarrollan proyectos de la investigación diseñados para la caracterización de la enfermedad en las diferentes áreas geográficas, estudios

epidemiológicos, así como la evaluación de las poblaciones de *D. citri* y la presencia de enemigos naturales para desarrollar el manejo biológico (Llauger *et al.*, 2008).

En el período 2007- 2008 se comprobó la presencia del agente causal del HLB en todas las áreas citrícolas comerciales y zonas urbanas del país, mediante el diagnóstico molecular por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y hasta la fecha, la enfermedad se ha encontrado asociada únicamente a la bacteria *C. Liberibacter asiaticus*. A partir de la detección de HLB se estableció un programa de manejo que incluyó capacitación del personal, siembra de nuevas áreas en bloques aislados de posibles fuentes de inóculo y con material de propagación certificado, inspección y erradicación sistemática de plantas sintomáticas, monitoreo y control químico del vector (López *et al.*, 2014).

## **2.2. Sintomatología del Huanglongbing**

### **2.2.1. Síntomas foliares**

Los síntomas del HLB varían y pueden aparentar otros trastornos; sin embargo, hay algunas características que son únicas (Figura 1). Un árbol que se infecta en el campo suele desarrollar uno o más brotes amarillos, de aquí el nombre de la enfermedad. Si otras partes del árbol permanecen sanas o asintomáticas, la enfermedad asumirá una apariencia sectorizada.

Las hojas afectadas desarrollan un patrón de áreas amarillas y verdes, carentes de límites claros entre estas coloraciones, dando una apariencia “moteada con manchas” (McClellan y Schwarz, 1970; Bassanezi *et al.* 2011). Este moteado suele ser asimétrico en relación al nervio central de la hoja y constituye el síntoma foliar más característico.

Las hojas también pueden manifestarse más gruesas y coriáceas, con nervaduras alargadas y corchosas en su apariencia. En etapas posteriores, pueden aparecer síntomas de deficiencia de zinc, seguidas de la caída de hojas y muerte regresiva de las ramitas finas (Bové, 2006; López *et al.* 2014).



Planta con amarillamiento sectorial  
síntoma del HLB



Planta con defoliación y muerte  
regresiva de las ramas



Moteado asimétrico típico en hojas  
de plantas afectadas



Presencia de venas engrosadas en  
las hojas de la planta

**Figura 1.** Síntomas foliares asociados al Huanglongbing (HLB) utilizados para el diagnóstico visual de las plantas sintomáticas (Gottwald *et al.*, 2007).

Los síntomas del HLB se expresan en distinta forma en las diferentes especies, cultivares y edad de la planta y se pueden confundir con otras enfermedades o deficiencias de elementos nutricionales en el follaje. De acuerdo con Esquivel-Chávez *et al.* (2010), los síntomas más característicos en las hojas incluyen el punteado clorótico, manchas angulares asimétricas, moteado difuso, aclaramiento y engrosamiento de la nervadura central, lo que en su conjunto ocasiona un amarillamiento generalizado del dosel del árbol. Los árboles infectados presentan un color amarillo cuando la enfermedad se encuentra en un nivel avanzado, el tamaño en árboles jóvenes puede ser pequeño hasta su muerte, su forma es irregular, con ramas y hojas enfermas (Fernández, 2015).

### 2.2.2. Síntomas en frutos

En las plantas enfermas se presenta una excesiva caída de frutos. Los frutos con síntomas son pequeños, torcidos y en la medida que maduran el extremo estilar permanece verde, de aquí el nombre de “greening” (enverdecimiento). En el interior de los frutos pueden observarse semillas abortadas de color oscuro, y los haces vasculares en el eje del fruto son decolorados (Figura 2).



Asimetría en la columnela de los frutos



Haces vasculares del pedúnculo color café y semillas abortadas

**Figura 2.** Síntomas en frutos asociados al Huanglongbing (HLB) utilizados para el diagnóstico visual de las plantas sintomáticas (Gottwald *et al.*, 2007).

La fruta, especialmente las naranjas dulces, también pueden tener una apariencia moteada y si la corteza se hunde al presionarla con un dedo, surgirá un área de color plateada (McClellan y Schwarz, 1970). Se ha informado que en plantas de naranjas afectadas por el HLB los frutos y su jugo no logran un sabor agradable por las afectaciones en los compuestos volátiles y aceites de la corteza (Yang *et al.*, 2015).

La expresión de los síntomas depende de las condiciones climáticas, el huésped infectado y la raza de *Candidatus Liberibacter*. Aunque los síntomas son generalmente los mismos, la forma asiática se considera más severa ya que la muerte regresiva puede ser más fuerte, y eventualmente puede provocar la muerte del árbol. Esta es además, tolerante al calor; mientras que la africana no es capaz de resistir temperaturas por encima de los 30°C, por lo que sólo se encuentra infectando

cítricos plantados en elevaciones por encima de los 700 m, mientras que la asiática sobrevive en áreas calientes y bajas (Gottwald *et al.*, 2007).

La forma americana descubierta en Brasil (Teixeira *et al.*, 2005a) es muy similar al tipo asiático en cuanto a expresión de síntomas y severidad; sin embargo, las pruebas demuestran que es intolerante al calor, similar al tipo africano. Estudios en Brasil determinaron bajo diferentes condiciones climáticas, que en los brotes nuevos preferidos por *D. citri* las altas temperaturas afectaron tanto la concentración de la bacteria como su adquisición por el vector causante del HLB. El impacto de las altas temperaturas y su relación con las epidemias se evalúa en relación con la fenología y los niveles poblacionales del vector (López *et al.*, 2015).

### **2.2.3. Síntomas generales en el árbol**

Peña *et al.* (2009) describen los síntomas del HLB en las áreas cítricas cubanas e indican que los más frecuentes en las plantas infectadas fueron moteado asimétrico difuso en hojas (80%), brotes cloróticos (54%), frutos deformados con la columela torcida, semillas abortadas y rojizas, pedúnculo hundido y haces vasculares de color amarillo intenso (50%). En menor frecuencia se observaron deficiencias nutricionales (21%), aspecto disperso de la copa (40%), hojas con nervios engrosados o necróticos (45%) y caída de frutos (45%).

El síntoma característico de moteado asimétrico difuso se observó en todas las especies y variedades analizadas, con mayor frecuencia en los meses de invierno y en muchos casos, en las infecciones iniciales o en el verano solo se observaron síntomas de deficiencias nutricionales y escasos brotes cloróticos en las plantas infectadas. Estos resultados permitieron perfeccionar el sistema de rastreo en el programa de manejo de la enfermedad (Peña *et al.*, 2009).

Achor *et al.* (2010) indican que la acumulación de almidón en las hojas resulta de la imposibilidad de transportar sacarosa y otras azúcares a través de las membranas celulares que resulta de la interrupción del transporte por el floema. Esta acumulación de almidón favorece la desintegración de los cloroplastos y esto

produce la clorosis. La necrosis del floema resulta de las toxinas de las bacterias, como señal de los tapones que se producen en los elementos cribosos y las deficiencias de carbohidratos. Esos tapones son resultado de la acumulación de la bacteria, producción de calosa y la acumulación de gel de proteínas en el floema.

Etxeberria *et al.* (2009) citado por Achor *et al.* (2010) plantean que la gran acumulación de granos de almidón daña el sistema de granos de los cloroplastos resultando en una clorosis localizada, como consecuencia del secuestro del carbono en las hojas, ocurre el deterioro y muerte de las raíces, dando como resultado el declinamiento de los árboles.

La expresión de los síntomas y severidad del HLB en plantas de limón Mexicano, se ha relacionado con el título o concentración de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, por sus afectaciones a la eficiencia del fotosistema II de la fotosíntesis, de los complejos proteínicos involucrados en la transferencia de electrones y en la acumulación de almidón y sacarosa que disminuyen la actividad fotosintética (Soto-Leal, 2013).

En etapas avanzadas de la enfermedad puede observarse defoliación de ramas y hojas, intensa caída de frutos, reducción del tamaño, alteración del color y forma; comprometiendo el rendimiento y la vida útil de las plantas (García *et al.*, 2009). En las regiones cítricas donde esta enfermedad se ha establecido de manera endémica, los árboles se ven afectados disminuyendo su producción, así como la calidad de la fruta, por lo tanto, el cultivo se torna incosteable (Bové, 2010).

Las mayores afectaciones de la enfermedad, considerando los síntomas de caída de frutos, disminución de los rendimientos, baja calidad de los frutos, ramas secas y defoliación, se observaron en plantaciones de pomelos y naranjos. Sin embargo, el limero 'Persa' no se ve tan afectado por la enfermedad, manteniendo sus rendimientos y menor deterioro progresivo del árbol, a pesar de manifestar clara y rápidamente el moteado asimétrico característico de HLB como primer indicativo de infección. Independientemente de la especie o cultivar los síntomas son más

pronunciados en condiciones invernales, tal como han observado otros autores (Bassanezi, 2012; López *et al.*, 2012).

### **2.3. Identificación del patógeno y diagnóstico**

#### **2.3.1. Caracterización del patógeno**

El descubrimiento de que el HLB era transmisible por injerto llevó a la falsa conclusión de que se trataba de un virus. Sin embargo, el descubrimiento por microscopía electrónica de que los organismos similares a los micoplasmas están asociados con enfermedades “amarillas”, inspiró a otros estudios ultramicroscópicos sobre los cítricos afectados por HLB; se reportó que en los elementos cribosos del floema de plantas cítricas infectadas había Mollicutes (MLOs), no así en las plantas sanas (La Flèche y Bové, 1970). Los síntomas del HLB se expresan de distinta forma en las diferentes especies, cultivares y edad de la planta (SAGARPA, 2014).

Al hacer un examen minucioso, estos organismos mostraron tener envolturas más gruesas que los MLOs, lo que indica que son bacterias auténticas (Garnier y Bové, 1993). Todos los esfuerzos por aislar la bacteria en cultivos puros han sido infructuosos (Garnier y Bové, 1993), pero la combinación de microscopía electrónica y tratamientos enzimáticos mostraron que las paredes celulares eran del tipo Gram negativo (Garnier *et al.*, 1984).

Al utilizar cebadores universales, se obtuvieron ADN ribosomal 16S de dos líneas de la bacteria por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y las comparaciones con secuencias del Banco de Genes mostraron que el organismo causal del HLB pertenece a una subdivisión de la clase Protobacteria, pero que es diferente de los otros miembros. Hasta el momento se han identificado tres especies de esta bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* (Garnier *et al.*, 2000); y recientemente en Brasil se caracterizó *Ca. L. americanus* (Teixeira *et al.*, 2005b).

#### **2.3.2. Métodos de diagnóstico de la enfermedad**

El diagnóstico basado en síntomas de campo se fundamenta en la búsqueda de síntomas típicos de la enfermedad. El moteado asimétrico típico observado en hojas,

así como la clorosis similar al patrón de la deficiencia de zinc suelen ser seguidos por un crecimiento retardado, pero estos síntomas no siempre son distintos y/o restringidos a una rama o lado del árbol (Aubert, 1992; Luis, 2014).

Eventualmente, la muerte regresiva de las ramas y el declinamiento general resultante debido a los patógenos, afectan severamente el floema del huésped. Los frutos pequeños, deformados, de mala coloración, también pueden estar presente y monitorearse en árboles enfermos, especialmente en mandarinos (*Citrus reticulata* Blanco) y naranjos (*Citrus sinensis* L. Osb) que son más susceptibles (Zhao, 1981).

La infección por el patógeno del HLB suele expresarse en sectores de árboles infectados, lo que indica una infección sistémica incompleta o tal vez variabilidad del patógeno en los árboles infectados. El lapso de tiempo entre la transmisión del patógeno por vectores psílidos o por la propagación y el comienzo de síntomas visuales puede variar bastante en dependencia del momento del año en que ocurrió la infección, resultante de condiciones ambientales, edad del árbol, especie/cultivar y salud hortícola, entre otros factores (Aubert, 1987 b; Gottwald *et al.*, 1989).

La bacteria no se distribuye en la copa de los árboles de forma uniforme y los síntomas se confunden comúnmente con deficiencias nutricionales y estrés ambiental que contribuyen a las dificultades de identificación de la enfermedad. Estas características hacen que muchos de los síntomas se confundan con los provocados por otros desórdenes bióticos y abióticos, y al identificar visualmente la enfermedad, no es un 100% seguro que la planta se encuentre infectada por la bacteria causante del HLB (Vázquez *et al.*, 2015).

Esto unido al hecho de que la expresión de una enfermedad sea el resultado de la interacción entre el genoma y la edad del hospedante, el patógeno y el medio ambiente, especialmente las condiciones climáticas y estado nutritivo del cultivo, hace que el diagnóstico visual no sea el más aceptado desde el punto de vista de sensibilidad y especificidad (Wulff *et al.*, 2006). No obstante, el moteado asimétrico en hojas y los frutos deformados con coloración verde en el extremo estilar;

constituyen una alternativa para el diagnóstico cuando no se cuenta con los recursos necesarios para el diagnóstico molecular a gran escala (Schwarz, 1968a).

Previo al desarrollo de pruebas moleculares, el diagnóstico del HLB se logró por indexing biológico (Schwarz, 1968a) y cromatografía de capa fina para determinar la presencia de glucósido de gentisoyl - $\beta$ - (Schwarz, 1968b), aunque no todas las especies de cítricos infectadas por HLB lo producían (Schwarz, 1968c). El desarrollo de anticuerpos monoclonales resultó promisorio para hacer un diagnóstico rápido, pero resultó ser poco específico para esta bacteria (Korsten *et al.*, 1993).

El desarrollo de técnicas moleculares de hibridación del ADN (NASH) y (PCR) hicieron posible hacer diagnósticos rápidos, sensibles y específicos para determinar la presencia de HLB en el laboratorio (Teixeira *et al.*, 2005c). El PCR es ahora la principal prueba confirmatoria y se usa rutinariamente en muchas áreas, particularmente en Florida y Brasil. No obstante, a todas sus ventajas, esta constituye una técnica altamente costosa, que eleva considerablemente el costo del manejo de esta enfermedad (Teixeira *et al.*, 2005a).

Durante 11 años de análisis de la enfermedad en Cuba, se han desarrollado las técnicas de diagnóstico molecular para comprobar la presencia de HLB en diferentes especies cítricas. La PCR dúplex con los cebadores GB1/GB3 y rplA2/rplJ5 para el diagnóstico confirmativo simultáneo de las tres especies de *Ca. Liberibacter*, permitió confirmar que la única especie circulante en Cuba es la asiaticus. La secuenciación de un fragmento del operón rplKAJL (#FJ394022) y la comparación con cepas de Brasil y Japón mostró un 100% de identidad nucleotídica (Luis *et al.* 2017).

La PCR anidada con los cebadores fD1 y rP1 para la primera reacción y OI1/OI2c para la segunda reacción permitió obtener resultados más confiables para la certificación del material de propagación en todo el país, en muestras foliares con diferentes síntomas, así como en muestras de adultos y ninfas de *Diaphorina citri*. En el período de 2006-2017 se han analizado un total de 2954 muestras, de las cuales 1797 resultaron positivas para CLas (Luis *et al.* 2017).

## 2.4. Susceptibilidad de cultivares cítricos y hospederos

### 2.4.1. Cultivares más susceptibles

Salcedo *et al.* (2011) plantean que el impacto potencial del HLB depende de la magnitud de superficie sembrada y nivel de los rendimientos. Frente a un impacto bajo del HLB, la pérdida nacional en México, se estimó para el conjunto de cítricos en 1,84 millones de toneladas equivalentes al 25% de su producción. Las mayores pérdidas (33%) corresponden a naranja y toronja seguidas de la mandarina (17%) y finalmente del limón en sus distintas variedades (10%). Ante un impacto moderado, la pérdida sería de 2,35 millones de toneladas (32% de la nacional), donde los mayores impactos serían nuevamente para la naranja y la toronja (42%). Frente a un impacto alto, la pérdida se incrementaría a tres millones de toneladas equivalentes al 41% de la producción del país, donde el mayor impacto sería para la naranja y la toronja con 53%, para la mandarina con 26% y para el limón con 18%.

El HLB en África y la India se reporta con más severidad en mandarinos y naranjos dulces, mientras que los limoneros, limeros, toronjos y pomelos son más tolerantes (Nariani *et al.*, 1973; Manicom y Vuuren, 1990). Sin embargo, otras formas del HLB asiático en Taiwán (Su y Wu, 1979), y la encontrada recientemente en Florida (Sutton *et al.*, 2005) afectan severamente todas las especies comerciales de cítricos, como lo hace el nuevo HLB americano en São Paulo, Brasil (López *et al.*, 2006b).

Es posible que las diferentes formas de *Ca. Liberibacter* puedan adaptarse a las especies y cultivares de cítricos con el tiempo, y pueda explicarse por qué el pomelo se consideró inicialmente resistente en áreas como Taiwán, pero en la actualidad se consideran susceptibles, incluyendo líneas de Florida (Gottwald *et al.*, 2007).

En lima Mexicana del Estado de Colima en México, los árboles con más del 75% de la copa afectada por el HLB, los rendimientos alcanzan entre un 40 and 50% en comparación con los árboles asintomáticos, y a pesar de los bajos rendimientos por el HLB, con la aplicación de estrategias de manejo del cultivo con especial énfasis en la nutrición los árboles afectados continúan produciendo frutos (Robles *et al.*, 2015).

Santos (2013) cita que la presencia del Huanglongbing en los países productores de cítricos provoca pérdidas económicas importantes, y no ha sido posible el uso de injertos al no encontrar patrones resistentes, como se ha hecho con otras enfermedades de gran importancia.

### 2.4.2. Otros hospederos

Todos los cítricos son hospedantes de la bacteria causante del HLB (Gottwald *et al.*, 2007). Algunas plantas relacionadas con los cítricos constituyen hospedantes de HLB; entre ellas, *Verpris lanceolata* (Korsten *et al.*, 1996), *Limonia acidissima* y *Severinia buxifolia* (Hung *et al.*, 2001). *Murraya paniculata* también se ha confirmado que es hospedera de tanto el *Ca. L. americanus* como del *Ca. L. asiaticus* en Brasil (López *et al.*, 2005; López *et al.*, 2006a). Se especula que existe alguna confusión respecto a la distinción taxonómica entre *Murraya paniculata* y *Murraya exotica*, esta última es más susceptible a la infección por HLB y más atractiva a *D. citri* (Beattie *et al.*, 2006).

## 2.5. Vectores, transmisión y epidemiología del Huanglongbing

### 2.5.1. Vectores más eficientes

Durante muchos años se consideró que la enfermedad era causada más por deficiencias, toxicidades, e inundación, que por un patógeno. Husain y Nath (1927) describieron un declinamiento y muerte de los cítricos en Punjab que atribuyeron a daños ocasionados por psílicos al alimentarse de la planta. Vanaclocha y Stansly (2015) destacan a las especies *Diaphorina citri* y *Trioza erytrea* como los vectores más eficientes de *Candidatus Liberibacter* causante del HLB, en las condiciones de Asia y Africa. En Cuba, González *et al.* (2017) indica la presencia de *Diaphorina citri* como el vector más eficiente presente desde 1999 en las plantaciones de cítricos y asociado a la transmisión de la bacteria causante de la enfermedad.

### 2.5.2. Transmisión del patógeno

La transmisión natural de las formas asiáticas y americanas es a través del psílido asiático *D. citri*, mientras que el HLB africano se transmite mediante *T. erytreae*. Las

tolerancias y susceptibilidades a temperaturas de estas dos especies de HLB se asocian naturalmente con *D. citri*, por ejemplo, que es tolerante al calor mientras que *T. erytraeae* es susceptible a las altas temperaturas (Yamamoto *et al.*, 2006).

En condiciones experimentales, ambas especies son capaces de transmitir las formas asiática y africana (Lallemand *et al.*, 1986). Los adultos pueden adquirir y transmitir la bacteria, pero lo que se conoce sobre los tiempos de adquisición varían grandemente desde 15 hasta 30 minutos o 5 horas mínimo para *D. citri* y de 24 horas para *T. erytraeae* (Xu *et al.*, 1988).

El cuarto y quinto instar de las ninfas de *D. citri* pueden adquirir el patógeno que el adulto emergente puede transmitir (Xu *et al.*, 1988) y hay evidencias de que las ninfas de *T. erytraeae* también pueden transmitir la bacteria y que ocurre la transmisión transovarial (Van den Berg *et al.*, 1992). Una vez adquirida, el psílido mantiene la bacteria y la capacidad de transmitirla en todo su ciclo de vida. El HLB también puede transmitirse por *Cuscuta spp.* (Raychaudhuri *et al.*, 1974). Hay otras especies que se han visto en cítricos, pero ninguna ha demostrado ser vector (Da Graça, 1991; Halbert y Manjunath, 2004).

La transmisión natural de las formas asiáticas y americanas es a través del psílido asiático *D. citri*, mientras que el HLB africano se transmite mediante *T. erytraeae*. Las tolerancias y susceptibilidades a temperaturas de estas dos especies de HLB se asocian naturalmente con *D. citri*, por ejemplo, que es tolerante al calor mientras que *T. erytraeae* es susceptible a las altas temperaturas (Yamamoto *et al.*, 2006).

En condiciones experimentales, ambas especies son capaces de transmitir las formas asiática y africana (Lallemand *et al.*, 1986). Los adultos pueden adquirir y transmitir la bacteria, pero lo que se conoce sobre los tiempos de adquisición varían grandemente desde 15 hasta 30 minutos o 5 horas mínimo para *D. citri* y de 24 horas para *T. erytraeae* (Xu *et al.*, 1988).

El cuarto y quinto instar de las ninfas de *D. citri* pueden adquirir el patógeno que el adulto emergente puede transmitir (Xu *et al.*, 1988) y hay evidencias de que las

ninfas de *T. erytrae* también pueden transmitir la bacteria y que ocurre la transmisión transovarial (Van den Berg *et al.*, 1992). Una vez adquirida, el psílido mantiene la bacteria y la capacidad de transmitirla en todo su ciclo de vida. El HLB también puede transmitirse por *Cuscuta spp.* (Raychaudhuri *et al.*, 1974). Hay otras especies que se han visto en cítricos, pero ninguna ha demostrado ser vector (Da Graça, 1991; Halbert y Manjunath, 2004).

Lin (1956) demostró su transmisibilidad por injerto y esto se confirma por otros autores (McClellan y Oberholzer, 1965b), así como por el psílido *Trioza erytrae* Del Guercio (McClellan y Oberholzer, 1965a).

### **2.5.3. Aspectos epidemiológicos**

Las dificultades que afronta el diagnóstico de campo de esta enfermedad hace que al cuantificar visualmente la severidad o expresión de los síntomas en plantas individuales, no sea verdadero indicio de la presencia del patógeno. Adicionalmente, debido a la variación temporal en la expresión de síntomas (que por lo general son más fáciles de ver durante el otoño y el invierno), los árboles infectados al mismo tiempo (especialmente los muy viejos) pueden expresar el comienzo de la infección con gran variabilidad en 1 o más años. Este período amplio y variable de por sí, compromete hasta cierto punto, la exactitud de estudios espaciales y temporales (Gottwald *et al.*, 2007).

La epidemia del HLB puede establecerse introduciendo material vegetal infectado y con la transmisión de insectos vectores. La introducción no intencional de material vegetal infectado hace que la enfermedad se establezca en nuevas áreas y países donde el movimiento no regulado puede causar resultados desastrosos (Chao *et al.*, 1979).

La migración de psílicos parece ser la más alta cuando las plantas hospederas están en brotación y las poblaciones sedentarias que se alimentan del follaje tierno son adultas (Catling, 1969a; Catling, 1969b). Así, la transmisión natural es probablemente más alta a finales de la primavera y tal vez en otros períodos cuando los nuevos

brotos y las poblaciones de psílidos son altas (Aubert, 1987a). Los vectores psílidos también se ven atraídos por las ondas amarillas de la luz y por lo tanto por el follaje que expresa síntomas de HLB (Catling, 1970).

Desde el punto de vista temporal, el aumento relativo del HLB es lento y puede durar varios años, aun cuando las poblaciones del vector son altas y predominan las fuentes de inóculo. Las epidemias relativamente bajas son comunes entre las enfermedades de los cítricos transmitidas por vectores, así como otros patosistemas arbóreos, aunque las poblaciones del vector para algunas enfermedades como el HLB y la tristeza, suelen ser muy altas (Gottwald *et al.*, 2007).

Desde una perspectiva espacial, los resultados de varios análisis realizados hasta la fecha pueden interpretarse de forma combinada para tener una imagen más integral de dos patrones espaciales que existían en las plantaciones con HLB. Estos análisis combinados indican dos mecanismos de diseminación del vector en áreas locales y a más largas distancias (Gottwald *et al.*, 2007).

Dentro de áreas locales, las agregaciones de árboles infectados ocurren y en ocasiones pueden ser bastante grandes, es decir, abarcando hasta 1672 árboles. Esto no significa que cada árbol en estas áreas locales se haya infectado, pero está demostrado que una alta proporción de ellos lo será. Esto se explica a través del cálculo de fortaleza de la agregación asociado con los resultados de la auto correlación espacial que define un foco de infección (Gottwald *et al.*, 2007).

En este caso, los vectores diseminan verdaderamente al patógeno hacia árboles adyacentes muy próximos. La autocorrelación espacial también identifica una prevalencia de grupos espejos o áreas de agregación que son discontinuas en un mismo grupo. Estas se interpretan como indicios de la presencia de focos secundarios. Estos son bastante prevalecientes y están a una distancia de aproximadamente 25-50 m del grupo principal de la enfermedad y entre sí (Gottwald *et al.*, 2007).

Este patrón de focos ampliamente espaciados tal vez indique un mecanismo espacial asociado con el movimiento del vector a distancias más largas. Es decir, cuando los vectores se mueven, ya sean por vía natural en busca de nuevas oportunidades de alimentación o cuando se les molesta, ocasionalmente se mueven a árboles más alejados que los que están próximos y cuando esto ocurre se mueven al menos de 25 a 50 m. La transmisión del vector a escala mayor y regional no se ha investigado. Es evidente que esto probablemente pase, pero se va del alcance de los estudios realizados hasta el momento (Gottwald *et al.*, 2007).

## **2.6. Daños y pérdidas estimadas por el Huanglongbing**

### **2.6.1. Afectaciones al rendimiento y la calidad de los frutos**

El HLB es probablemente, considerada como una de las peores enfermedades que afectan a los cítricos en el mundo debido a la gravedad de los síntomas, y a la rapidez con la que se propaga la enfermedad, y además, porque todas las variedades comerciales son susceptibles. En los países donde la enfermedad es endémica, las plantas de cítricos infectadas disminuyen su producción entre cinco y ocho años después de la plantación y sus frutos dejan de ser aptos para el consumo de los humanos (García *et al.*, 2009).

El HLB se convirtió en un problema serio en China en 1935 (Lin, 1963), mientras que en Filipinas no se informa como un grave problema hasta 1957 (Martínez y Wallace, 1967). En Indonesia, se destruyeron tres millones de árboles entre 1960 y 1970 (Tirtawidjaja, 1980). En la India el HLB se describió en los años 60 como el causante de pérdidas catastróficas (Fraser *et al.*, 1966). El HLB no ha sido reportado en Australia o en la cuenca del Mediterráneo (García *et al.*, 2009).

El HLB ha afectado gravemente la producción de cítricos en diferentes países de Asia, África, Sub continente Indio y en la Península Arábiga, y fue descubierto en el 2004 en Brasil, en Florida en el 2005 y en Cuba en el 2007 (García *et al.*, 2009).

Salcedo *et al.*, (2010) citado por Robles *et al.* (2013) plantean, que en estimaciones sobre el impacto potencial de la enfermedad en los cítricos de México, anticipan que

el HLB puede causar una reducción en el rendimiento del limón mexicano que va de 20 hasta 48% en los primeros tres años, dependiendo del nivel de intensidad del daño.

### **2.6.2. Daños económicos**

El daño debido al HLB es considerable. El árbol enfermo declina, el rendimiento disminuye y se afecta la calidad de la fruta. En la medida que aumenta la severidad de la enfermedad, el rendimiento baja, principalmente por la caída temprana de los frutos en las ramas afectadas. La reducción del rendimiento puede alcanzar entre 30 y 100%, en dependencia de la proporción de afectación de la copa (Schwarz, 1967; Ke *et al.*, 1988; Bassanezi *et al.*, 2006), todo lo cual hace que la plantación sea económicamente irrecuperable a los 7-10 años después de plantada (Aubert, 1990; Gottwald *et al.*, 1991; Roistacher, 1996).

En la medida que aumenta la severidad de la enfermedad, el porcentaje de frutos afectados aumenta y puede alcanzar más del 40% (Catling y Atkinson, 1974; Bassanezi *et al.*, 2006). Los frutos afectados llegan a ser pequeños, son más ligeros, muy ácidos, con un bajo Brix, disminuye el índice de madurez, bajo % de jugo y se reduce los sólidos solubles por caja, que puede afectar la calidad del jugo (Bassanezi *et al.*, 2006).

Debido a estas razones, casi 100 millones de árboles han sido afectados y destruidos en muchos países del Sur y del Sudeste Asiático, Indonesia, Filipinas, la India, la Península Arábiga y Sudáfrica, lo cual compromete la citricultura local (Aubert *et al.*, 1985; Toorawa, 1998). Desde el 2004, más de 500 mil árboles resultaron eliminados oficialmente en Brasil debido al HLB y se estima que otros 300-400 mil adicionales no fueron oficialmente arrancados en plantaciones comerciales (Halbert y Manjunath, 2004).

Es necesario desarrollar más modelos económicos con información más cuantitativa sobre el avance e incidencia de esta enfermedad en las plantaciones, el progreso de su severidad en la copa y las relaciones entre la severidad de la enfermedad y el

rendimiento, para así predecir el efecto de la enfermedad en una situación endémica que permita evaluar el beneficio de las medidas de control en múltiples años (Gottwald *et al.*, 2007).

## **2.7. Estrategias de manejo de la enfermedad**

Actualmente no hay una cura específica para el HLB, sin embargo, estudios recientes señalan que tres acciones complementarias podrían reducir la carga de inóculo y dispersión del HLB. Bové, (2012); Bassanezi *et al.*, (2013) y Mora *et al.*, (2013) destacan las siguientes medidas:

- 1) Erradicación de plantas con HLB.
- 2) Uso de planta certificada para renovación de cultivo.
- 3) Control regional de *Diaphorina citri*. Esta última medida es la de mayor utilidad en regiones donde la enfermedad es endémica.

### **2.7.1. Cuarentena y certificación**

A finales de los años 80 y hasta principios de los 90, el Programa de Desarrollo de Naciones Unidas y la, FAO hicieron un proyecto de rehabilitación citrícola para el Sudeste asiático, cuyo principal objetivo era lograr un mayor conocimiento del HLB y desarrollar estrategias prácticas para su control. El mayor aporte de este programa consistió en la compilación de una estrategia general para el manejo de la enfermedad basada en muchos años de experiencia (Aubert, 1990).

Las medidas cuarentenarias limitan la entrada y el movimiento de la enfermedad a través de material vegetal al país e incluso, a regiones donde las plantaciones se encuentren libres de la enfermedad. De ahí la importancia de su estricto cumplimiento (Bové, 2006).

La certificación del material de propagación como estrategia de manejo del HLB ha surtido un efecto considerable en la industria citrícola de São Paulo, Brasil. Esta era tal vez la mejor equilibrada cuando descubrió el HLB; y ello se debió al aislamiento de las fuentes de material vegetal y el cambio de las prácticas de producción en

viveros como necesidad ante la presencia de enfermedades exóticas en ese país como la clorosis variegada, el cáncer, la tristeza, la leprosis, la mancha negra, entre otros (Da Graça y Korsten, 2004).

Esta estrategia consiste básicamente en el aislamiento del material de propagación, la producción de posturas en casas con malla antiáfidos a prueba de insectos y en un programa de certificación de enfermedades en el vivero, para lo cual se debe contar con Sistemas de Diagnóstico que permitan detectar la presencia de patógenos con una sensibilidad y especificidad adecuada (Da Graça y Korsten, 2004).

### **2.7.2. Manejo de insectos vectores y control químico**

El hecho de la transmisión persistente de *Candidatus Liberibacter* sp., mediante psílicos vectores dificulta considerablemente el manejo de la enfermedad, de ahí que la lucha por disminuir las poblaciones de vectores se recomienda como una de las principales formas de manejo de la enfermedad, acompañado de los programas de cuarentena y certificación (López *et al.*, 2006b).

La incidencia de infecciones con HLB en una región, afecta grandemente la probabilidad y eficacia de aminorar la epidemia. En un área se puede llevar un estricto programa de regulación del vector y supresión de árboles infectados, pero si las plantaciones circundantes no son manejadas con rigor o un gran número de árboles infectados en zonas residenciales permanece en el área, la plantación puede hasta desaparecer con infecciones primarias de árboles infectados presentes alrededor y con altas poblaciones del vector (Gottwald *et al.*, 2007).

Tal vez, la estrategia de lucha más fácil del HLB sea la química dirigida a su psílico vector. Toda la producción comercial de cítricos tiene acceso a compañías que se encargan de asistir con la maquinaria la atención de las plantaciones y hacer aspersiones contra psílicos, sin embargo, la necesidad de aplicaciones adicionales es costosa y depende de la economía de productores individuales. Aunque hay mucha información sobre el efecto del control químico de varios insecticidas y programas sobre vectores psílicos, el efecto de esta práctica sobre el incremento y

diseminación del HLB sigue siendo grandemente anecdótica e indocumentada. Un desafío aún mayor es la gran población de HLB positiva en cítricos de zonas residenciales donde no es posible el control químico (Bové, 2006).

### **2.7.3. Empleo de controles biológicos**

Se conoce que las ninfas de ambas especies de psílicos son parasitadas por ectoparásitos himenópteros, tales como *Tamarixia dryi* Waterston y *T. radiatus* Waterston. Estos parásitos fueron utilizados para controlar biológicamente poblaciones del vector en las Islas Reunión y otros lugares (Etienne y Aubert, 1980; Aubert y Quilici, 1984; Chiu *et al.*, 1988). En el caso de las Islas Reunión se cree que los parásitos redujeron significativamente las poblaciones de psílicos y disminuyeron el daño del HLB. Sin embargo, en otras regiones donde se ha introducido el control biológico, el éxito ha sido limitado (Chiu *et al.*, 1988).

Estos resultados limitados respecto al control biológico del psílido, se debe probablemente a la presencia de poblaciones nativas de hiperparásitos que atacan a los ectoparásitos himenópteros. Aparentemente estos hiperparásitos no están presentes en las Islas Reunión y por tanto el control biológico fue más efectivo (Gottwald *et al.*, 2007).

Lamentablemente, el uso de insecticidas para reducir los vectores psílicos del HLB tiene también un fuerte efecto nocivo en las poblaciones de biocontroles ectoparásitos. Lo que aún no queda claro es la población de psílicos que debe controlarse para lograr un buen efecto en la tasa de incremento y diseminación del HLB. Los controles biológicos son un tema de discusión para su aplicación en el hemisferio occidental. Las observaciones de campo hechas en Florida donde se introdujo *T. radiatus* indican que el efecto del control biológico puede oscilar desde 4 hasta el 70% de reducción en las poblaciones de psílicos (Gottwald *et al.*, 2007).

La estrategia es intercalar cítricos con guayaba como vía de disminuir las poblaciones de vectores se evalúa actualmente. Resultados preliminares sugieren que la guayaba, aparentemente inhibe el psílido vector. Esta inhibición pudiera ser

por vía directa atrayendo el vector a la guayaba y matándola cuando se alimente presumiblemente de alguna toxina o indirectamente rechazando o confundiendo al vector por algún compuesto volátil liberado. El efecto exacto se desconoce, pero los datos preliminares son alentadores (Beattie *et al.*, 2006).

En Cuba, se identificaron como enemigos naturales de *D. citri* a los depredadores *Cycloneda sanguinea* (L.), *Chilocorus cacti* (L.), *Exochomus cubensis* Dimn y *Scymnus distinctus* Casey (Coleoptera: Coccinellidae); *Chrysopa* sp. (Neuroptera: Chrysopidae), *Ocyptamus* sp. (Diptera: Syrphidae) (González *et al.*, 2010), el parasitoide *Tamarixia radiata* (González *et al.*, 2000) y el hongo entomopatógeno *Hirsutella citriformis* (Cabrera *et al.*, 2004). Durante los estudios en las áreas citrícolas se detectó además al depredador *Brachyacantha bistrispustulata* Fabric (Coleoptera: Coccinellidae) controlando a este vector (Hernández *et al.*, 2013).

#### **2.7.4. Eliminación de árboles enfermos**

La eficacia de la supresión de los árboles enfermos como opción para el manejo del HLB está directamente relacionada con la latencia de la infección. La primera ocurrencia de síntomas visuales puede ser dramática en algunos árboles y sutiles en otros. Se recomienda generalmente que los árboles enfermos deben eliminarse reconociendo que los asintomáticos múltiples, pero potencialmente infectados, o aquellos con síntomas subclínicos, probablemente existan en una zona vecina. Se desconoce cuánto inóculo existe de estos árboles infectados en una primera etapa, tanto asintomáticos como con síntomas limitados que contribuyen a la dispersión. En dependencia de la diligencia y velocidad con que se eliminen los árboles tras descubrirlos, la infección de esta primera etapa pudiera contribuir a más o menos inóculo de la epidemia (Gottwald *et al.*, 2007).

Muchos árboles subclínicos también pudieran estar presentes en un área alrededor de los árboles infectados. Su eliminación puede ser más eficaz si se toma en cuenta esta porción subclínica de la población de árboles infectados y se desarrolla un umbral de tolerancia aceptado más allá del cual, lotes enteros deberían eliminarse, debido a la estimación de una infección superior a la aparente (Gottwald *et al.*, 2007).

Márquez (2016) indica que la erradicación de plantas enfermas individuales se justifica en la fase inicial de la epidemia y antes del inicio de la formación de agregados. Sin embargo, dependiendo de la intensidad de agregación, los procedimientos de erradicación a nivel de parcela, deben variar en intensidad y frecuencia. En la República Dominicana, Mella (2017) señala que se han erradicado más de 40,000 árboles y la dispersión sigue en aumento, al no tener establecidas estrategias adecuadas de manejo de la enfermedad y su vector.

### **2.7.5. Manejo fitotécnico de la plantación**

El empleo de altas densidades de plantación, así como los sistemas de plantaciones a corto plazo pudieran tener su mérito como estrategia de manejo del HLB, para maximizar una producción temprana con el consiguiente retorno económico, antes de la desaparición prematura de una plantación por esta enfermedad. Todas estas recomendaciones necesitan de tiempo, coordinación entre los distintos segmentos de la industria y financiamiento (Gottwald *et al.*, 2007).

En México se recomiendan realizar labores de manejo agronómico como: irrigación y nutrición con la finalidad de prolongar la vida productiva de los árboles infectados y mantener esta estratégica actividad económica (Manzanilla *et al.*, 2012; Flores *et al.*, 2015). La aplicación de fertilizantes minerales, contribuye a reducir los efectos del HLB y prolongar la salud del árbol.

Zhang *et al.* (2016) indican que el progreso del HLB causa una reducción significativa en las concentraciones de Zn, Fe y Mn en las hojas de plantas afectadas por la enfermedad. Sin embargo, la aplicación de zinc no solo incrementa los niveles de zinc sino también los de Mn y de Fe en las hojas. Aunque los síntomas de HLB se mantienen visibles a pesar de estos cambios en los niveles de nutrientes en plantas tratadas (Spann, 2012).

Cao, *et al.* (2015) han planteado que en plantas afectadas por HLB la influencia del patógeno sobre la nutrición no es bien conocida. El patógeno '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' crece especialmente en el floema de los hospederos, puede

causar problemas en el sistema vascular después de la infección, y gran desorden en el transporte de nutrientes por el floema en plantas afectadas.

En investigaciones del efecto de la infección por el 'Ca. L. asiaticus' en las concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) y su absorción en diferentes especies de cítricos como mandarinas y limoneros, indicaron que la infección tiene diferentes impactos en la absorción de nutrientes. La eficiencia en la absorción de P se reduce sostenidamente en mandarinas infectadas en verano, lo que puede causar un marcado descenso en el rendimiento promedio de frutos, mientras que en limonero fue más eficiente la absorción del P en plantas enfermas que en las sanas. Mantener un ciclo nutritivo interno eficiente puede ser una estrategia de las especies de cítricos tolerantes al HLB (Cao *et al.*, 2015).

Las observaciones fisiológicas y datos de campo sugieren que la deficiencia de fósforo está relacionada con la sintomatología del HLB. Zhao *et al.* (2013) indica que la aplicación de soluciones de fósforo en plantas de naranjo dulce positivas al HLB, redujo los síntomas severos e incremento significativamente la producción durante los tres años de aplicación en La Florida.

Fernández (2015) señala que la aplicación de los fertilizantes convencionales con micronutrientes solos o en combinación con Silicio, como inductor de resistencia, en árboles de Limón Persa y lima mejicana, disminuyeron la expresión de síntomas de HLB, aumentaron el rendimiento en la cosecha de ambas especies hasta en un 100% y la calidad de la fruta para la exportación de manera significativa. Se pudo concluir que el uso de silicio redujo la severidad del HLB y retrasó el desarrollo de la enfermedad, incrementando el tamaño del floema y favoreciendo una mejor asimilación de nutrientes por parte de la planta.

Se ha comprobado que la termoterapia como tratamiento alternativo ha reducido de forma significativa la concentración de la bacteria, o la ha eliminado de las plantas afectadas, cuando se expusieron de forma continua a altas temperaturas (40-42 °C) por 48 horas como mínimo. En plantas comerciales de cítricos tratadas con calor, muchos de los árboles han logrado brotaciones abundantes y un crecimiento

vigoroso por dos o tres años después del tratamiento, lo que indica que la termoterapia solar puede ser un componente efectivo de la estrategia de control integrado para el manejo del HLB en los cítricos (Doud *et al.*, 2017).

#### **2.7.6. Aplicación de antibióticos e inductores de resistencia**

Con el hallazgo de que el HLB se asocia a la presencia de organismos procarióticos, se hicieron esfuerzos por controlar la enfermedad inyectando antibióticos a los árboles enfermos (Moll y van Vuuren, 1977; Aubert y Bové, 1980). Con estos ensayos sólo se lograron éxitos parciales, por lo que se abandonó su uso (Buitendag y von Broembsen, 2003).

Canales *et al.* (2016) mostraron que los Brasinoesteroides, por ser compuestos esenciales para el crecimiento de las plantas y el desarrollo de tolerancia al estrés, tienen potencialidades como parte de la estrategia de manejo del HLB. Aplicaciones foliares de epibrasinolide en plantas de cítricos infectadas con el agente causal de la enfermedad, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' mostraron que, tanto en invernadero como en condiciones de campo, los títulos de la bacteria se redujeron después del tratamiento con la expresión de genes en las hojas asociados a la respuesta de defensa de la planta a la presencia de la bacteria.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación del trabajo de investigación**

El trabajo se desarrolló en la Empresa Agroindustrial “Victoria de Girón”, municipio Jagüey Grande, provincia de Matanzas, que se localiza entre los 22°41'55,73N - 22°30'46,77 de latitud norte y los 80°42'53,61W - 81°51'23,44 de longitud oeste, a una altitud entre los 3 y 25 msnm. Esta región se ubica en el grupo II a según la clasificación edafoclimática de las áreas citrícolas de Cuba (Lima *et al.*, 1988).

Según la información meteorológica histórica para una serie de 23 años (1981-2016) en el mes de enero se presentó la temperatura media mensual más baja (14,4 °C) y la más cálida (33,4 °C) en el mes de julio. Los meses más secos se encuentran entre diciembre-febrero, y los más lluviosos entre mayo-octubre. La precipitación media anual es de 1 494 mm, la humedad relativa media de 80% y la duración media de la luz solar es de 7,6 horas/día (Aranguren, 2009).

Los suelos son del tipo Ferralítico Rojo Típico con rocosidad y profundidad entre mediana y alta, según la nueva clasificación genética de los suelos de Cuba (Hernández *et al.*, 1999) y catalogados como Ferralsol Rhodic en correlación con el “World Reference Base” (Hernández *et al.*, 2004).

#### **3.2. Características generales de las plantaciones**

La empresa está conformada por cinco granjas que se encuentran distribuidas en un área mayor a los 500 km<sup>2</sup>. Cada granja está dividida en lotes de 578,49 ha (lote típico) que se divide en cuatro cuadrantes de 144,65 ha (I, II, III, IV) y estos en cuatro bandas de 36,16 ha (A, B, C, D) formadas por seis campos de 6,02 ha donde se ubican las plantas en surcos orientados de norte a sur.

Como material vegetal, en el estudio se incluyeron plantaciones de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) cvs. 'Marsh', 'Ruby Red', 'Río Red' y 'Star Ruby', de edades entre cinco y 42 años, injertados sobre los patrones naranjo 'Agrio' (*Citrus aurantium* L.) y limón (*Citrus volkameriana* Pash). Las distancias de plantación, distribución de

cultivares por rango de edades de la empresa, se obtuvieron del Inventario Oficial de Cítricos de la EAVG para el 2017.

El manejo agronómico de las plantaciones se realizó según el Esquema Tecnológico diseñado en la Empresa Citrícola “Victoria de Girón” a partir del año 2000-2017, con las adecuaciones a la tecnología de acuerdo con las características de cada campaña, y se incluyen las nuevas estrategias para el manejo del HLB y su vector en la empresa. Se realizaron la fertilización y riego (fertirriego por sistemas localizados en los fomentos y aspersión en producción), la poda, control de arvenses y de plagas y enfermedades, de acuerdo con la tecnología diferenciada para plantaciones destinadas a la cosecha de frutos frescos o con destino a la industria, según la edad de las plantaciones de fomento o de producción.

### **3.3. Influencia del Huanglongbing en el rendimiento y crecimiento en pomelos**

#### **3.3.1. Evolución de los rendimientos en una plantación de pomelo con HLB**

Para determinar la tendencia de producción en una plantación de fomento del cultivar de pomelo ‘Río Red’ establecida en el año 2005 (Lote T-05) y con diagnóstico visual y por PCR positivo al HLB en el 2007, año en que se informó la presencia de la enfermedad en la empresa, se utilizaron los datos de rendimiento estimados ( $t \cdot ha^{-1}$ ) históricos, registrados para esa plantación desde su entrada en producción en la campaña 2007-2008 con tres años de edad, hasta que fue demolida en el 2015.

#### **3.3.2. Crecimiento de las plantas en tres cultivares de pomelo con HLB**

Durante septiembre del año 2017 se evaluaron plantas de nueve años de edad de los cultivares de pomelo ‘Marsh Jibarito’, ‘Ruby Red’ y ‘Star Ruby’, ubicadas en la misma banda y en bloques alternos en el Lote T-32-4-A, con siembra en el año 2008, injertadas sobre patrón mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* or ex Tan.) y plantadas a distancia de 8 x 2.5m. Se seleccionaron 10 plantas de cada cultivar y se realizaron mediciones a la planta, del perímetro del injerto y el patrón (cm), altura (m), diámetro de la copa (m) y volumen de la copa ( $m^3$ ) con la fórmula propuesta por Rodríguez (1991):  $V_c = 0.5236 \times H \times D^2$ , donde H es la altura del árbol y D el diámetro de la

copa, así como la estimación del área foliar ( $\text{cm}^2$ ) por mediciones del largo y ancho de cinco hojas por planta. Se realizó la evaluación de la incidencia y severidad del HLB y otras enfermedades asociadas que causan el deterioro de las plantas.

Dónde: Incidencia = (plantas con síntomas / total de plantas evaluadas) x 100.

Severidad =  $\sum$  [(grado de la escala x total de plantas en ese grado) / (número total de muestras x grado máximo de la escala)] x 100.

Para los análisis del grado de severidad de los síntomas, se utilizó una escala arbitraria de cuatro grados, donde: 0 (sin síntomas), 1 (daño leve) 2 (daño medio), 3 (daño intenso). En la figura 3 se muestran fotos que ilustran los grados de severidad.



**Figura 3.** Categorías arbitrarias de clasificación de las plantas por grados de severidad de los síntomas de Huanglongbing para las evaluaciones.

Se formaron 10 repeticiones por cultivar para el análisis de comparación en las diferentes variables analizadas.

Para establecer la pérdida del potencial productivo de estos cultivares de pomelo por la presencia del HLB en las plantaciones, se compararon los datos de crecimiento y producción de los diferentes cultivares con los registrados en la década del 80-90 como resultado de investigaciones de cultivares y patrones, que dieron lugar a su generalización (Bello *et al.* 1997 y Bello 1985).

### **3.4. Influencia del Huanglongbing en la producción y caída de frutos**

#### **3.4.1. Relación del número de frutos con la severidad de los síntomas**

Para este análisis se utilizaron los datos del número de frutos por plantas obtenidos de muestreos realizados a las plantaciones de pomelo evaluadas para los estimados de producción. Se muestrearon en total 973 plantas de pomelo al azar en las diferentes unidades productivas de la empresa, donde se contabilizaron los frutos en la planta y se realizó el muestreo visual del nivel de severidad de la enfermedad (HLB), de acuerdo con la escala arbitraria de cuatro grados (0 al 3), referida con anterioridad según el estado de los síntomas de HLB encontrados.

Se determinó el número promedio de frutos por planta para cada grado de severidad según el cultivar y se establecieron relaciones de regresión entre las variables número de frutos (dependiente) y severidad de la enfermedad (variable independiente), se utilizaron ajustes a ecuaciones de regresión lineales y no-lineales, para cada categoría de las plantaciones (fomento y producción) evaluados. Se seleccionó la ecuación de mejor ajuste según los coeficientes de regresión  $R^2$ .

#### **3.4.2. Relación del número de frutos con el título bacteriano en la planta**

La relación de la producción en número de frutos por planta con el título bacteriano en el árbol, se determinó durante el 2016 en una plantación de pomelo 'Marsh Jibarito' (*Citrus paradisi* Macf.) de tres años de edad, injertada sobre el patrón Citrange 'Carrizo' (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) y plantada a distancia de 6,0 x 3,0 m., orientadas en filas de norte-sur en lote 2-TA02-1B. En 15 plantas con síntomas de HLB en los diferentes grados de severidad según aspecto visual de las plantas y 15 plantas asintomáticas, donde se colectaron un total de 10

hojas en cinco posiciones alrededor de la copa de las plantas incluyendo hojas con síntoma típico de moteado asimétrico característico del HLB.

Las hojas se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido para su procesamiento en el laboratorio, donde se determinaron los títulos de la bacteria 'Ca. L. asiaticus' en las muestras con la técnica de qPCR y primers específicos para su identificación; se realizó además la extracción de DNA y cuantificación de 'Ca. L. asiaticus' por PCR en tiempo real, según la metodología descrita por Canales *et al.*, (2016).

Se estableció la relación de los títulos bacterianos cuantificados con el número de frutos en las plantas, con el ajuste de los datos entre estas variables a modelos no lineales de regresión que mejor describieron la relación entre estas variables.

### **3.4.3. Cambios en la dinámica de abscisión de frutos asociada al HLB**

Para evaluar la dinámica de caídas de los frutos de pomelos durante su etapa de maduración y cosecha (agosto-diciembre), antes y después de la presencia del HLB en las plantaciones en las condiciones de Jagüey Grande, se utilizaron datos históricos de caídas de frutos en esta región, registrados por el grupo de cosecha de la empresa y obtenidos de las evaluaciones de caídas de frutos que se realizan quincenalmente para ajustar los estimados de producción en demostrativas, en los períodos 1985-1988 (antes del HLB) y con posterioridad a su aparición (2008-2016).

El conteo de frutos se realizó en 10 plantas por campo en dos lotes de cada una de las cinco granjas de la empresa, donde se contabilizaron los frutos caídos bajo la copa y la producción de frutos cuajados al inicio de los conteos. Se realizó una suma acumulativa por meses de los frutos que se caen al suelo y se expresa el porcentaje de caídas con respecto al muestreo inicial. Se confeccionaron las curvas de caídas de frutos para cada etapa analizada y se determinó la desviación estándar con respecto a la media para cada mes durante la cosecha.

Se estableció la relación de los títulos bacterianos cuantificados con las caídas de frutos en las plantas, y se compararon por ANOVA simple las diferencias entre las caídas de frutos según el título bacteriano medio en cada caso.

### **3.5. Efectos del Huanglongbing en la calidad de los frutos**

#### **3.5.1. Comparación de la calidad en frutos con síntomas y asintomáticos**

Para este estudio en plantaciones con plantas que tenían síntomas visuales del HLB (moteado asimétrico de las hojas) se recogieron muestras de frutos con síntomas de columnela desviada asociados al HLB y sin presencia de este síntoma. En el mes de agosto del 2016 se muestrearon 50 frutos (cinco repeticiones de 10 frutos) de pomelo 'Ruby Red' y en el mes de septiembre 2017 un total de 70 frutos (siete repeticiones de 10 frutos) de pomelo 'Marsh'.

Los frutos se cosecharon se clasificaron por sintomatología visual típica del HLB y se trasladaron al laboratorio de la UEB Beneficio, ubicada en Jagüey Grande, donde se procedió a la determinación de las siguientes variables físico-químicas de calidad: masa unitaria del fruto (g), diámetro ecuatorial y en altura del fruto (mm), relación D/A (diámetro/altura), grosor de la corteza (mm), contenido de jugo (%), sólidos solubles (°Brix), acidez titulable (%) e índice de madurez (SST/acidez), por los métodos de ensayo vigentes (NC 77-11:1981; NC-ISO IDT 2173:2001; NC-ISO IDT 750:2001).

Se estimaron además el rendimiento en jugo (kg jugo/t fruta), el rendimiento en sólidos (kg sólidos /t fruta) y el índice tecnológico teórico (t frutas frescas /t jugo concentrado congelado). Estos indicadores de eficiencia industrial potenciales se calcularon de acuerdo con las indicaciones de Castro-López (2004).

Donde:

Rendimiento en jugo (RJ) = % jugo x 10.

Rendimiento en sólidos (RS) = (°Brix x % jugo)/ 100.

Índice tecnológico teórico (RP) = 58° / RS para pomelos.

Se realizó un análisis de comparación de medias por la prueba t y se determinó la desviación estándar con respecto a la media para cada variable analizada entre los frutos sintomáticos y asintomáticos al HLB.

### **3.5.2. Proporción de los cambios en la calidad del fruto asociados al HLB**

La estimación del aumento o disminución relativa en cada variable de calidad por efecto del HLB sobre los frutos en los dos cultivares de pomelo analizados, se determinó según Bassanezi *et al.* (2009), quienes indican que los cambios en la calidad de los frutos asociados al HLB entre frutas sintomáticas con relación a las que no presentaron síntomas, se calcula por la ecuación:  $D = (FS - FN) / FN * 100$ .

Dónde: FS (valor de la variable de calidad de la fruta sintomática), FN (valor de la variable de calidad en la fruta asintomática). Los cambios en la calidad se expresan en porcentaje de incremento (+) o reducción (-) para cada variable analizada.

### **3.6. Valoración de las pérdidas potenciales por HLB**

Para el análisis económico de las pérdidas estimadas por el impacto del HLB sobre la producción y la calidad de los frutos de pomelos en la empresa, se tuvieron en cuenta las pérdidas históricas estimadas por goteo y peso de los frutos, en la campaña 2000/2001 donde no existía la incidencia del HLB y las ocurridas durante la campaña 2016/2017 con presencia de la enfermedad en las plantaciones. Las pérdidas fueron calculadas partiendo del estimado potencial de todas las plantaciones de toronja en comparación con el real cosechado. Se determinó la diferencia como indicador de las afectaciones estimadas a la producción.

### **3.7. Programa estadístico utilizado**

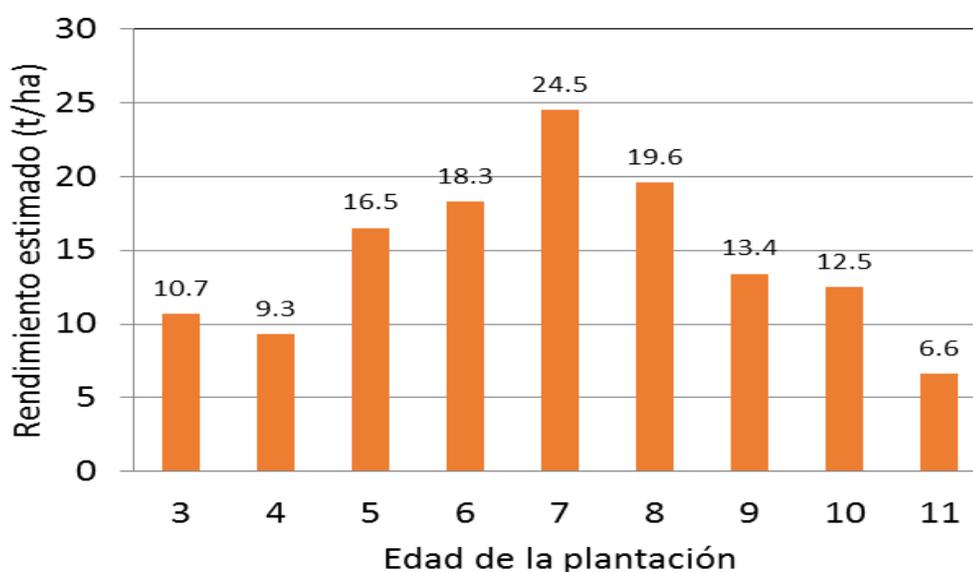
Los análisis estadísticos indicados en cada acápite se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 6.0, StatSoft, Inc, 2003). Se comprobó la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianza cuando fue necesario para el análisis.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Influencia del Huanglongbing en el rendimiento y crecimiento en pomelos

#### 4.1.1. Evolución de los rendimientos en una plantación de pomelo con HLB

En la figura 4 se muestra la tendencia estimada de la producción histórica registrada en una plantación de pomelo 'Río Red', desde su entrada en producción hasta que fue demolida por hacerse improductiva como resultado de su deterioro por el alto grado de incidencia y severidad del Huanglongbing. Estos datos históricos de rendimiento en esta plantación de pomelo, indican la evolución de los rendimientos de plantas infectadas por HLB desde su etapa de fomento.



**Figura 4.** Tendencia del rendimiento estimado en una plantación de pomelo 'Río Red' con diagnóstico positivo de HLB desde su etapa de fomento.

La plantación con fecha de siembra en el 2005 fue diagnosticada como positiva al HLB en el año 2007 a los tres años de edad, cuando se informa la enfermedad en Cuba. En ese momento alcanzó un rendimiento de 10.7 t/ha que se incrementó por encima de 16 t/ha, al quinto año de plantada, con rendimientos máximos estimados de 18-24 t/ha entre el sexto y séptimo año de edad. Después de esta etapa el rendimiento, bajó de forma importante de 13.4 a 6.6 t/ha entre el noveno y 11 años

de edad de la plantación; se observó un deterioro importante en las plantas que llevó a la decisión de su demolición después de esta edad, que de muy productiva y con excelente calidad y tamaño de sus frutos se volvió improductiva e incosteable.

Gottwald *et al.* (2007) plantean que la reducción del rendimiento puede estar entre un 30 y 100%, de la producción potencial en dependencia de la proporción de la copa afectada, lo cual hace que la plantación sea económicamente irrecuperable entre los siete y 10 años después de ser infestada, lo que coincide con las observaciones del área analizada para este trabajo. La especie *Candidatus Liberibacter asiaticus* provoca primero la muerte productiva de los árboles y más tarde su muerte biológica, lo que se apreció en las observaciones a esta plantación de pomelo.

En este estudio de caso, se pone de manifiesto la relación de la enfermedad con la disminución de los rendimientos, en función de las afectaciones causada por el HLB a las plantas. Esta observación sugiere que la enfermedad deteriora la fisiología reproductiva de los árboles cítricos, con afectaciones en componentes del rendimiento como el desarrollo de los frutos, número en el árbol y caídas, que pueden ocurrir durante la maduración. Diversos autores como Roistacher (1996), Bassanezi *et al.* (2006) y Hall (2014), refieren que los árboles enfermos declinan y su rendimiento disminuye con el aumento de la severidad de la enfermedad, principalmente por la caída temprana de los frutos en las ramas afectadas.

### **4.1.2. Crecimiento y producción en tres cultivares de pomelo con HLB**

El aumento de la proporción de plantaciones de pomelos en la Empresa Agroindustrial Victoria de Girón como parte de la composición de cultivares, ha generado dudas acerca de cuál de los diferentes cultivares de pomelo se comporta mejor ante la incidencia del HLB en las condiciones de Jagüey Grande. En la tabla 1 se muestra una comparación de las variables de crecimiento, y producción de frutos entre de pomelo 'Marsh', 'Ruby Red' y 'Star Ruby'.

Con respecto al crecimiento del patrón en las plantas de estos cultivares de pomelo con una fuerte presión de inóculo de la enfermedad HLB, se encontró que el

crecimiento del patrón mandarino Cleopatra resultó similar en los tres cultivares a los nueve años de plantados, mientras que el perímetro del injerto es mayor en los cultivares ‘Ruby Red’ y ‘Star Ruby’ con respecto al ‘Marsh’; estas diferencias pueden asociarse a las características típicas de cada cultivar o estar relacionadas a un mayor deterioro evidente en la morfología de los árboles en el pomelo ‘Marsh’.

**Tabla 1.** Crecimiento y producción en tres cultivares de pomelo afectados por HLB en Jagüey Grande (Evaluación año 2017 a los nueve años de edad).

Cultivar	P.patrón (cm)	P.injerto (cm)	Altura planta (m)	Diámetro copa (m)	Vol. copa (m <sup>3</sup> )	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Número frutos
‘Marsh Jibarito’	37.8	37.4 b	2.6 c	2.7 b	6.7 b	13.6 b	36 b
‘Ruby Red’	43.5	44.7 a	3.4 a	3.2 a	14.2 a	20.3 a	94 a
‘Star Ruby’	42.4	46.1 a	3.0 b	3.1 a	12.1 a	21.3 a	108 a
E.Sx	0.045ns	0.097*	0.33*	0.24*	0.291	0.012*	0.22*
CV (%)	10.21	13.28	14.34	11.11	9.52	10.21	16.14

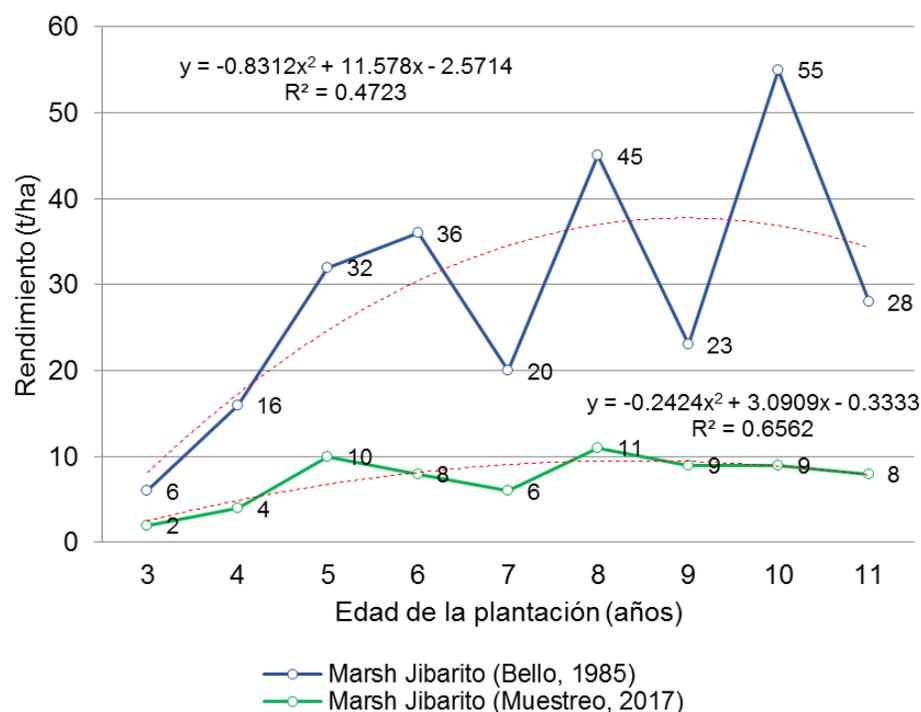
La mayor altura de las plantas se encontró en pomelo ‘Ruby Red’, mientras que en el ‘Star Ruby’ mostraron un crecimiento intermedio y en el ‘Marsh’ fueron más pequeñas; se aprecia que, para el diámetro, volumen de la copa, área foliar y número de frutos por planta, el pomelo ‘Marsh’ mostró el menor crecimiento y producción de frutos. Al comparar el crecimiento de plantas de pomelo ‘Marsh’ sobre el patrón mandarino ‘Cleopatra’ en estas condiciones con los resultados de crecimiento y producción referidos por Bello (1991) en la década de los 90, cuando se generalizó este cultivar, se observan diferencias evidentes en su comportamiento (Tabla 2), en todas las variables.

**Tabla 2.** Crecimiento de las plantas de pomelo ‘Marsh’ en Jagüey Grande a nueve años de plantados en diferentes etapas antes y después del HLB.

Fuente de datos	Altura de planta (m)	Diámetro copa (m)	Perímetro tronco (cm)	Volumen copa (m <sup>2</sup> )
Según Bello (1985)	4.6	5.5	76.4	73.8
Muestreo empresa (2017)	2.6	2.7	37.8	6.7

De estas observaciones se puede inferir que el deterioro de las plantaciones del pomelo ‘Marsh’ en la actualidad es superior a la de otros cultivares causado por el HLB, aunque otros factores pueden estar incidiendo en este comportamiento.

En la figura 5 se muestra la tendencia de los rendimientos entre los tres y 11 años de edad del cultivar ‘Marsh’ en plantaciones durante la etapa de investigación hasta 1985 y en áreas en producción de la empresa en el año 2017.

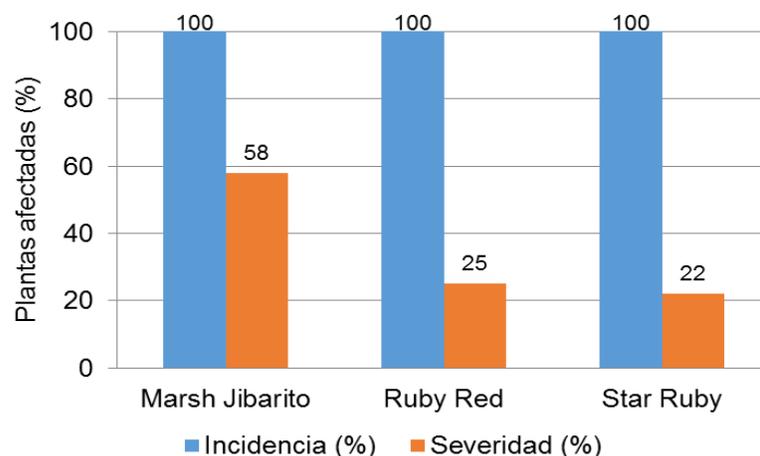


**Figura 5.** Tendencias de los rendimientos (t/ha) en plantaciones de pomelo ‘Marsh’ durante etapa de investigación (1985) y en producción año 2017.

Se aprecia que el pomelo ‘Marsh’ no ha logrado los resultados productivos esperados acorde a las características de este cultivar, referidas durante la etapa de investigación, en que no se encontraba presente la enfermedad HLB y las plantas pudieron expresar su potencial productivo. Según las observaciones de Bello (1985), las plantaciones de pomelo ‘Marsh’ al quinto año tienen un potencial de 30 t/ha como promedio, sin embargo, en las condiciones evaluadas se comportaron muy por debajo del potencial estimado en investigación, con una media de 10 t/ha.

A los 10 años se estima un rendimiento potencial superior a 50 t/ha a pesar de alto índice de alternancia, mientras que en la información de este cultivar en la empresa, los rendimientos hasta esa edad, están por debajo de las 10 t/ha.

En la figura 6, se muestra la valoración de la distribución e intensidad del HLB en las plantas de los tres cultivares de pomelo en el lote T-32 de la empresa. Se aprecia que la enfermedad está presente en el 100% de las plantas en los tres cultivares, sin embargo, fueron evidentes diferencias en la intensidad de las afectaciones por la enfermedad, con una mayor severidad de los síntomas en pomelo 'Marsh'.



**Figura 6.** Incidencia y severidad de los síntomas de HLB en tres cultivares de pomelo con nueve años de edad en la empresa (Evaluación sep-2017).

En pomelo 'Marsh' un 70% de las plantas presentaban un grado de deterioro medio y un 30% un daño intenso, para un 58% de intensidad, mientras que en los cultivares 'Ruby Red' y 'Star Ruby' la intensidad de los síntomas fue de un 25 a 22%.

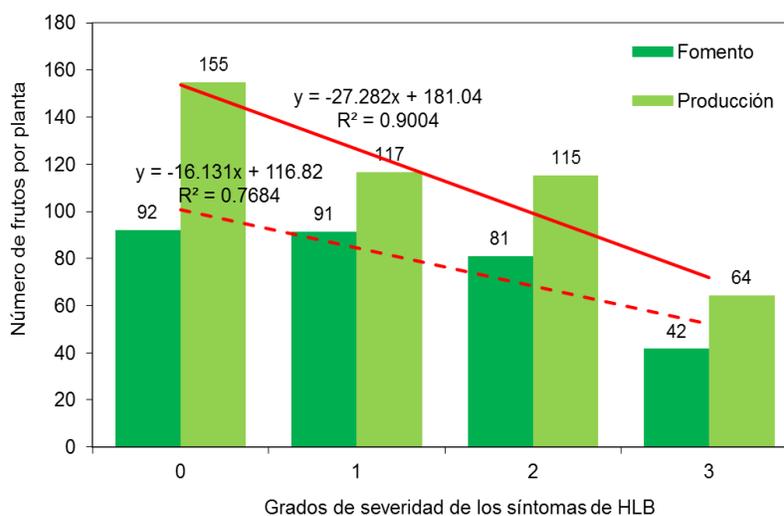
Estas observaciones y apreciación visual de los daños por HLB en plantas de diferentes cultivares ubicadas en una misma plantación, sugieren una mayor susceptibilidad del pomelo 'Marsh' a esta enfermedad que la experimentada en los cultivares pigmentados, sin embargo, esta observación debe ser corroborada con estudios más profundos. Las evaluaciones de otras enfermedades como la presencia de *Diplodia* sp. y *Phytophthora* sp., no brindó resultados significativos en estas

plantaciones, aunque de forma general la melanosis y mancha grasienta presentaban niveles importantes en todos los casos.

## **4.2. Influencia del Huanglongbing en la producción y caída de frutos**

### **4.2.1. Relación del número de frutos con la severidad de los síntomas**

En el análisis de la información registrada sobre el número de frutos por planta en cultivares de pomelos durante su etapa de fomento y de producción, según el grado de severidad de los síntomas visuales de HLB, se aprecia que en plantaciones de producción se obtiene una mayor cantidad de frutos con respecto a las de fomento (figura 7); sin embargo, la relación de los síntomas de HLB con la producción de frutos, mostró una tendencia a disminuir con la severidad de los síntomas, tanto en los fomentos como en las plantaciones de producción.



**Figura 7.** Producción en número de frutos por planta en áreas de pomelos de fomento y producción según grados de severidad de síntomas de HLB.

Las diferencias en el número de frutos por planta según el grado de severidad de los síntomas, es mayor en las áreas de pomelos en producción que en las de fomento, y esto es de esperar teniendo en cuenta que las plantas a mayor edad son más productivas y por lo tanto mayor la proporción de las caídas de frutos. Se aprecia que las afectaciones severas (grado 3), son las que más limitan la producción de frutos, asociado esto al deterioro del área foliar que caracteriza las plantas con este grado

de intensidad de la enfermedad y por lo tanto a la mayor posibilidad de manifestación de los procesos asociados a la producción de etileno que favorecen la abscisión; por lo que se reduce considerablemente el número de frutos en plantas afectadas en comparación con las plantas asintomáticas, de forma más marcada en las plantas en producción. En pomelos en producción las plantas fueron menos productivas, con el aumento de la severidad de los síntomas característicos del HLB en las plantaciones, con reducción en el número de frutos de 152 a 60 por planta de un grado 0 al grado 3 de severidad, para un 39.5% de reducción de la producción.

En estudios desarrollados en Brasil, Fundecitrus (2007) y Hall (2014) detectaron que la pérdida de frutos por árbol varió desde siete hasta 70.3 en relación con el incremento del área dañada de la copa de un 2.5% hasta 90%. Estos resultados muestran una relación directa entre la severidad de los daños en la copa y la disminución de los rendimientos observado en este estudio.

Al ajustar las tendencias de la producción de frutos por planta con la severidad de los síntomas de HLB en plantaciones de fomento y producción, con modelos de regresión, se encontró que el número de frutos por planta se relacionó con la severidad de los síntomas de HLB por modelos lineales con pendiente negativa. Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) para fomento y producción en plantaciones de pomelos fueron de 0.77 y 0.90 respectivamente. En este sentido se debe señalar que diversos autores (Schwarz, 1967; Roistacher, 1996; Bassanezi *et al.*, 2006), han encontrado altos coeficientes de determinación al relacionar estas variables, lo que coincide con los resultados de este trabajo.

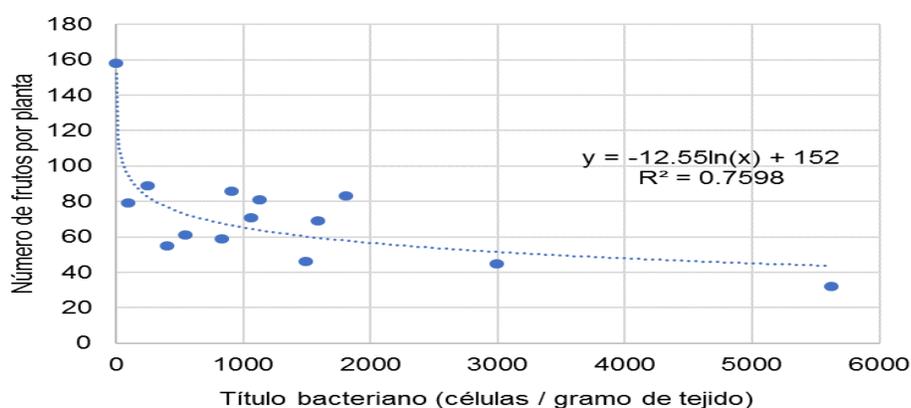
Esta observación, es de gran importancia a nivel productivo para la empresa, teniendo en cuenta que los pomelos ocupan un 65,2% del área plantada en producción y alcanzan rendimientos promedios de 26 t/ha, en las áreas de 31-40 años y 13 t/ha, en las nuevas plantaciones de 0-10 años, por lo tanto, el incremento en la severidad del HLB en estas plantaciones pudiera ocasionar un daño económico importante por la disminución de los rendimientos.

Las ecuaciones de regresión obtenidas que relacionan la producción expresada en número de frutos por planta (y), con la severidad de los síntomas por HLB (x), pueden ser de utilidad para estimar la proporción en que puede disminuir el rendimiento esperado, con la severidad del HLB en una plantación. Estos resultados constituyen los primeros estudios que relacionan los componentes del rendimiento con la intensidad de los síntomas asociados con el HLB en Jagüey Grande y Cuba.

La disminución de la producción de frutos relacionada con el aumento de la intensidad de los síntomas, en ambos cultivares y tipos de plantaciones aumentó en la medida en que se incrementó la intensidad. Robles *et al.* (2017) encontraron en árboles de limón mexicano con HLB una tendencia a reducir el número de frutos/m<sup>2</sup> conforme aumenta el porcentaje de copa afectada, tanto en los sectores sintomáticos como en los asintomáticos. Los árboles de limón sin síntomas de HLB tuvieron como promedio 60.3 frutos/m<sup>2</sup>, mientras que en árboles con síntomas cubriendo toda la copa 27.6 frutos/m<sup>2</sup>, lo que representó una reducción del 45.8%, que se corresponde al rango de pérdidas encontrado en los pomelos de Jagüey Grande.

### 4.2.2. Relación del número de frutos con el título bacteriano en la planta

En la figura 8 se presentan los resultados de la relación estimada por regresión del número de frutos por planta y el título o concentración de la bacteria causante del HLB en plantas de pomelo con diferente grado de afectación por síntomas visuales.



**Figura 8.** Relación del número de frutos por planta en pomelos con la concentración o título bacteriano estimados por PCR en sus tejidos.

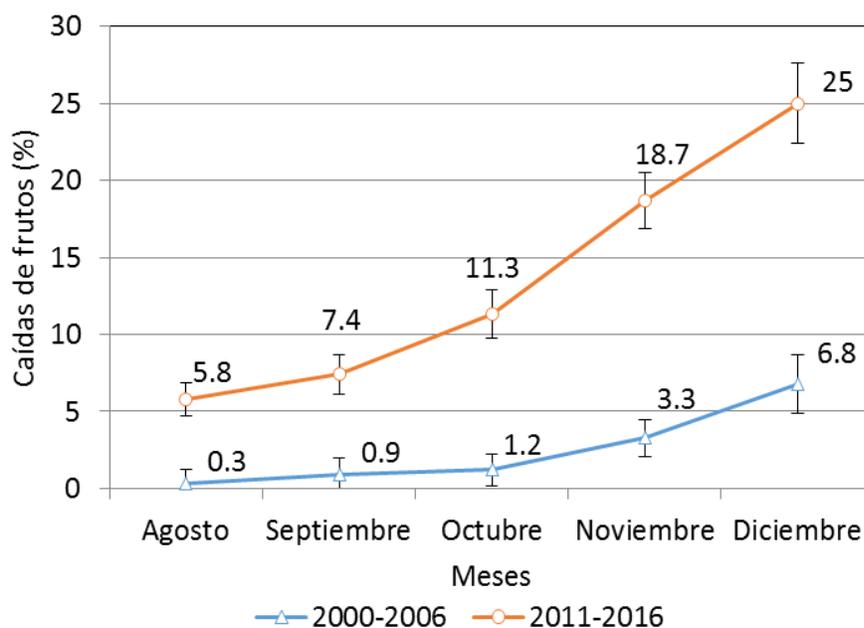
Se observa la tendencia a disminuir el número de frutos en la planta de 160 a 40 con el incremento de la concentración de bacteria, de forma importante, de plantas sanas o asintomáticas sin título registrado a niveles medios y altos de título bacteriano, con un coeficiente de correlación de -0.58 entre estas variables, que indican una fuerte relación negativa entre ellas y esto explica el fenómeno biológico de que sean mayores las caídas con el aumento de la concentración de la bacteria.

Robles *et al.* (2017) indican que la reducción en la producción de fruta está directamente relacionada con el porcentaje de copa de los árboles que presentan síntomas de la enfermedad y cuando se manifiesta en el 100% de la copa, provoca pérdidas de producción cercanas al 50% en comparación con árboles sin síntomas; como se observa en los análisis realizados en este trabajo.

### **4.2.3. Cambios en la dinámica de abscisión de frutos asociada al HLB**

El número de frutos estimados por árbol se relaciona de forma lineal y positiva con el rendimiento, sin embargo, se plantea que el goteo temprano de la fruta causado por el Huanglongbing, es la causa principal de la mayor reducción de los rendimientos en diferentes cultivares de cítricos (Bassanezi *et al.*, 2008, Hall, 2014). En la Figura 9 se analizan las bases de datos históricos de las caídas de frutos de pomelos acumuladas por meses durante la fase de maduración de los frutos en las plantaciones de la empresa (período 2000-2006), antes del informe del HLB en el 2007 y después que se informara su presencia en las plantaciones de Jagüey Grande (período 2011-2016).

Se aprecia que en el periodo anterior al informe del HLB las caídas de frutos de agosto a diciembre entre los años 2000-2006, fueron como promedio de 0.3 al 6.8%. Teniendo en cuenta que la cosecha de este cultivar se realiza en ese período, de meses después del informe del HLB el análisis de la información de caídas para la etapa 2011-2016 las pérdidas fueron mayores, con valores del 5.8 al 25%.



**Figura 9.** Cambios en el patrón de las caídas de frutos en plantaciones de pomelos antes y después del informe del HLB en Jagüey Grande.

Es importante destacar que esta situación con las caídas de frutos asociadas al HLB ha conllevado a que en los cultivares de pomelos se acortara el período de cosecha para reducir las pérdidas de frutos durante la cosecha. Salcedo *et al.* (2010) citado por Robles *et al.* (2013) plantean que, en estimaciones sobre el impacto potencial de la enfermedad en los cítricos de México, el HLB puede causar una reducción en el rendimiento del limón mexicano que va de 20 hasta 48% en los primeros tres años, dependiendo del nivel de intensidad del daño.

En el análisis de la relación de la severidad del HLB y títulos bacterianos en las plantas de pomelos con las caídas de frutos y la presencia de hongos asociados a estas caídas se observa (tabla 3); que la presencia de la bacteria en las plantas diagnosticadas como sintomáticas en grado 2 y grado 3 de apreciación visual, se diferencian de forma significativa con el aumento de las caídas de frutos y la presencia de hongos como *Diplodia* sp., con relación a las plantas asintomáticas y con niveles o síntomas leves de la enfermedad.

**Tabla 3.** Caídas de frutos y presencia de hongos asociados según la severidad de los síntomas visuales de HLB y título bacteriano en pomelo ‘Marsh’.

Grado visual de HLB	Título bacteriano	Frutos caídos al suelo (%)	Frutos con <i>Diplodia</i> sp. (%)
0	0	3.9 c	3.5 c
1	20	4.7 c	4.7 c
2	362	9.6 b	7.2 b
3	1594	14.1 a	13.7 a
Esx		0.56*	0.22*
CV (%)		23.12	26.32

Grados de HLB por escala síntomas visuales y título bacteriano por PCR.

Soto-Leal (2013) plantea que la expresión de los síntomas y severidad del HLB en plantas de limón mexicano, está relacionado con el título o concentración de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, por sus afectaciones a la eficiencia del fotosistema II de la fotosíntesis, de los complejos proteínicos involucrados en la transferencia de electrones y en la acumulación de almidón y sacarosa que disminuyen la actividad fotosintética y favorecen la abscisión de los frutos.

La presencia de hongos asociados a las caídas en plantas con HLB como el *Diplodia* sp., puede estar relacionado a la influencia de la enfermedad en la maduración de los frutos en pomelos. Cabrera *et al.* (2017) han informado la presencia de hongos fitopatógenos como *Lasiodiplodia thepbromae*, *Fomitiporia maxonii*, *Fusarium solani*, alga roja *Cephaleuros virenses*, asociados con la bacteria *Candidatus Liberobacter asiaticus* confirmada por PCR anidada, causante del HLB y contribuyendo de forma sinérgica al deterioro de las plantas.

### 4.3. Efectos del Huanglongbing en la calidad de los frutos

#### 4.3.1. Comparación de la calidad en frutos con síntomas y asintomáticos

El análisis comparativo de la calidad de los frutos de pomelo ‘Marsh’ con síntomas y asintomáticos al HLB (Tabla 4) muestra que la masa de los frutos, el diámetro, su forma (relación D/A) y contenido de jugo son variables de calidad de los frutos que se ven afectadas de forma significativa por la enfermedad. En un estudio realizado por Bassanezi *et al.* (2009) y Yulu (2014) en las condiciones de Brasil donde compara la

calidad de los frutos de cuatro cultivares de naranjo ('Valencia', 'Hamlin', 'Pera' y 'Westin') procedentes de ramas con síntomas y sin síntomas de HLB, también encontraron que los frutos fueron más pequeños y de menor masa.

**Tabla 4.** Comparación de la calidad de los frutos de pomelo 'Marsh' con síntomas y asintomáticos al Huanglogbing Jagüey Grande (septiembre 2017).

Variables	Característica de los frutos		p
	Sintomáticos	Asintomáticos	
<b>Masa del fruto (g)</b>	299.4 ± 7.2 <sup>y</sup>	337.5 ± 12.1	<b>1.1E-05<sup>z</sup></b>
<b>Diámetro fruto (mm)</b>	88.3 ± 1.4	92.0 ± 1.2	<b>0.00019</b>
Altura fruto (mm)	83.4 ± 1.7	84.3 ± 1.6	0.33068
<b>Relación D/A</b>	1.06 ± 0.03	1.09 ± 0.03	<b>0.04786</b>
Grosor Corteza (mm)	8.0 ± 0.5	8.1 ± 0.4	0.52494
<b>Contenido jugo (%)</b>	36.0 ± 3.1	40.1 ± 2.0	<b>0.01168</b>
Sólidos solubles (°Brix)	6.7 ± 0.4	6.6 ± 0.7	0.4316
<b>Acidez titulable (%)</b>	1.22 ± 0.06	1.03 ± 0.1	<b>0.00113</b>
<b>Índice de madurez</b>	5.5 ± 0.4	6.4 ± 0.7	<b>0.01253</b>
<b>Rendimiento Jugo</b>	360.0 ± 30.8	401.4 ± 20.4	<b>0.01168</b>
Rendimiento Sólidos	24.2 ± 2.4	26.4 ± 2.3	0.09564
Índice Tecnológico	27.5 ± 2.6	25.2 ± 2.3	0.10072

<sup>y</sup>Media ± desviación estándar. N= 7 (siete repeticiones de 10 frutos por tratamiento).

<sup>z</sup>Probabilidad del error estimado por la prueba t para definir las diferencias a  $p \leq 0.05$ .

Los sólidos solubles, aunque no mostraron diferencias significativas fueron ligeramente superiores en los frutos enfermos, al igual que la acidez que fue significativamente superior en los frutos sintomáticos, lo que condujo a que el índice de madurez fuera más bajo y por lo tanto los frutos enfermos estuvieran menos maduros en el momento de la cosecha con relación a los sanos.

La influencia de la enfermedad en los indicadores de eficiencia industrial se evidenció en la disminución significativa del rendimiento en jugo con respecto al estimado para los frutos sanos, el rendimiento en sólidos se resultó afectado ligeramente sin diferencias significativas entre tratamientos, con un índice tecnológico teórico

ligeramente superior con respecto a los frutos asintomáticos; lo que pudiera afectar la eficiencia durante el procesamiento en la industria.

Graham (2017), informa la deformación de los frutos afectados por HLB, mientras que Robles *et al.* (2013) en la lima mexicana, registraron que en ramas sintomáticas la fruta tuvo menor tamaño, pero no detectaron frutos deformes, con maduración invertida o incremento del número de semillas abortadas.

Los resultados de los análisis realizados en el pomelo ‘Ruby Red’ (Tabla 5) solo mostraron diferencias entre tratamientos para la variable masa de los frutos, que resultaron significativamente superiores en los frutos asintomáticos con relación a los sintomáticos al HLB.

**Tabla 5.** Comparación de la calidad de frutos de pomelo ‘Ruby Red’ con síntomas de Huanglogbing y asintomáticos Jagüey Grande (agosto, 2017).

Variables	Característica de los frutos		p
	Sintomáticos	Asintomáticos	
<b>Masa del fruto (g)</b>	364.0 <sup>y</sup>	434.0	<b>0.0307<sup>z</sup></b>
Contenido jugo (%)	28.3	29.5	0.4775
Sólidos solubles (°Brix)	9.3	9.1	0.5441
Acidez titulable (°Brix)	1.71	1.59	0.3422
Índice de madurez	5.5	5.8	0.5497
Rendimiento Jugo	283.2	294.8	0.4775
Rendimiento Sólidos	26.4	26.9	0.7872
Índice Tecnológico	25.4	24.8	0.7493

<sup>y</sup>Media ± desviación estándar. N= 5 (cinco repeticiones de 10 frutos por tratamiento).

<sup>z</sup>Probabilidad del error estimado por la prueba t para definir las diferencias a  $p \leq 0.05$ .

Estas observaciones indican que la enfermedad afecta también el tamaño de los frutos en este cultivar de pomelo y aunque no se encontraron diferencias significativas, al comparar el resto de las variables de calidad, se observó que se retrasaba ligeramente la maduración y se afectaban el contenido de jugo y los indicadores de eficiencia industrial, con un mayor índice tecnológico teórico en los

frutos afectados, lo que representa una reducción de la eficiencia industrial, con el procesamiento de frutos de plantas con un alto grado de severidad del HLB.

Bassanezi *et al.* (2009) y Yulu (2014) en diferentes cultivares de naranjo encontraron una reducción significativa del contenido de jugo y sólidos ligeramente superiores en los frutos enfermos con respecto a la fruta normal, este autor encontró en otros cultivares de naranjo un efecto contrario al observado en ‘Valencia’.

#### **4.3.2. Proporción de los cambios en la calidad del fruto asociados al HLB**

En la tabla 6 se muestran los resultados de la estimación del aumento o disminución relativa en cada variable de calidad por efecto del HLB sobre los frutos en los tres cultivares analizados. El mayor efecto de la enfermedad sobre la calidad de los frutos estuvo reflejado en la masa del fruto, con el mayor porcentaje de reducción en el pomelo Ruby con respecto al pomelo ‘Marsh’.

**Tabla 6.** Cambios relativos en las diferentes variables de calidad de los frutos por efecto del Huanglogbing en los cultivares de pomelo evaluados.

Variables	Reducción o incremento en cada variable (%)	
	Pomelo ‘Marsh’	Pomelo ‘Ruby Red’
Masa del fruto (g)	-11.3	-16.1
Diámetro fruto (mm)	-4.0	-
Altura fruto (mm)	-1.1	-
Relación D/A	-3.0	-
Grosor Corteza (mm)	-2.0	-
Contenido jugo (%)	-10.3	-3.9
Sólidos solubles (°Brix)	2.2	1.8
Acidez titulable (%)	18.0	7.3
Índice de madurez	-14.1	-4.7
Rendimiento Jugo	-10.3	-3.9
Rendimiento Sólidos	-8.5	-2.0
Índice Tecnológico	9.3	2.5

Porcentaje de reducción (-) o incremento (+), en las variables de calidad de los frutos con síntomas de huanglonbing con relación a los asintomáticos en tres cultivares de cítricos.

Resultados de Bassanezi *et al.* (2006) muestran que la masa de los frutos de naranja con síntomas de HLB, resultó significativamente más baja que la de frutos asintomáticos, sin embargo, la masa de las frutas no se correlacionó siempre con la severidad de la enfermedad, indicando que el efecto del HLB se restringe a las ramas sintomáticas. Albrecht y Bowman (2014), demuestran que la composición de los jugos en la fruta cítrica varía de acuerdo con la intensidad de la enfermedad y los cultivares en estudio. Por lo tanto, en la medida que en las plantaciones tengan más ramas enfermas mayores serán las afectaciones en la calidad de los frutos.

En pomelo 'Marsh' el diámetro y altura de los frutos se redujo y en este sentido Catling y Atkinson (1974), Bassanezi *et al.* (2006) y Albrecht y Bowman (2014) plantean, que en naranja el incremento de la intensidad de la enfermedad, se relaciona con el aumento del porcentaje de frutos afectados y estos son más pequeños, deformados y de menor peso, además de mostrar una coloración invertida y semillas necróticas y abortadas (Gottwald *et al.*, 2007, Albrecht y Bowman, 2014).

Con relación al comportamiento del Brix se incrementa de forma ligera en ambos cultivares de pomelo. Estos resultados, no se corresponde con las observaciones de Bassanezi *et al.* (2009) quienes encontraron que el Brix se reduce de forma significativa en la fruta sintomática de los cultivares de naranja 'Hamlin' y 'Pera' respecto al Brix de la fruta normal. El aumento relativo en la acidez de la fruta enferma resultó más pronunciado en pomelo 'Marsh' que en el 'Ruby Red'.

El índice de madurez en los frutos de pomelo enfermos disminuye en ambos cultivares y esto representa un retraso en la maduración, que no guarda relación con las caídas de frutos, lo que puede estar dado a otros factores relacionados con la enfermedad y no con la maduración, que es necesario estudiar.

El rendimiento industrial en jugo y en sólidos se ve afectado en los dos cultivares, pero de forma más importante en el pomelo 'Marsh', por la presencia de frutos enfermos. Baldwin *et al.* (2010) encontraron que la fruta de los árboles enfermos no era muy diferente de la fruta de los árboles sanos para muchos de las variables de calidad medidos, pero la fruta sintomática a la enfermedad era más pequeña, verde y

deforme, con un sabor más amargo lo que probablemente causa problemas de sabor al jugo procesado en la industria.

El índice tecnológico teórico se incrementa en los pomelos y causa afectaciones del rendimiento potencial que desfavorece la eficiencia industrial. Respecto a la calidad interna de los frutos procedentes de plantas afectadas por el HLB, Bassanezi *et al.* (2006) y Beattie *et al.* (2006) plantean que el incremento en la severidad de la enfermedad, favorece la presencia de frutos de naranja más pequeños, ligeros, muy ácidos, con un bajo Brix, y bajo índice de madurez, contenido de jugo y sólidos solubles con afectaciones a la calidad del jugo. En este sentido López *et al.* (2017) expone la influencia negativa que tiene el HLB en la producción y la calidad de los frutos cítricos.

Los antecedentes del análisis de la influencia del HLB sobre la calidad de los frutos son escasos y en Cuba estos son los primeros resultados. Se ha informado que la enfermedad afecta la calidad de los frutos de forma variable y depende entre otros factores del grado de distribución del patógeno en las ramas sintomáticas. La disminución en la capacidad de acumulación de materia seca y el bloqueo en el transporte del agua por la interrupción de los vasos del floema, unido a una acumulación de almidón en las hojas y disminución de la disponibilidad de sacarosa influyen de forma negativa en el crecimiento de los frutos y su maduración (Bassanezi *et al.*, 2009).

Se aprecia que la manifestación de los cambios en la calidad de los frutos asociada al HLB es variable en dependencia del grado de infección de los campos y de las plantas de donde proceden los frutos analizados. Las diferencias en la expresión de los efectos del HLB sobre las variables de calidad entre cultivares, se puede atribuir a las variaciones en los momentos en que se recolectaron las muestras para los análisis de calidad.

Bassanezi *et al.* (2009) sugieren que los cultivares de maduración temprana o de mediana estación, como los pomelos, son ligeramente más eficaces en el transporte y acumulación de sólidos solubles que los de maduración tardía como la naranja

'Valencia'. Por otra parte, Gottwald *et al.* (2007) citados por Bassanezi *et al.* (2009) indican que la expresión foliar de los síntomas de HLB se presentan normalmente a principios del otoño y finales del invierno, cuando la concentración de bacterias en los tejidos es más alta. Se aprecian en menor medida afectaciones en la acumulación de sólidos y la maduración, con variaciones entre cultivares asociadas a la relación de la enfermedad con la reducción en la capacidad de absorción del agua y la producción de metabolitos importantes para el desarrollo de los frutos.

De forma general las observaciones realizadas en la calidad de los frutos bajo la influencia del HLB en Jagüey Grande, Cuba, se corresponden con los resultados de los análisis realizados en Brasil y La Florida, donde se destaca que las afectaciones más importantes a la calidad son en la masa y el tamaño de los frutos.

Estos resultados constituyen los primeros que relacionan los síntomas del HLB y los parámetros de calidad de los frutos de pomelos, procedentes de plantas con diferentes niveles de la enfermedad. Se debe considerar como algo importante, el estado fitosanitario general de las plantaciones, donde la combinación del HLB con otras enfermedades como la tristeza (*virus de la tristeza de los cítricos*) y la pudrición del pie (*Phytophthora* sp.), pueden contribuir a las pérdidas de la producción y a las afectaciones en la calidad de los frutos en las condiciones de este trabajo.

#### **4.4. Estimación de las pérdidas potenciales por el HLB**

Una evaluación objetiva del impacto del Huanglongbing en la estimación de la producción en los rendimientos, son muy difíciles de definir y cuantificar con exactitud a partir de los resultados de este trabajo, pues entre los componentes del rendimiento, se encuentran variables como: número de frutos, masa por fruto y afectaciones por caídas, además del número de plantas en producción. Este último aspecto es una variable muy afectada por la presencia del HLB, y es muy difícil cuantificar cuantas plantas se han vuelto improductivas, o es necesario erradicar, como estrategia para reducir la fuente de inóculo según se ha recomendado como parte del control integral de esta enfermedad.

Las pérdidas causadas por el HLB están muy relacionadas con el incremento de la severidad de la enfermedad, la edad de los árboles, la incidencia de las poblaciones del vector y la tecnología de manejo utilizada entre otros factores. Además, se suman los costos de la erradicación de plantas enfermas, aplicación de insecticidas, certificación y diagnóstico. En la Tabla 7 se muestran los resultados de un análisis comparativo del estimado potencial de producción a cosechar en dos campañas, una antes del informe del HLB y una con alta incidencia de la enfermedad.

Como se observa, los niveles de afectación crecieron, con una afectación por goteo que se incrementó en un 8% y pérdidas de 145,095 t cuando las plantaciones estaban enfermas por HLB y una disminución de los estimados de producción de 13,474 t con respecto al real cosechado.

**Tabla 7.** Análisis de las pérdidas de frutos de pomelos cosechados estimadas en las campañas 2000/2001 (antes del HLB) y 2016/2017 (con HLB).

Cultivar	Campaña	Producción estimada (t)	Cosecha Real (t)	Diferencia	Afectación por goteo y peso (%)
Pomelos	2000/2001	260,719	225,099	35,620	13.7
	2016/2017	102,150	80,004	22,146	21.7
	<i>Diferencia</i>	<i>158,569</i>	<i>145,095</i>	<i>13,474</i>	<i>8.0</i>

Robles (2011), estimó que las pérdidas ocasionadas a la industria citrícola mexicana debido a la incidencia del HLB puede superar varios millones de dólares. Teniendo en cuenta este concepto, el incremento de las pérdidas en los pomelos blancos y pigmentados de la Empresa Agroindustrial Victoria de Girón destinadas a comercializar como frutos frescos se ubica en 8,190 toneladas. Este nivel de pérdidas llevadas a JCC con un rendimiento de 13.6 tf/tJCC para la toronja equivalen a una producción de 587.2 t de tJCC de toronjas.

Una valoración de los precios promedios CIF alcanzados en el año 2016 (agosto-octubre) que se descompone con 1,236 USD/t para las toronjas destinados a la industria, representan una afectación importante a los ingresos brutos de la campaña como resultado de los cambios a la calidad de los frutos por el HLB.

## **5. CONCLUSIONES**

- La incidencia y severidad del Huanglongbing (HLB) en las plantaciones, afecta el crecimiento de las plantas y los rendimientos en diferentes cultivares de pomelo con diagnóstico positivo.
- Se encontró una correlación negativa entre la producción de frutos en plantaciones de pomelo y la severidad de los síntomas de la enfermedad tanto en áreas en fase de fomento como de producción.
- La caída de los frutos se incrementa de forma importante con el aumento del título bacteriano en las plantas de pomelo 'Marsh'.
- Se encontraron diferencias en la calidad en los frutos de pomelo sintomáticos con respecto a los asintomáticos. La masa, tamaño del fruto y rendimiento industrial fueron las variables más afectadas.
- El Huanglongbing influye negativamente en los resultados económicos por las afectaciones a la producción y calidad de los frutos en pomelos.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Evaluar el impacto de los niveles bacterianos del HLB, en la fenología y los procesos fisiológicos que determinan la producción y calidad de los frutos.
- Extender este trabajo a otros cultivares de importancia económica como el naranjo 'Valencia', el limero 'Persa' y los nuevos híbridos de mandarino.

**7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Achor, D.S., Etxeberria, E., Wang, N., Folimova, S.Y., Chung, K.R. and Albrigo, L.G. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing Disease. *Plant Pathology Journal*. 9p. ISSN 1812-5387.
2. Alberch, U. and Bowman, K.D. 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection whit *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Plant science*. 185-186.
3. Albrecht, U. and Bowman, K.D. 2014. Tolerance of trifoliolate citrus hybrids to *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Science Horticulturae* 147: 71-80
4. Aranguren, M. 2009. Pronósticos de madurez y otras especificaciones de calidad para el ordenamiento de la cosecha en los cítricos de Jagüey Grande. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ministerio de la Agricultura.
5. Aubert, B. 1987a. *Trioza erytrae* Del Guercio and *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidae), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits*. 42: 149-162.
6. Aubert, B. 1987b. Le greening, une maladie infectieuse des agrumes, d'origine bactérienne, transmise par des homoptères psyllides. Stratégie de lutte développée à l'île de la Réunion. Circonstances epidemiologiques en Afrique/Asie et modalités d'intervention. IRFA/CIAD-B. Saint Pierre Cedex. p.180-974.
7. Aubert, B. 1990. Integrated activities for the control of huanglongbing - greening and its vector *Diaphorina citri* Kuwayama in Asia. Proc. of the Asia Pacific Intl. Conf. on Citriculture, Chiang Mai, Thailand, 4 - 10 February 1990. UNDP - FAO, Rome. B. Aubert; S. Tontyaporn and D. Buangsuwon, eds. Rehabilitation of Citrus Industry in the Asia Pacific Region. p.133-144.

8. Aubert, B. 1992. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. Proc. Intl. Soc. Citricult. p. 817-820.
9. Aubert, B. and Bové, J.M. 1980. Effect of penicillin or tetracycline injections of citrus trees affected by greening disease in Reunion Island. Proc. of the 8th Conf. of the Intl. Organ. of Citrus Virologists., eds. IOCV, Riverside, CA. p.103-108.
10. Aubert, B. and Quilici, S. 1984. Biological control of psyllid vectors of greening disease in Reunion Island. Proc. of the 9th Conf. of the Intl. Organ. of Citrus Virologists., eds. IOCV, Riverside, CA. p.118-123.
11. Aubert, B., Garnier, M., Guillaumin, D., Herbagyandodo, B., Setiobudi, L. and Nurhadi, F. 1985. Greening, a serious disease threat for the citrus production of the Indonesian archipelago. Future prospects of integrated control. Fruits. 40: 549-563.
12. Baldwin, E., Plotto, A., Manthey, J., Mccollum, G., Bai, J., Irely, M., Cameron, R., Luzio, G. Effect of Liberibacter infection (Huanglongbing disease) of citrus on orange fruit physiology and fruit/fruit juice quality: chemical and physical analyses. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2010. 58:1247-1262.
13. Bassanezi, R.B. 2012. Seasonal detection of huanglongbing symptomatic trees and *Diaphorina citri* in citrus groves in Sao Paulo State, Brazil. Book of abstracts of the XII International Citrus Congress, Valencia, España, p.199.
14. Bassanezi, R.B., Montesino L.H. and Sanches E.S. 2009. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. European Journal of Plant Pathology. 125 (4): 565-572.
15. Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorim, L., and Bergamin Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. Plant Dis. 97: 789-796.

16. Bassanezi, R.B., Montesino, L.H.; Amorim, L., Gasparoto, M.C.G. and Bergamin Filho, A. 2008. Yield reduction caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. Proceedings of the Meeting International Research Conference on Huanglongbing. Session 8: Economics, Fruit Quality and Crop Loss. p.237-238.
17. Bassanezi, R.B.; Montesino, L.H.; Busato, L.A. and Stuchi, E.S. 2006. Damages caused by Huanglongbing on sweet orange yield and quality in São Paulo. Proc. of the Huanglongbing - Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil. 39p.
18. Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Godoy, M., Bergamin, A. and Amorim, L. 2011. Yield loss caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. Eur J Plant Pathol. 10p.
19. Beattie, G.A.C., Holford, P., Mabblerley, D.J., Haigh, A.M., Bayer, R. and Broadbent, P. 2006. Aspects and insights of Australia - Asia collaborative research on Huanglongbing. Proc. of the Intl. Workshop for the Prevention of Citrus Greening Disease in Severely Infected Areas. Intl. Res. Div., Agric. Forestry Fisheries Res. Counc. Secretariat, Ministry of Agric., Forestry and Fisheries, Tokyo, Japan. p.47- 64.
20. Bello, L. 1985. Crecimiento, producción y calidad del fruto de dos clones de pomelos (*Citrus paradisi* Macf) sobre dos patrones. Agrotécnica de Cuba, 17(1): 25-30.
21. Bello, L., Aranguren, M. y González, H. 1997. Comportamiento del pomelo 'Star Ruby' en Jagüey Grande. Citrifrut. 15 (1, 2, y 3): 34-37.
22. Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly - emerging, century - old disease of citrus. J. Plant Pathol. 88: 7-37.
23. Bové J.M. 2010. Huanglongbing. Memorias del III Simposio Nacional y II Internacional de Bacterias Fitopatógenas. Guadalajara, Jal. México. 20p.

24. Bové J.M. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo, State, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 94 (3): 465-467.
25. Buitendag, C.H. and Von Broembsen, L. A. 2003. Living with citrus greening disease. *Proc. of the 12th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol.*, eds. IOCV, Riverside, CA. p.269-271.
26. Cabrera, R.I., González, C., Hernández, D. y Rodríguez, J.L. 2004. Presencia del hongo *Hirsutella citriformis* Speare sobre *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) en cítricos de Cuba. *Levante Agrícola*. 144: 74-76.
27. Cabrera, R.I., Varela, F., Betancourt, M., Artilez, L., Herrera, S. y Ramos, L. 2017. Importancia y manejo de las enfermedades fungosas y por algas en plantaciones de cítricos con y sin la presencia de HLB. Resúmenes V Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical “Fruticultura 2017”. Hotel Nacional de Cuba. p. 30. ISBN: 978-959-296-051-0.
28. Canales, E., Coll, Y., Hernández, I., Portieles, R., Rodríguez, M., López, Y., Aranguren, M., Alonso, E., Delgado, R., Luis, M., Batista, L., Paredes, C., Rodríguez, M., Pujol, M., Ochagavia, M.E., Falcón, V., Terauchi, R., Matsumura, H., Ayra, C., Llauger, R., Pérez, M.C., Núñez, M., Borrusch, M.S., Walton, J.D., Silva, Y., Pimentel, E., Borroto, C. and Borrás, O. 2016. ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, Causal Agent of Citrus Huanglongbing, Is Reduced by Treatment with Brassinosteroids. *PLoS ONE* 11(1): 14p.
29. Canales, E., Hernández, I., Portieles R., Rodríguez, M., López, Y., Guirola, O., González, J.L., Borrás, O., Rodríguez, M. 2017. Evaluación de nuevos compuestos sintéticos para controlar *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Resúmenes V Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical “Fruticultura 2017”. Hotel Nacional de Cuba. p.32. ISBN: 978-959-296-051-0.
30. Cao, J., Cheng, C., Yang, J. and Wang, Q. 2015. Pathogen infection drives patterns of nutrient resorption in citrus plants. *Scientific Reports*. 5:14675. 11 p.

31. Capoor, S.P. 1963. Decline of citrus trees in India. Bull. Nat. Inst. Sci. India 24: 48 - 64.
32. Capoor, S.P.; Rao, D.G. and Viswanath, S.M. 1967. *Diaphorina citri* Kuway, a vector of the greening disease of citrus in India. Ind. J. Agric. Sci. 37: 572-576.
33. Castro-López, T. 2004. Cosecha de frutos cítricos. Postcosecha de cítricos y algunos temas de comercialización. Carta Circular RIAC. Red Interamericana de Cítricos. (23-24): 42-52.
34. Catling, H.D. 1969a. The bionomics of the South African citrus psylla *Trioza erytreae* Del Guercio (Homoptera: Psyllidae). The influence of parasites and notes on the main species involved. J. Entomol. Soc. South. Afr. 32: 209-223.
35. Catling, H.D. 1969b. The bionomics of the South African psylla, *Trioza erytreae* Del Guercio (Homoptera: Psyllidae). The influence of extremes of weather on survival. J. Entomol. Soc. S. Afr. 32: 273-290.
36. Catling, H.D. 1970. The bionomics of the South African citrus psylla, *Trioza erytreae* Del Guercio (Homoptera: Psyllidae). Influence of predators. J. Entomol. Soc. S. Afr. 33: 341-348.
37. Catling, H.D. and Atkinson, P.R. 1974. Spread of greening by *Trioza erytreae* Del Guercio in Swaziland. Proc. of the 6th Conf. Intl. Organ. Citrus Virologists. Eds. IOCV, Div. Agric. Sci., Univ. of Calif., Riverside. p.33-39.
38. Chao, H.Y., Chiang, Y.H., Lee, S.L., Chiu, C. S. and Su, W.F. 1979. A preliminary study on the relation between the prevalence of the Citrus Yellow Shoot (Huanglongbing) and the citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama. Acta Phytopathol. Sin. 2: 121-126.
39. Chiu, S.C.; Aubert, B. and Chien, C.C. 1988. Attempts to establish *Tetrastichus radiatus* Waterston in Taiwan. Proc. of the 10th Conf. Intl. Organ. Citrus Virologists. Eds. IOCV, Riverside, CA. p.265-268.

40. Colleta - Filho, H.D., Targon, M.L., Takita, M.A., De Negri, J.D., Amaral, A.M., Müller, G.W., Pompeu, J., Carvalho, S.A. and Machado, M.A. 2004. Detecção do agente causal do greening do citros (*Candidatus liberibacter asiaticus*) no estado de São Paulo. Summa Phytopathol. 30: 510.
41. Da-Graça, J.V. 1991. Citrus greening disease. Annu. Rev. Phytopathol. 29: 109-136.
42. Da-Graça, J.V. and Korsten, L. 2004. Citrus Huanglongbing: Review, Present status and Future Strategies. Diseases of Fruits and Vegetables. Diagnosis and Management. 1: p. 229-245.
43. Doud, M.M., Wang, Y., Hoffman, M.T., Latza, C.L., Luo, W., Armstrong, C.M., Gottwald, T.R., Dai, L., Luo, F. and Duan, Y. 2017. Solar thermotherapy reduces the titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and enhances canopy growth by altering gene expression profiles in HLB-affected citrus plants. Horticulture Research. 4 (17054): 1-16.
44. Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Acevedo-Sánchez, G., Díaz-Padilla, G., Ruíz-García, G., López-Sánchez, N., Rivas-Valencia, P., Novelo-Cocón, A., López-Sánchez, P. y Sánchez-Rebolledo, F. 2010. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglogbing (HLB) de los cítricos en la península de Yucatán. Memoria del 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del psilido asiático de los cítricos y el Huanglongbing en México. p.4-18.
45. Etienne, J. and Aubert, B. 1980. Biological control of psyllid vectors of greening disease in Reunion Island. Proc. of the 8th Conf. Intl. Organ. Citrus Virologists. Eds. IOCV, Riverside, CA. p.118-121.
46. Fernández, E. 2015. Uso de silicio e inductores de resistencia en relación a Huanglongbing (HLB) en limón 'Persa' (*Citrus latifolia*) y limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*). Tesis presentada en opción al grado de Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas.

- Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Jalisco. México.
47. Flores-Sánchez, J.L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., López-Arroyo, J. I. y Robles-García, P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 195-210.
  48. Fraser, L.R., Singh, D., Capoor, S.P. and Nariani, T.K. 1966. Greening virus, the likely cause of citrus dieback in India. FAO Plant Prot. Bull. 14: 127 - 130.
  49. Fundecitrus. 2007. Manual Técnico de Greening. Fundecitrus. Brasil. 11p.
  50. García, J., Guadalupe, O. y Gutiérrez, H. 2009. Detección del agente causal de la enfermedad enverdecimiento de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp.) en plantas del Noreste de México. Seminario de Posgrado e Investigación. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. p.75-79.
  51. Garnier, M. and Bové, J. M. 1993. Citrus greening disease and the greening bacterium. Proc. of the 12th Conf. Intl. Organ. Citrus Virologists., eds. IOCV, Riverside, CA. p.212-219.
  52. Garnier, M., Danel, N. and Bové, J.M. 1984. Etiology of citrus greening disease. Ann. Microbiol. Instute Pasteur. 135: 169-179.
  53. Garnier, M., Jagoueix-Eveillard, S., Cronje, C.P.R., Le Roux, H. F. and Bové, J.M. 2000. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in an ornamental rutaceous tree *Calodendron capense* in the Western Cape province of South Africa. Intl. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 2119-2125.
  54. González, C., Gómez, M., Fernández, M., Hernández, D., Rodríguez, J.L. and Batista, L. 2010. Behavior and natural enemies of *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae) in Cuban citriculture. Proceedings of 17th Conference International Organization of Citrus Virologis. p. 203- 205.

55. González, C., Hernández, D. y Rodríguez, J.L. 2000. Primer informe de *Tamarixia radiata* Waterston como biorregulador de *Diaphorina citri* Kuw. en cítricos de Cuba. Citrifrut. 18 (1, 2, 3): 38-40.
56. González, C., Hernández, D., Rodríguez, J.L., González, L. y Rodríguez O. 2017. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), permanencia asociada con su manejo en naranjo 'Valencia' y toronjo 'Marsh' de Artemisa y Matanzas, Cuba. Resúmenes V Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical "Fruticultura 2017". Hotel Nacional de Cuba. p.29. ISBN: 978-959-296-051-0.
57. Gottwald. T.R. 2010. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. Annual Review of Phytophalogy. 48:119-139.
58. Gottwald, T.R., Aubert, B. and Zhao, X.Y. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. Phytopathology 79: 687-693.
59. Gottwald, T.R., Da Graça, J.V., and Bassanezi, R.B. 2007. Citrus huanglongbing: The pathogen and its impact. Plant Health Progress. [en línea]. Disponible en: [http://doi: 10.094/PHP-2007-0906-01-RV.htm](http://doi:10.094/PHP-2007-0906-01-RV.htm). [Consulta: julio, 15 2017].
60. Gottwald, T.R., González, C.I. and Mercado, B.G. 1991. Analysis of the distribution of citrus greening in groves in the Philippines. Proc. of the 11th Conf. Intl. Org. Citrus Virol. Eds. IOCV, Riverside, CA. p.414-420.
61. Graham J.H. 2017. Horticultural factors that contribute to tolerance of citrus to Huanglongbing (HLB) Univ. Florida Citrus Research and Education Center. p.1-30.
62. Graham, J.H. y Alferez, F. 2017. Factores horticulturales que contribuyen a la tolerancia de los cítricos al Huanglongbing. Resúmenes V Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical "Fruticultura 2017". Hotel Nacional de Cuba. p.3. ISBN: 978-959-296-051-0.

63. Halbert, S.E. 2005. The discovery of huanglongbing in Florida. Proc. of the 2nd Intl. Citrus Canker and huanglongbing Worksh, Orlando, FL. p.50.
64. Halbert, S.E. and Manjunath, K.L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease in citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. Fla. Entomol. 87: 330-354.
65. Halbert, S.E. and Nuñez, C.A. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Sternorrhyncha: Psyllidae) in the Caribbean basin. Fla. Entomol. 87: 401-402.
66. Hall, D.G. 2014. Biology, History and World Status of *Diaphorina citri* USDA-ARS, U.S. Horticultural Research Laboratory South Rock Road Fort Pierce, FL. p.1-3.
67. Hernández, A., Ascanio, M., Cabrera, A., Morales, M. y Medina, N. 2004. Correlación de la nueva versión de clasificación genética de los suelos de cuba con World Reference Base. Conferencia en Postgrado de Clasificación de suelo. 14p.
68. Hernández, D., Rodríguez, J.L., González, C. y Fortes, H. 2013. *Brachyacantha bistrípustulata* Fabric. (Coleoptera: Coccinelidae), primer informe como enemigo natural de *Diaphorina citri* Kuw. en Ceiba del Agua. Resúmenes del IV Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical. Mayabeque, Cuba. p. 56.
69. Hung, T.H., Wu, M.L. and Su, H.J. 2001. Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus huanglongbing. Eur. J. Plant Pathol. 107: 183-189.
70. Husain, M.A. and Nath, D. 1927. The citrus psylla (*Diaphorina citri* Kuw.) [Psyllidae: Homoptera]. Mem. Dept. Agric. India, Entomol. Ser. 10: 1-27.
71. Ke, S.; Li, K.B.; Ke, C. and Tsai, J.H. 1988. Transmission of the huanglongbing agent from citrus to periwinkle by dodder. Proc. of the 10th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. Eds. IOCV, Riverside, CA. p.258-264.

72. Korsten, L., Jagoueix, S., Bové, J.M. and Garnier, M. 1996. Huanglongbing (greening) detection in South Africa. Proc. of the 13th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. Eds. IOCV, Riverside, CA. p.395-398.
73. Korsten, L., Sanders, G.M., Su, H.J., Garnier, M., Bové, J.M. and Kotzé, J.M. 1993. Detection of citrus greening - infected citrus in South Africa using a DNA probe and monoclonal antibodies. Proc. of the 12th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol., eds. IOCV, Riverside, CA. p.224-232.
74. Lafière, D. and Bové, J.M. 1970. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. C. R. Acad. Sci. Ser. D. 270: 455-465.
75. Lallemand, J., Fos, A. and Bové, J.M. 1986. Transmission de la bacterie associée à la forme africaine de la maladie du 'greening' par le psylle asiatique *Diaphorina citri* Kuwayama. Fruits 41: 341-343.
76. Lee, H.A. 1921. The relation of stocks to mottled leaf of citrus leaves. Phil. J. Sci. 18: 85-95.
77. Lima, H., Cornide, M.T., Álvarez, M. y Frómeta, E. 1988. Clasificación edafoclimática de las localidades citrícolas en Cuba. Agrotecnia de Cuba. 20 (2): 63-74.
78. Lin, C.K. 1956. Observations on yellow shoot on citrus. Etiological studies of yellow shoot of citrus. Acta Phytopathol. Sin. 2: 237-242.
79. Lin, C.K. 1963. Notes on citrus yellow shoot disease. Acta Phytophylact. Sin. 2: 243-251.
80. Llauger, R., Luis, M., Collazo, C., Peña, I., González, C., Batista, L., Teixeira, D., Martins, E., Perdomo, A., Casin, J.C., Pérez, J.L., And Cueto, J.R. and Bové, J.M. 2008. Current situation of citrus Huanglongbing in Cuba. Internacional Research Conference on Huanglongbing. Proceedings of the Meeting. Orlando, Florida. p.97.

81. López, D., Luis, M., Llauger, R., González, C. Casín, J.C., Peña, I., Batista, L., Hernández, L., Zamora, V., Hernández, D. 2014. Situación de Huanglongbing de los cítricos en Cuba siete años después de su detección. *CitriFrut*, 31(2): 3-9.
82. López, S.A., Luis, F.Q.B.Q., Martins, E.C., Fassini, C.G. and Sousa, M.C. 2012. Low titers of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in citrus plants exposed to high temperatures results in low acquisition of the bacterium by the insect vector *Diaphorina citri*. Book of abstracts of the XII International Citrus Congress, Valencia, España, p.203.
83. López, S.A., Frare, G.F., Yamamoto, P.T. and Ayres, A. J. 2006a. Inefficacy of pruning to control citrus huanglongbing in Brazil. Proc. of the huanglongbing – Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil. p.49.
84. López, S.A., Luis, F., Oliveira, H.; Mendonça, W.; Furtado, E., Scarpellini, J., Scaloppi, E., Barbosa, J. 2015. Seasonal variation in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' titers in new flushes from citrus trees growing in locations with distinct climates. Proceedings International Research Conference on HLB. Orlando, USA. p.149.
85. López, S.A., Massari, C.A., Barbosa, J.C. and Ayres, A.J. 2017. Huanglongbing in the State of São Paulo – Brazil Current situation, regulation, management and economic impact. Brazil. p.1-6.
86. López, S.A., Martins, E.C. and Frare, G.F. 2005. Detecção de *Candidatus Liberibacter americanus* em *Murraya paniculata*. *Summa Phytopathol.* 31: 48-49.
87. López, S.A., Martins, E.C. and Frare, G.F. 2006b. Detecção de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em *Murraya paniculata*. *Fitopatol. Bras.* 31: 303.
88. Luck, R.F., Morse, L.G. and Gumpf, D.J. 1996. Citrus pest problems and their control in the Near. *FAO Plant Production and Protection.* 135: 1-3.

89. Luis, M. 2014. Aplicación de la tinción con yodo para el diagnóstico indirecto de la enfermedad Huanglongbing de los cítricos. *Citrifrut* 31(1): 43-47. ISSN: 1607-5072.
90. Luis, M., Paredes, C., Peña, I., Batista, L., Hernández, L., López, D., Zamora, V. y Collazo, C. 2017. *Candidatus Liberibacter asiaticus*: once años de diagnóstico molecular en Cuba. Libro de Resúmenes V Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical "Fruticultura 2017". Hotel Nacional de Cuba. p.28. ISBN: 978-959-296-051-0.
91. Manicom, B.Q. and Van Vuuren, S.P. 1990. Symptoms of greening disease with special emphasis on African greening. Proc. of the 4th Intl. Asia - Pacific Conf. Citrus Rehabilitation, Chang Mai, Thailand. p.127-131.
92. Manzanilla-Ramírez, M.A., Robles-González, M.M., Velázquez-Monreal, J.J., Orozco-Santos, M. y Carrillo-Medrano, S.H. 2012. Experiencias y perspectivas del Huanglongbing en Limón Mexicano. Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. Veracruz, México. p.406-414.
93. Márquez, F.J. 2016. Análisis espacial y temporal del Huanglongbing de los cítricos (HLB), en el Municipio de Xalisco, Nayarit. Tesis presentada en opción al título de "Ingeniero Agrónomo. Especialista en Parasitología Agrícola". Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Texcoco. Edo de México.
94. Martínez, A.L. and Wallace, J.M. 1967. Citrus leaf - mottle - yellow disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. *Plant Dis. Rep.* 51: 692-695.
95. McClean, A.P.D. and Oberholzer, P.C.J. 1965a. Citrus psylla, a vector of greening disease of sweet orange. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 8: 297-298.

96. Mcclean, A.P.D. and Oberholzer, P.C.J. 1965b. Greening disease of sweet orange: Evidence that it is caused by a transmissible virus. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 8: 253-276.
97. Mcclean, A.P.D. and Schwarz, R.E. 1970. Greening or blotchy - mottle disease of citrus. *Phytophylactica* 2: 177-194.
98. Mella, C. 2017. *Economía & Negocios*. Editora Listín Diario. [en línea]. Disponible en: <https://www.listindiario.com/economia.htm>. [Consulta: 29 enero, 2018].
99. Moll, J.N. and Van Vuuren, S.P. 1977. Greening disease in Africa. *Prot. Intl. Soc. Citricult.* 3: 903-912.
100. Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J.I., Velázquez-Monreal, J., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S. y González-Gómez, R. 2013. Situación Actual y Perspectivas del Manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 32(2): 108-119
101. Moreno, P., Da Graça, J.V. and Yokomi, R.K. 1996. The Huanglongbing a review. *Proc. of the 13th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol.* Eds. IOCV, Riverside, CA. p.5-6.
102. Nariani, T.K., Raychaudhuri, S.P. and Viswanath, S.M. 1973. Tolerance to greening in certain citrus species. *Curr. Sci.* 42: 513-514.
103. NC 77-11. 1981. *Métodos de Ensayo. Frutos y Vegetales Naturales.* 4 p.
104. NC-ISO IDT 2173. 2001. *Productos de Frutas y Vegetales. Determinación del contenido de sólidos solubles. Código refractométrico.* 9 p.
105. NC-ISO IDT 750. 2001. *Productos de Frutas y Vegetales. Determinación de la acidez valorable.* 8 p.
106. Oberholzer, P.C.J., Von Standen, D.F.A. and Basson, W.J. 1965. Greening disease of sweet orange in South Africa. *Proc. of the 3rd Conf. Intl. Organ. Citrus Virol.* W. C. Price, ed. Univ. Florida Press, Gainesville, FL. p.213-219.

107. Ôtake, A. 1990. Bibliography of citrus greening disease and its vectors attached with indices, and a critical review on the ecology of the vectors and their control. Jap. Intl. Coop. Agency. p.5-11.
108. Peña, I., López, D., Luis, M., Collazo, C., Llauger, R., Casín, J. 2009. Síntomas asociados al Huanglongbing de los cítricos en Cuba. Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología. División Caribe, 48, Ciudad de La Habana (Cuba). 13(1): 58.
109. Pérez, M.C.; Correa, A.; Morera, S. y Ruiz, P. 2001. La industria cítrica cubana. Revista Todo Citrus. (15): 34 - 45.
110. Ramadugu, C., Stover, E., Keremane, M., Roose, M. and Lee, R. 2017. Buscando tolerancia y/o resistencia a Huanglongbing en géneros afines a los cítricos. Resúmenes V Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical "Fruticultura 2017". Hotel Nacional de Cuba. p.31. ISBN: 978-959-296-051-0.
111. Raychaudhuri, S.P., Nariani, T.K. and Lele, V.C. 1969. Citrus die - back problem in India. Proc. of the 1st Intl. Citrus Symp. 3: 1433-1437.
112. Raychaudhuri, S.P.; Nariani, T.K.; Ghosh, S.K.; Viswanath, S.M. and Kumar, D. 1974. Recent studies on citrus greening in India. Proc. of the 6th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. Eds. Univ. California, Div. Agric. Sci. p.53-57.
113. Robles, P. 2011. Antecedentes, situación actual y perspectivas de áreas regionales para su manejo. Veracruz, México. (Editorial) INIFAP. p.1-71.
114. Robles-González, M.M., Velázquez-Monreal, J.J.; Manzanilla-Ramírez, M.A., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V.M., López-Arroyo, I., Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el Estado de Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura. 19(1): 15-31.
115. Robles-González, M.M., Velázquez-Monreal J.J., Manzanilla-Ramírez, M.A., Orozco-Santos, M. 2015. Current status of Huanglongbing disease affecting

- Mexican lime in the state of Colima, Mexico. Proceedings International Research Conference on HLB 2015. Orlando, USA. p.238.
116. Robles-González, M.M., Orozco-Santos, M., Manzanilla-Ramírez, M.A., Velázquez-Monreal, J.J., Carrillo-Medrano, S.H. 2017. Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón mexicano en Colima, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8(5): 1101-1111.
117. Rodríguez, R. 1991. Distancias de plantación de 5m x 8m para el pomelo 'Marsh' sobre naranjo agrio. *Agroindustria*. 1 (3): 27-29.
118. Roistacher, C.N. 1996. The economics of living with citrus diseases: Huanglongbing (greening) in Thailand. Proc. of the 13th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol., eds. IOCV, Riverside, CA. pp. 279-285.
119. SAGARPA. 2014. Estadísticas de producción de Limón Persa. [en línea]. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2011B369.aspx>. [Consulta: julio, 12 2017].
120. Salcedo, D., Mora, G., Covarrubias, I., Cíntora, C., Hinojosa, R., Depaolis, F. y Mora, S. 2011. Evaluación del impacto económico de la enfermedad de los cítricos Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana. *COMUNICA. Sanidad agropecuaria*. p.40-47.
121. Santos, I. 2013. Monografía del Huanglongbing (*Candidatus liberibacter* spp.) de los Cítricos. Trabajo de experiencia recepcional. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Agrícolas. Campus Xalapa. Xalapa Enríquez, Veracruz. México. 43 p.
122. Schwarz, R.E. 1967. Results of a greening survey on sweet orange in the major citrus growing areas of the Republic of South Africa. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 10: 471-476.
123. Schwarz, R.E. 1968a. Greening disease. Pages Indexing Procedures for 15 Virus Diseases of Citrus. USDA ARS Agric. Handbook. (333): 87-90.

124. Schwarz, R. E. 1968b. Indexing of greening and exocortis through fluorescent marker substances. Proc. of the 4th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. J.F.L. Childs, eds. IOCV, Riverside, CA. p.118 - 124.
125. Schwarz, R.E. 1968c. Thin layer chromatographical studies on phenol markers of the greening virus in various citrus species. S. Afr. J. Agric. Sci. 11: 797-801.
126. Soto-Leal, Mónica. 2013. Respuesta fisiológica y bioquímica de plantas de limón mexicano infestadas con *Candidatus Liberobacter asiaticus*. Tesis presentada en opción al Título de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Sinaloa. Guasabe, Sinaloa, México.
127. Spann, T.M. 2012. Management of Huanlongbing in citrus with mineral nutrients, en: Memoria del IV Simposio Nacional y III Internacional de Bacterias Fitopatógenas Mini simposio HLB de los Cítricos. Guadalajara Jal. México. p.12-18.
128. Spreen, T.H. 2003. Mercado mundial para cítricos. Memoria Encuentro Interamericano de Cítricos. pp. 19-21.
129. STATISTICA. 2003. (Data analysis software system), StatSoft, Inc. version 6,0. Tulsa, AZ, USA, www.statsoft.
130. Su, H.J. and Wu, R.Y. 1979. Preliminary study on the etiology of Wentan pomelo decline. Proc. of the ROCUIS Coop. Sci. Sem. Mycoplasma Dis. Plants. Nat. Sci. Council Symp. Ser. (1): 45 – 57.
131. Sutton, B.D., Duan, Y.P., Halbert, S., Sun, X.A.; Schubert, T. and Dixon, W. 2005. Detection and identification of citrus Huanglongbing (greening) in Florida, USA. Proc. of the 2nd Intl. Citrus Canker and Huanglongbing Workshop, Orlando, FL. p.59.
132. Teixeira, D.C., Ayres, A.J., Kitajima, E.W., Tanaka, F.A.O., Danet, J.L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C. and Bové, J.M. 2005a. First report of a

- Huanglongbing - like disease of citrus in São Paulo State, Brazil, and association of a new liberibacter species, "*Candidatus liberibacter americanus*", with the disease. *Plant Dis.* 89: 107.
133. Teixeira, D.C., Danet, J.L., Eveillard, S., Martins, E.C., Jesús Junior, W.C. Yamamoto, P.T., López, S.A., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C. and Bové, J.M. 2005b. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the "*Candidatus liberibacter*" species associated with the disease. *Mol. Cell. Probes* 19: 173-179.
134. Teixeira, D.C., Saillard, C., Jagoueix-Eveillard, S., Danet, J.L., Ayres, A.J. and Bové, J.M. 2005c. "*Candidatus liberibacter americanus*" associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1857-1862.
135. Tirtawidjaja, S. 1980. Citrus virus research in Indonesia. Proc. of the 5th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. W.C. Price, ed. Univ. Florida Press, Gainesville, FL. p.129-132.
136. Toorawa, P. 1998. La maladie du Huanglongbing (greening) des agrumes a l'île Maurice. Detection de "*Candidatus liberibacter asiaticus*" et "*Candidatus liberibacter africanus*" dans les agrumes et les insectes vecteurs. Doctoral Thesis, L'Université de Bordeaux.
137. Van den Berg, M.A., Van Vuuren, S.P. and Deacon, V.E. 1992. Studies on greening disease transmission by the citrus psylla, *Trioza erytreae* (Hemiptera: Triozidae). *Israel J. Entomol.* (25-26): 51-56.
138. Van der Merwe, A.J. and Andersen, F.G. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Fmg. S. Afr.* 12: 439-440.
139. Vanaclocha, P. y Stansly, P.A. 2015. The Citrus greening (HLB) bibliographical database. Proceedings International Research Conference on HLB 2015. Orlando, USA. p. 222.

140. Vázquez, O., Chavez, S., Kunta, M., Braswell, E., Keremane, M.L., Lee, R.F. and Louzada, E.S. 2015. Distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in roots of Sour orange rootstock grafted with Valencia Sweet orange in Texas. Proceedings International Research Conference on HLB 2015. Orlando, USA. p.150.
141. Velázquez, M.J. 2011. Situación actual del Huanglongbing de los cítricos (HLB) en México. XIII Congreso Internacional/XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Tlaxcala. INIFAP. SAGARPA. México. 12 p.
142. Wulff, N.A., Teixeira, D.C., Martins, E.C., Leite, A.P.R., Padiar, N.R.H., Mariano, A.G., Carmo, A. E., Abrahão, D.P., Sousa, M.C., Ayres, A.J. and Bové, J.M. 2006. Huanglongbing diagnosis. Proc. of the Huanglongbing - Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil. p.17.
143. Xu, C.F., Xia, Y.H.; Li, K.B. and Ke, C. 1988. Further study of the transmission of citrus Huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. Proc. of the 10th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol., eds. IOCV, Riverside, CA. p.243-248.
144. Yamamoto, P.T., Felipe, M.R., Garbim, L.F., Coelho, J.H.C., Ximenes, N.L., Martins, E.C., Leite, A.P.R.; Sousa, M.C.; Abrahão, D.P. and Braz, J.D. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus liberibacter americanus*. Proc. of the Huanglongbing - Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil. p.96.
145. Yang, H., Bourcier, E., Zhao, W., Bai, J., Plotto, A., Baldwin, E., Irey, M. 2015. Effect of Huanglongbing on volatile components in peel oil of 'Valencia' oranges. Proceedings International Research Conference on HLB 2015. Orlando, USA. p.266.
146. Yulu, X. 2014. Experiences of management of the newly established groves under severe HLB stress in China. Ron Sequeira, USDA, APHIS, PPQ,

- Center for Plant Health and Science and Technology XU Changbao, CEN Yijing, DENG Xiaoling, South China Agricultural University, Guangdong, China DU Yuying, Yangcun Citrus Institute, Guangdong, China. p.1-5.
147. Zhang, M.Q., Guo, Y., Powell, C.A., Doud, M.S., Yang, C.Y., Zhou, H. and Duan, Y.P. 2016. Zinc treatment increases the titre of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Huanglongbing affected citrus plants while affecting the bacterial microbiomes. *Journal of Applied Microbiology*. p.13. ISSN 1364-5072.
148. Zhao X.Y. 2006. Huanglongbing in China. Proc. of the huanglongbing - Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil. p. 3.
149. Zhao, H., Sunb, R., Albrechte, U., Padmanabhana, C., Wanga, A., Coffeya, M.D., Girkeb, T., Wangf, Z., Closeb, T.J., Rooseb, M., Yokomig, R.K., Folimonovah, S., Vidalakisa, G., Rousei, R., Bowmane, K.D. and Jina, H. 2013. Small RNA Profiling Reveals Phosphorus Deficiency as a Contributing Factor in Symptom Expression for Citrus Huanglongbing Disease. Edited by the Molecular Plant Shanghai Editorial Office in association with Oxford University Press on behalf of CSPB and IPPE, SIBS-CAS. 11 p.
150. Zhao, X.Y. 1981. Citrus yellow shoot (huanglongbing) in China: A review. *Proc. of the Intl. Soc. Citricult.* 1: 466-469.