

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA

GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y AGROAMBIENTAL



**“MANEJO ACTUAL PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL
DEL HUANGLONGBING (HLB) DE LOS CÍTRICOS”**

**TRABAJO FIN DE GRADO
MARZO-2023**

**Autora: Esther Muries Berenguer
Tutor: Miguel Juárez Gómez**



RESUMEN

“MANEJO ACTUAL PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DEL HUANGLONGBING (HLB) DE LOS CÍTRICOS”

El Huanglongbing, también conocido como “enverdecimiento de los cítricos”, es una de las enfermedades más devastadoras de los cítricos, y ha causado la devastación de numerosas áreas de cultivo en todo el mundo durante las últimas décadas. Esta enfermedad, limitada al floema, está asociada a tres microorganismos denominados “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Candidatus Liberibacter americanus*” y “*Candidatus Liberibacter africanus*”, los cuales, son diseminados por los psílidos vectores “*Trioza erytrae*” y “*Diaphorina citri*”. Hasta el momento, no existe una cura establecida para el HLB, por lo que los esfuerzos se han centrado en la prevención de su entrada a nuevas áreas. Para combatir esta enfermedad, se hace necesaria la introducción de estrategias multidisciplinarias. En el presente trabajo, se expondrá una exhaustiva revisión de la información científica de la que se dispone actualmente sobre los antecedentes del HLB, y sobre los métodos existentes para su prevención, así como los desafíos a los que se enfrenta la comunidad científica y los productores de cítricos ante el control de esta enfermedad.

Palabras clave: Huanglongbing, HLB, *Candidatus Liberibacter* spp., *Trioza erytrae*, *Diaphorina citri*.

ABSTRACT

“CURRENT MANAGEMENT FOR THE PREVENTION AND CONTROL OF HUANGLONGBING (HLB) FROM CITRUS”

Huanglongbing, also known as “citrus greening”, is one of the most devastating diseases of citrus, having caused the devastation of many growing areas around the world during the last decades. This disease, limited to the phloem, is associated with three microorganisms called “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Candidatus Liberibacter americanus*” and “*Candidatus Liberibacter africanus*”, which are spread by the psyllid vectors “*Trioza erytrae*” and “*Diaphorina citri*”. Up to now, it does not exist an established cure for HLB, so efforts have focused on preventing its entry into new areas. To combat this disease, it is necessary to introduce multidisciplinary strategies. In the present work, an exhaustive review of the scientific information that is currently available on the background of HLB, and about the existing methods for its prevention will be exposed, as well as the challenges faced by the scientific community and citrus producers in the control of this disease.

Keywords: Huanglongbing, HLB, *Candidatus Liberibacter* spp., *Trioza erytrae*, *Diaphorina citri*.



Debo agradecer de manera especial a D. Miguel Juárez Gómez por haber confiado en mí, por invertir su tiempo en guiarme durante la realización de este trabajo y por ser, en definitiva, un gran profesor.

A mis profesores, por haber compartido conmigo vuestro conocimiento.

A mi familia, por apoyarme siempre en mis decisiones.

A mis amigos, porque siempre están ahí cuando necesito una cerveza después de un gran esfuerzo.

A Ernesto, por darme el impulso cuando lo veo todo negro y me faltan fuerzas para seguir.

A todos los agricultores que he conocido durante estos años, pues me han mostrado su amor por la tierra que cultivan, y también por las pequeñas pero grandiosas cosas que ocurren en el campo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.2. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS	8
1.2 ENFERMEDAD DEL HUANGLONGBING	11
1.2.1. HISTORIA.....	11
1.2.2. AGENTE CAUSAL	12
1.2.3. VECTORES	15
1.2.3.1. <i>Trioza erytreae</i>	16
1.2.3.2. <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama.	19
1.2.4 SINTOMATOLOGÍA.....	22
1.2.5. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN ESPAÑA	23
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS	25
4. MANEJO DE LAS EPIDEMIAS DE HLB EN CÍTRICOS	26
4.1. MÉTODOS DE DIAGNOSTICO	26
4.2. ESTRATEGIAS PARA PREVENIR LAS EPIDEMIAS CAUSADAS POR HLB	27
4.2.1. USO DE MATERIAL VEGETAL SANO	27
4.2.2. ESTRATEGIAS DE DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD: MUESTREOS.....	28
4.2.3. MEDIDAS A ADOPTAR UNA VEZ SE CONFIRMA LA PRESENCIA DE LA ENFERMEDAD	29
4.2.4. CONTROL DE HLB MEDIANTE EL MANEJO DE LOS INSECTOS VECTORES	31
4.2.4.1. CONTROL BIOLÓGICO (C. B.)	32
4.2.4.1.1. C. B. CLÁSICO	32
4.2.4.1.2. C. B. PREVENTIVO	33
4.2.4.2. CONTROL BIOTECNOLÓGICO MEDIANTE APLICACIÓN DE RNA DE INTERFERENCIA.....	34
4.2.4.3. CONTROL MEDIANTE PRODUCTOS FITOSANITARIOS	34
4.2.4.4. MEDIDAS PARA EVITAR EL ESTABLECIMIENTO DE VECTORES EN NUEVAS ÁREAS.	35
4.3. ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LA ENFERMEDAD QUE CAUSA <i>C. Liberibacer</i> spp. EN LA PLANTA.	36
4.3.1 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD A NIVEL DE PATÓGENO... ..	36

4.3.1.1. GESTIÓN DE HLB CON PRODUCTOS QUÍMICOS ANTIMICROBIANOS ...	36
4.3.1.2. TERMOTERAPIA	38
4.3.2. ESTRATEGIAS DE MANEJO A NIVEL HUESPED	39
4.3.2.1. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO DE LA PLANTA	39
4.3.2.2. SELECCIÓN DE MATERIAL TOLERANTE	40
4.3.2.3. NUTRICIÓN	41
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	42
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Encuadre taxonómico de <i>Candidatus Liberibacter</i>	13
Figura 2: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de células de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> ubicadas en el tubo criboso del floema de cítricos. Fuente: (EPPO, 2022).	13
Figura 3: Distribución mundial de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> . Fuente: (Adaptado de EPPO, 2022).	14
Figura 4: Distribución mundial de <i>Candidatus Liberibacter africanus</i> . Fuente: (Adaptado de EPPO, 2022).	14
Figura 5: Distribución mundial de <i>Candidatus Liberibacter americanus</i> . Fuente: (Adaptado de EPPO 2021).	15
Figura 6: Encuadre taxonómico de <i>Trioza erytraeae</i>	16
Figura 7: A: Huevos de <i>Trioza erytraeae</i> . Fuente: EPPO. (B): Ninfas de <i>Trioza erytraeae</i> . Fuente: EPPO. (C): Adulto macho de <i>Trioza erytraeae</i> . Fuente: Phytoma 2022.	18
Figura 8: Daños provocados por <i>Trioza erytraeae</i> en hoja. Fuente: (IVIA; https://ivia.gva.es/es/prevencion-greening).	18
Figura 9: Distribución mundial de <i>Trioza erytraeae</i> . Fuente: (EPPO, 2022).	19
Figura 10: Encuadre taxonómico de <i>Diaphorina citri</i>	20
Figura 11: <i>Diaphorina citri</i> : (A) Huevos. (B): Ninfas con secreciones cerasas. (C): Adulto. Fuente: (EPPO, 2022).	21
Figura 12: Distribución mundial de <i>Diaphorina citri</i> . Fuente: (EPPO, 2022).	21
Figura 13: Síntomas característicos del HLB. A: Moteado clorótico irregular en hojas. B: Senescencia de ramas de <i>Citrus sinensis</i> . C: Desviación del eje en <i>Citrus sinensis</i> . D: Semillas de mandarina abortadas infectadas por <i>C. L. asiaticus</i> . E: Síntomas en fruto, inversión de color en la maduración. Fuente: EPPO.	23

Figura 14: Procedimiento de inspección para la búsqueda de síntomas del HLB (Fuente: (MAPA, 2021)..... 29

Figura 15: Diagrama esquemático del sistema del sistema de tratamiento térmico móvil (MHTS) y sus componentes. Fuente: (Ghatrehsamani et al., 2019). 38

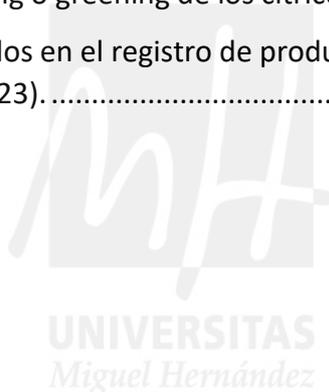
ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Producción mundial de naranjas, limones, limas, mandarinas y pomelo mundial (FAOSTAT 2020)..... 9

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Medidas a adoptar en caso de detección de la enfermedad del HLB. Fuente: (Plan de contingencia de *Candidatus Liberibacter* spp. bacterias asociadas a la enfermedad del Huanglongbing o greening de los cítricos, 2021). 30

Tabla 2: Insecticidas autorizados en el registro de productos fitosanitarios para el control de Psílicos (MAPA, 2023). 34



1. INTRODUCCIÓN

1.2. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS

El cultivo de los cítricos está ampliamente extendido a nivel mundial, existen unas 1800 especies dentro de los más de 160 géneros de Citrus y sus frutos son apreciados tanto en el mercado nacional como internacional por sus cualidades organolépticas, su alto contenido en vitamina C, fibra, compuestos fenólicos como los flavonoides (hesperidina, naringina, diosmina y rutina) que poseen actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, antialérgicas y propiedades antioxidantes (Carrol et al., 2000) entre otros beneficios.

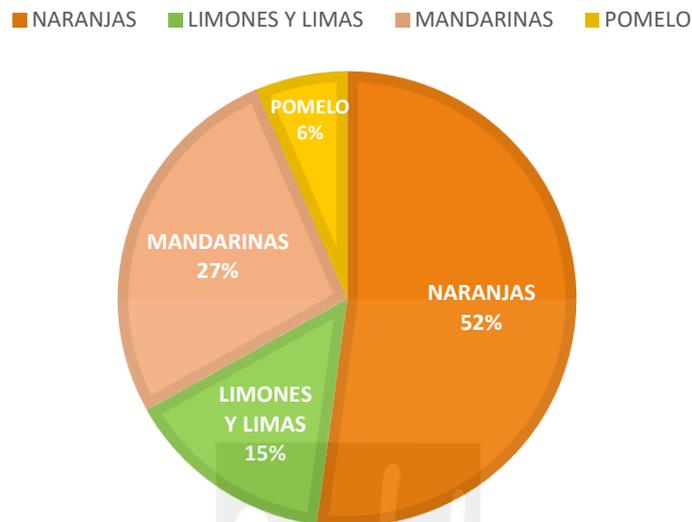
Su consumo principal es en fresco, aunque también se comercializan como IV gama y en forma de zumos, néctares, mermeladas o jaleas, además son una excelente materia prima para la elaboración de aceites esenciales, pigmentos, harinas y piensos, donde también se aprovechan sus flores y corteza.

Estas plantas de la familia de las Rutáceas poseen una anatomía con características únicas y aunque existen controversias acerca de su origen, una de las teorías más aceptadas es que la mayoría de las especies de cítricos proceden de las regiones tropicales y subtropicales del Sureste Asiático y el Archipiélago Malayo (Swingle & Reece., 1967) desde donde se expandieron a otros continentes.

El cultivo de los agrios es muy importante a nivel económico y su producción aumenta en torno al 0,5 % cada año. En 2020 se produjeron 159 toneladas de cítricos en el mundo, el 28% de las cuales provinieron de China como país pionero en la producción de estos cultivos. Otros países, por orden de importancia son Brasil como el mayor productor de naranjas, India el de limones y limas, Argentina, México, EE. UU, España, Egipto, Indonesia, Turquía y Sudáfrica (FAOSTAT, 2020).

En cuanto a España, la producción total de cítricos en 2020 fue de 6,7 toneladas, de las cuales el 50% fueron de Naranja, el 32% de Mandarina y el 16% de limón y el 1% de

Pomelo. Entre las comunidades con mayores plantaciones destacan La Comunidad Valenciana, la región de Murcia, Andalucía y Cataluña. Las 2 primeras dedican gran parte de su superficie al cultivo de estas especies por lo que se deduce la importancia que posee para la economía de estas regiones.



Gráfica 1: Producción mundial de naranjas, limones, limas, mandarinas y pomelo mundial (FAOSTAT, 2020).

Las especies de cítricos tienen una vida muy larga, se establece su cultivo como una inversión a largo plazo, ya que, por lo general requieren de 5 a 8 años para generar sus primeros frutos. Tanto en este periodo como durante su madurez, las plantas están expuestas a diferentes agentes fitopatógenos como las bacterias, los virus y los hongos, los cuales, en la mayoría de los casos estarán presentes en el árbol durante todo su ciclo vital (Febres, 2011). Además, otros desafíos importantes para mantener su rendimiento son: la sequía, las inundaciones, el frío, el calor excesivo, el viento y la salinidad del suelo, factores que cada vez son más recurrentes debido al cambio climático (Balfagón et al., 2021).

En cuanto a las principales enfermedades de este cultivo en el mundo destacarían por una parte las de etiología fúngica, como la “Gomosis” causada por *Phytophthora spp.*, la “Mancha Negra” o Citrus Black Spot (CBS) ocasionada por el hongo *Phyllosticta citricarpa*, la “Mancha grasienta” originada por *Mycosphaerella citri*, la “Podredumbre gris” por *Botrytis cinerea* y el “Mal seco” por *Phoma tracheiphila*. Por otra parte, las

producidas por virus como el Virus de la tristeza de los cítricos (VTC) el cual, se transmite por el uso de yemas enfermas y por varias especies de pulgones y ha ocasionado la muerte de millones de árboles injertados sobre pie de naranjo amargo (Agustí, 2010). Y por último, las enfermedades de origen bacteriano, entre las que destacarían el “Chancro de los cítricos” causada por las especies *Xanthomonas citri* subsp. *citri* y *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* que se encuentra distribuida en más de 30 países pertenecientes a Asia, África, América y Oceanía y que ha ocasionado enormes pérdidas en las plantaciones de cítricos (Stall & Civerolo., 1991), y el Huanglongbing (HLB) de los cítricos, considerada en la actualidad la enfermedad más destructiva del cultivo de los cítricos a nivel mundial debido a su rápida dispersión y devastación (Wang et al., 2017).

El HLB está asociado a diferentes cepas de la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.* y está presente en los vegetales que han sido infectados por los hemípteros *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri*, principales vectores de esta enfermedad (Zhang et al., 2014), por semilla infectada (Camacho-Tapia et al., 2011) y por injerto. Esta enfermedad provoca grandes consecuencias económicas en la industria de producción y procesado de los cítricos, y ha sido reportada en 51 de las 140 regiones productoras de cítricos del mundo (Wang, 2019). En Florida ha causado pérdidas de hasta el 73% de la producción (USDA 2021), en China ha destruido más de 50 millones de árboles desde que fue detectada (Pandey et al., 2021) y en Brasil ha ocasionado la reducción del 31% de la producción cítrica. En España, donde todavía no se ha detectado, se ha incrementado el riesgo de la entrada de la enfermedad por la aparición en algunas regiones de España y Portugal del vector *Trioza erytreae*.

A pesar de que se han producido grandes progresos en la comprensión de la transmisión y las respuestas de la planta a la enfermedad, aun no se ha descrito ningún método efectivo para la erradicación del HLB y todavía existen grandes desafíos atribuidos en gran parte a que la bacteria causal no cumple con los postulados de Koch y por el momento no ha podido ser cultivada en medios artificiales (Chen et al., 2022). Sin embargo, existen algunas prácticas que se han llevado a cabo hasta el momento en las regiones donde está presente, como la identificación y la tala de árboles afectados,

tratamientos químicos para el control de vectores y antibióticos, además de otras prácticas que expondremos en el presente trabajo.

1.2 ENFERMEDAD DEL HUANGLONGBING

1.2.1. HISTORIA

Se han descrito tres especies como causantes del HLB, *Ca. L. asiaticus* (CLas), *Ca. L. africanus* (CLaf), y *Ca. L. americanus* (CLam), las cuales, fueron evolucionando de diferente manera en el continente que les da nombre.

Existen muchas nomenclaturas para esta enfermedad, en China es conocida como “Huanglongbing” que significa “dragón amarillo”, en la India como “Dieback”, “Likubin” en Taiwán, “greening” en Sudáfrica y EE. UU., “Leaf Mottle” en Filipinas etc.

El origen del HLB es todo un misterio, Beattie & Broadbent (2005) sugirieron que los ancestros de las bacterias causales y sus insectos vectores pudieron haber coexistido en Gondwana, y cuando se separó propició la evolución de las especies africanas y asiáticas tanto del patógeno como del vector. Más tarde revisaron esta hipótesis y sugirieron que el HLB pudo originarse en África, posiblemente en un huésped asintomático como *Verpris lanceolata* y transmitido a los cítricos por insectos vectores e introducido por los portugueses en la India hace 300-500 años (Beattie et al., 2006). Esta hipótesis fue rechazada por Teixeira *et al.* (2008a) quienes han calculado que las tres especies conocidas de bacterias HLB se separaron hace millones de años.

El HLB se describió por primera vez en China en 1919 por Reinking, quien usó la palabra inglesa “yellow shoot” para referirse a la enfermedad, la cual se consideraba de poca importancia en aquellos días. Sin embargo, en 1936 se demostró que se había extendido hasta convertirse en un problema grave. Uno de los trabajos más extensos sobre el HLB fue realizado por Lin Kung Hsiang entre 1941 y 1955 quien, además, fue el primero en demostrar que se producía debido a un agente infeccioso (Bové, 2006). Durante las discusiones con los agricultores del condado de Chaozhou en la provincia de Guangdong, China, se supo que el HLB en realidad había estado allí desde la década de 1870.

Basándose en ello (Lin, 1956) postuló que la enfermedad se originó en la provincia de Guangdong, donde los agricultores le habían atribuido el nombre de “huang long bing” donde “huang” significa amarillo, “long” significa dragón y “bing” enfermedad, por lo que la enfermedad se denominó “enfermedad del dragón amarillo”. Por esta razón en 1995, la Organización Internacional de Virólogos de Cítricos (IOCV) aceptó el nombre oficial de huanglongbing para esta enfermedad en su 13ª conferencia en Fuzhou (Fujian, China) (Paudyal, 2015).

A mediados del siglo XVIII también se registró las provincias centrales de la India una enfermedad denominada “Dieback”, pero la causa se atribuyó al virus de la tristeza (Capoor, 1963). Más tarde Raychaudhuri *et al.* (1969) demostraron que los síntomas eran los mismos que los del HLB.

Durante la primera mitad del siglo XX, también se registró la enfermedad en muchos países asiáticos como Filipinas, Taiwán e Indonesia.

Todo ello sugiere que el material vegetal infectado pudo provenir de varias áreas, ya sea desde China o desde la India y, más tarde se produjo una mayor diseminación a través de la transmisión de insectos y el material de propagación infectado.

En la década de los años 90 se estimó que el HLB había sido responsable de la destrucción de más de 60 millones de árboles (Aubert, 1993) pero con las pérdidas acontecidas en Brasil y Florida se cree que el número de muertes habría sido mucho mayor, y se anticipan más pérdidas a medida que la enfermedad amenaza nuevas áreas (Da Graça, 2008).

1.2.2. AGENTE CAUSAL

EL HLB es causado por 3 especies de la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.*, (CL) el epíteto “*Candidatus*” hace referencia a que no puede mantenerse en una “Colección de Cultivo Bacteriológico”, mientras que, “*Liberibacter*” nombre que se ha propuesto como género de la especie, se refiere al líber o floema donde se aloja. El encuadre taxonómico de esta bacteria se muestra en la Figura 1.

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Especie: ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ (Jagoueix et al., 1994).
‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (Jagoueix et al., 1994)
‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (Texeira et al., 2005b)

Figura 1: Encuadre taxonómico de *Candidatus Liberibacter*.

Gracias al microscopio electrónico de transmisión se determinó que la bacteria tiene un diámetro de 0,2-0,3 μm , y una membrana característica de las bacterias Gram negativas, es decir, presenta doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática) además no posee flagelos (Jagoueix et al., 1994) (Figura 2).



Figura 2: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de células de *Candidatus Liberibacter asiaticus* ubicadas en el tubo criboso del floema de cítricos. Fuente: (EPPO, 2022).

La explicación de que *Candidatus Liberibacter* no pueda crecer en medios de cultivo es debida a que su genoma carece de importantes genes de biosíntesis e implicados en la

actividad respiratoria, que compensa obteniendo recursos directamente de la planta hospedadora (Palomo et al., 2017).

La especie más distribuida en el mundo es *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), que está presente en Asia, África, Centro América, América del Norte y América del Sur, mientras que, *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) está presente Brasil y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) en el Continente Africano, Arabia Saudí y Yemen (Figuras 3,4 y 5). CLas y CLam se transmiten a través del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor et al., 1967), mientras que CLaf se transfiere por el psílido africano de los cítricos, *Trioza erytreae* (Del Guercio) (McClellan et al., 1965).



Figura 3: Distribución mundial de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Fuente: (Adaptado de EPPO, 2022).



Figura 4: Distribución mundial de *Candidatus Liberibacter africanus*. Fuente: (Adaptado de EPPO, 2022).



Figura 5: Distribución mundial de *Candidatus Liberibacter americanus*. Fuente: (Adaptado de EPPO 2021).

Las plantas hospedantes de la bacteria incluyen un gran número de árboles y arbustos de la familia *Rutaceae*. En cuanto a los cítricos, precisamente las variedades más comerciales son las más susceptibles (Wang et al., 2009), los síntomas son más graves en naranjas, mandarinas y tangelos, y algo menos severos en limón, pomelo y Kumquat, no obstante, hay muchas otras especies cítricas que los manifiestan (Stout et al., 2006).

En cuanto a los factores climáticos, se ha comprobado que la temperatura tiene un efecto significativo en el desarrollo de *Ca. Liberibacter* y los síntomas que provoca. *Ca. L. africanus* y *Ca. L. americanus* son sensibles al calor mientras que *Ca. L. asiaticus* es tolerante, lo que podría explicar la distribución de estas especies y de sus vectores (Munyanza et al., 2012). El desarrollo de los síntomas en las plantas infectadas por *Ca. L. africanus* sucede de 30 a 32 °C, a diferencia de *Ca. L. asiaticus*, cuyos síntomas se desarrollan por encima de los 35 °C.

1.2.3. VECTORES

Como se ha comentado anteriormente, los psílidos *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* son los insectos vectores de la enfermedad, sin embargo, se han identificado 2 nuevas especies de psílidos que son portadores de la bacteria. Se trata de *Diaphorina communis* (Donoban et al., 2012) y *Cacopsylla citrisuga* (Cen et al., 2012). Se está estudiando la capacidad de ambos de transmitir la enfermedad, aunque parece ser que *Cacopsylla citrisuga* es capaz de infectar la planta con *Ca. L. asiaticus*, lo que la convierte en nuevo

vector del HLB. Además, diversos estudios han comprobado de forma experimental que existe la posibilidad de que la bacteria se transmita también por material vegetal e identifican a la planta parásita *Cuscuta campestris* como transmisora de *Ca. Liberibacter* (Hartung et al., 2010, Li et al., 2021).

En cuanto a la transmisión del HLB por parte de insectos, la bacteria se aloja en la hemolinfa y las glándulas salivales del psílido infectado, y cuando este se alimenta se transfiere a la savia elaborada, donde se propagará por toda la planta a través del floema. Además, se ha demostrado que la transmisión puede ser transovarial, es decir, de la madre al huevo (Halbert & Manjunath, 2004), por lo que las nuevas generaciones también son portadoras de la bacteria.

1.2.3.1. *Trioza erytrae*

Trioza erytrae (Del Guercio, 1918), también conocida como la “psila africana de los cítricos”, es el principal vector de *Candidatus Liberibacter africanus* aunque también es capaz de transmitir CL asiaticus y CL americanus. Fue descrito en Eritrea (África) y además de transmitir la enfermedad del HLB, es una plaga que ejerce daños directos en los cítricos y cualquier especie de la familia de las rutáceas. Por estas razones, *Trioza erytrae* está considerada como una plaga en cuarentena de lucha obligatoria (Directiva 2000/29).

Reino: Animalia
Filo: Arthropoda
Clase: Insecta
Orden: Hemiptera
Suborden: Sternorrhyncha
Superfamilia: Psylloidea
Familia: Triozidae
Género: <i>Trioza</i>
Especie: <i>Trioza erytrae</i>

Figura 6: Encuadre taxonómico de *Trioza erytrae*.

Trioza erytreae es sensible a elevadas temperaturas y baja humedad relativa, ya que en estas condiciones se reduce la eclosión de los huevos y el buen desarrollo de los primeros estadios larvarios. Normalmente la puesta de huevos se dispone en los bordes (Figura 7A) y nervios principales de las hojas y eclosionen entre 6 y 15 días. Existen 5 estadios ninfales que tardan entre 17 y 43 días en convertirse en adultos (Figura 7C), estas ninfas (Figura 7B) se desplazarán lentamente por la hoja hasta posicionarse en el envés, donde comenzará su alimentación, lo que ocasiona el primer daño que éstas producen a la planta, ya que en los puntos donde se nutren de savia aparecen una serie de depresiones que rizan las hojas hacia el interior, por lo que se producen los característicos bultos que esta especie provoca en el haz de las hojas (Figura 8).

Los adultos son alados y su tamaño es de entre 2 y 4 mm de longitud, primero son de color verde pálido y más tarde viran a color marrón claro. Los machos son más pequeños que las hembras y se distinguen por el abdomen, ya que en las hembras termina en forma de punta y el del macho es más redondeado. Una de las características de este insecto es que adoptan una posición para alimentarse en la que elevan el abdomen unos 35°, aproximadamente con respecto a la superficie de la hoja. Los adultos también poseen aparato bucal chupador y se siguen nutriendo del árbol, a consecuencia de los daños en el follaje, los árboles afectados se debilitan progresivamente, presentando escasa masa foliar y caída de flores y frutos.

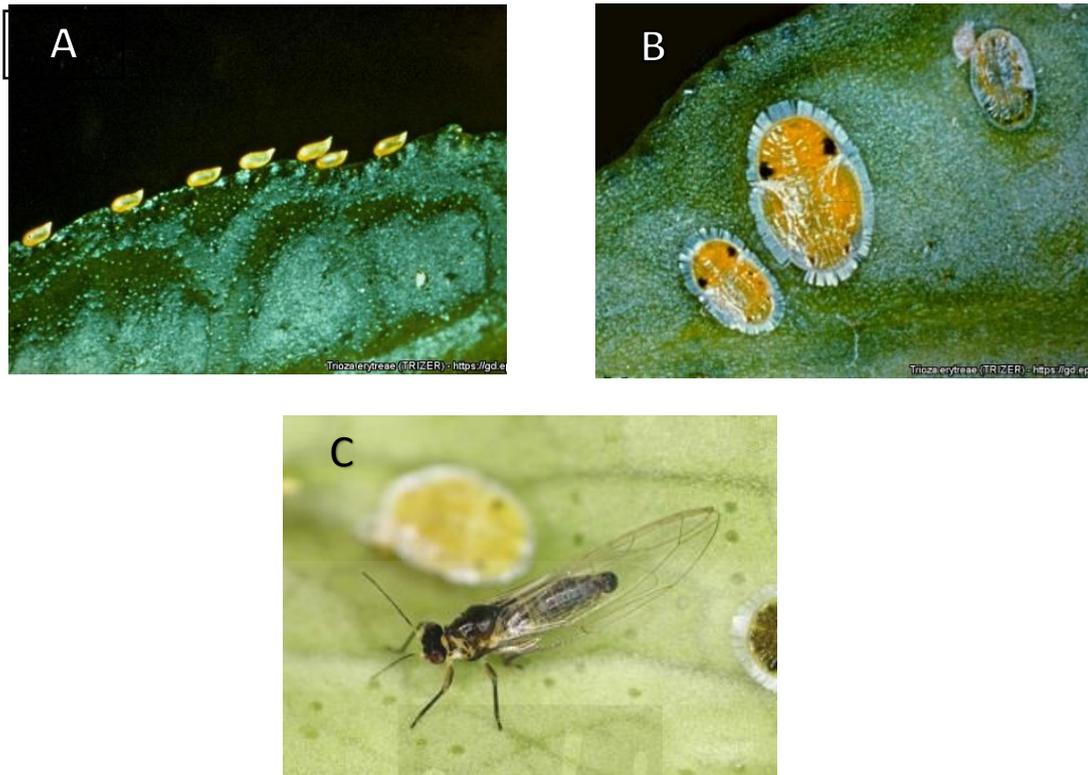


Figura 7: (A): Huevos de *Trioza erytreae*. Fuente: EPPO. (B): Ninfas de *Trioza erytreae*. Fuente: EPPO. (C): Adulto macho de *Trioza erytreae*. Fuente: Phytoma 2022.



Figura 8: Daños provocados por *Trioza erytreae* en hoja. Fuente: (IVIA; <https://ivia.gva.es/es/prevencion-greening>).

Una sola hembra puede poner hasta 2000 huevos durante su vida, y si las condiciones son favorables, esta especie no presenta diapausa y puede completar entre 7 y 8 generaciones anuales. En los climas donde el verano es muy caluroso y seco se producirán unas 3 generaciones.

Tal y como se puede apreciar en la figura 9, la distribución del psílido africano de los cítricos es más amplia que la de *Candidatus Liberibacter africanus*, lo que pone en alerta

a los países donde llega, los cuales suelen elaborar planes de actuación ante la posible entrada de la bacteria causante del HLB.

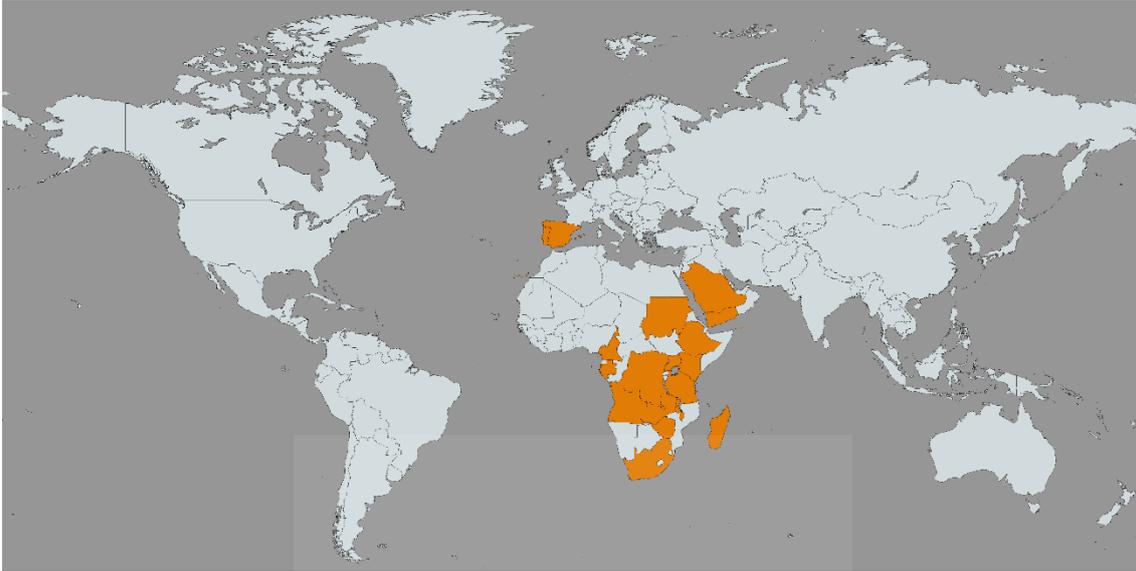


Figura 9: Distribución mundial de *Trioza erytreae*. Fuente: (EPPO, 2022).

1.2.3.2. *Diaphorina citri* Kuwayama.

Diaphorina citri, también conocida como la “psila asiática de los cítricos” es el principal vector de las especies *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Candidatus Liberibacter americanus*. Este psílido fue descrito por primera vez en Taiwán por Kuwayama en el año 1908 (Halbert & Manjunath, 2004) y constituye, al igual que *Trioza erytreae* una plaga en sí misma para los cítricos. Además, la aparición de este vector del HLB en un área libre de su presencia es la que causa más temor, ya que su potencial biótico es mucho mayor que el de la *Trioza*, es más eficiente y se adapta a un rango de temperatura y humedad mucho mayores (Phytoma, 2022).

Reino: Animalia
Filo: Artropoda
Clase: Insecta
Ordena: Hemiptera
Suborden: Sternorrhyncha
Superfamilia: Psylloidea
Familia: Psyllidae
Subfamilia: Liviinae
Tribu: Aphalarini
Género: <i>Diaphorina</i>
Especie: <i>Diaphorina citri</i>

Figura 10: Encuadre taxonómico de *Diaphorina citri*.

Las hembras de esta especie pueden llegar a vivir hasta 52 días, tener hasta 10 generaciones al año y poner unos 800 huevos en el ciclo de su vida (Mead et al., 2011). La ovoposición se realiza sobre los brotes tiernos de la planta (Figura 11A), de hecho, se ha observado que en áreas donde las condiciones climáticas son favorables, el único factor limitante para la puesta de los huevos es la presencia o ausencia de brotes nuevos (Pérez-Artiles et al., 2017). Los huevos son de color amarillo mate y después pasan a color naranja y con forma de almendra, estos eclosionarán entre 2 y 4 días según las condiciones meteorológicas y tras esto se producirán 5 estadios ninfales. Los primeros estadios ninfales no presentan esbozos alares y se mueven lentamente alimentándose de los brotes. A partir del estadio 3 comienzan a presentar esbozos alares y migran hacia otros brotes jóvenes. Durante su alimentación se observa una secreción cerosa que emerge desde la estructura anal (Figura 11B), signo que facilita la identificación de esta plaga (Alemán et al., 2007). A una temperatura de 25 °C transcurridos 15 días desde el primer estadio ninfal, emergerá el adulto. Este medirá entre 3 y 4 mm de longitud y presentará alas, una coloración parda moteada recubierta de un polvo ceroso y ojos rojos. Los adultos se alimentarán de la savia en el envés de las hojas, aunque cuando la población es muy alta, también se observan en el haz. Cuando se nutren forman un ángulo de 30 a 45°, con respecto a la superficie de la hoja (Figura 11C). Existe dimorfismo

sexual, aunque no es muy marcado, los machos presentan los ojos más rojizos que las hembras, y el abdomen más pequeño.



Figura 11: *Diaphorina citri*: (A) Huevos. (B): Ninfas con secreciones ceras. (C): Adulto. Fuente: (EPPO, 2022).

En cuanto a la distribución de *Diaphorina citri*, en la figura 12 se puede observar que es mucho más amplia que la de la *Trioza*, estando presente en gran parte de las zonas cítricas del mundo, por lo que se deduce su gran rango de adaptabilidad a diferentes condiciones y climas.

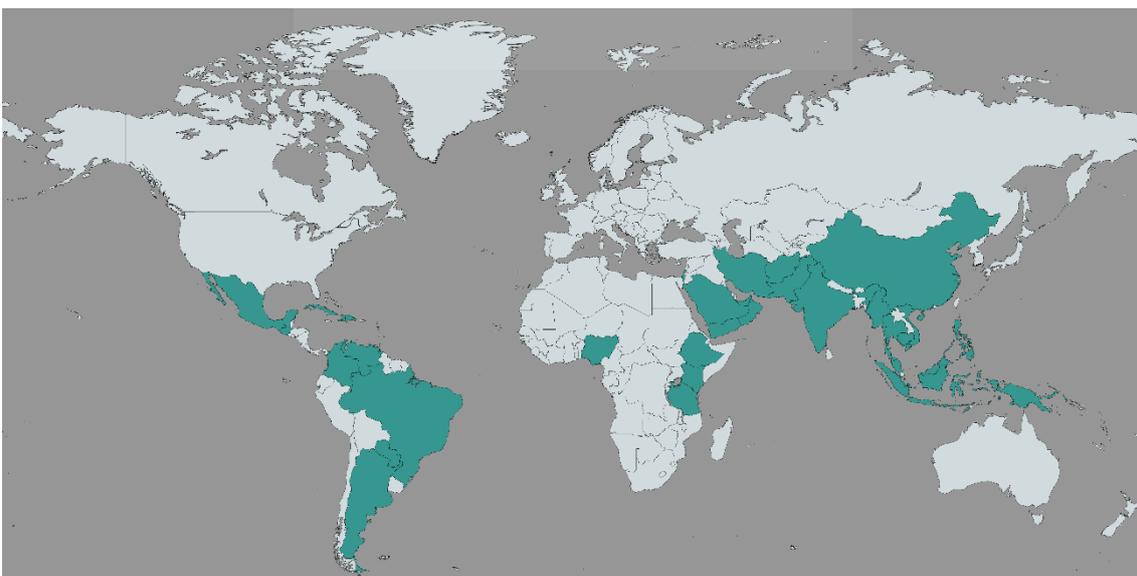


Figura 12: Distribución mundial de *Diaphorina citri*. Fuente: (EPPO, 2022).

1.2.4 SINTOMATOLOGÍA

Los síntomas causados por *Candidatus Liberibacter* son muy variados, poco uniformes, y fácilmente confundibles con los de otras enfermedades de los cítricos, como la gomosis y la clorosis variegada de los cítricos y con deficiencias nutricionales, por lo que se dificulta su identificación (Berger et al., 2019).

Para evitar la propagación de la enfermedad es muy importante la identificación temprana de los síntomas, los cuales, son muy similares entre los diferentes agentes patógenos causantes y las especies de cítricos a las que afectan.

C.L. africanus es sensible al calor, y no causa síntomas a temperaturas mayores de 25 - 30 °C, C.L. americanus presenta aproximadamente la misma tolerancia, sin embargo, C.L. asiaticus es muy tolerante al calor, y es capaz de causar síntomas a temperaturas mayores de 30 °C (Bové, 2006). Estas bacterias están restringidas a los elementos cribosos del floema de las plantas hospedantes, se ha observado que las plantas infectadas muestran una alta acumulación de almidón en los tejidos epidérmico, fundamental y células parenquimáticas del floema, lo que genera una obstrucción y degeneración de este sistema vascular (Achor et al., 2010). Además, produce un taponamiento de los elementos cribosos del floema con calosa, lo que se traduce en una disminución del transporte de fotoasimilados (Koh et al., 2011). Debido a esto, los elementos necesarios para el normal desarrollo de los tejidos de la planta no llegarán en la concentración suficiente. De ahí que uno de los síntomas más característicos de la enfermedad se pueda observar en las hojas, donde estas carencias se manifiestan en forma de moteados cloróticos de simetría irregular (Figura 13A). Este moteado irregular nos facilita la diferenciación de los síntomas causados por las deficiencias nutricionales de Magnesio y Zinc, ya que, en ambos casos la clorosis se presenta de una forma más o menos simétrica (Berger et al., 2019). Además, en el HLB la nervadura central de las hojas se engrosa y se torna amarillenta, mientras que en otras deficiencias se mantiene verde (Polek, 2007).

Otros síntomas que se pueden apreciar durante el transcurso de la enfermedad son la defoliación intensa de las ramas y la muerte de estas (Figura 13B), una fuerte floración

con un pobre cuajado de frutos, los cuales presentan deformaciones, desviación del eje (Figura 13C), tamaño reducido, inversión de color en la maduración (Figura 13D) y semillas abortadas (Figura 13E). Cuando la enfermedad ya está muy avanzada se producirá la muerte del árbol.

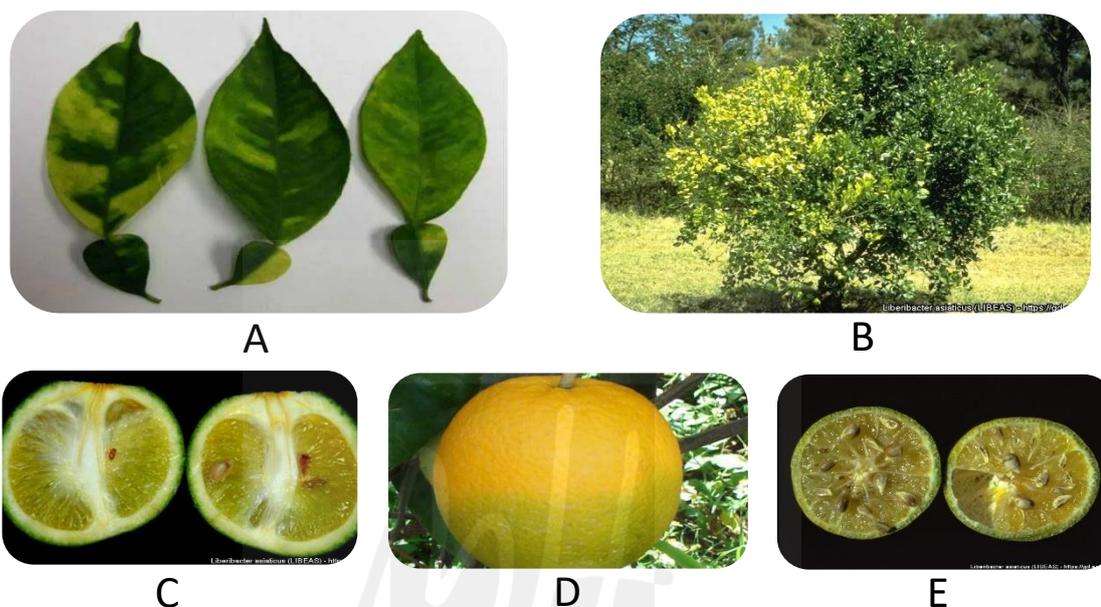


Figura 13: Síntomas característicos del HLB. A: Moteado clorótico irregular en hojas. B: Senescencia de ramas de *Citrus sinensis*. C: Desviación del eje en *Citrus sinensis*. D: Síntomas en fruto, inversión de color en la maduración. E: Semillas de mandarina abortadas infectadas por *C. L. asiaticus*. Fuente: EPPO.

1.2.5. SITUACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN ESPAÑA

Como ya hemos comentado, existe una gran preocupación por la posible llegada de la enfermedad del Huanglongbing a nuevas áreas, y España no es una excepción, por ello en 2021 se elaboraron planes de contingencia tanto del agente causal *Candidatus Liberibacter spp.*, como de sus insectos vectores *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri*, cuyo contenido consta de un protocolo de prospecciones para su detección, las medidas cautelares a adoptar en caso de sospecha de su presencia y un programa de erradicación que consta de cuatro actividades básicas: vigilancia, contención, erradicación y evitar su propagación (MAPA, 2021).

Hasta el momento, ninguna de las bacterias ha sido registrada en la Unión Europea, pero no sucede lo mismo con sus vectores.

Por una parte, hay constancia de que *Trioza erytreae* o psila africana de los cítricos está presente en la UE desde 1994, cuando se detectó en el archipiélago de Madeira (Portugal) debido, probablemente, al transporte de material infectado desde puertos de África (Fernandes & Aguiar, 2001). En 2002 se detectó por primera vez en España en las Islas Canarias y está presente en todas las islas excepto Fuerteventura, La Graciosa y Lanzarote. Durante el año 2014 se constató que *T. erytreae* estaba presente en el norte del país, en concreto en las provincias de Pontevedra y La Coruña y zonas restringidas de Lugo y Orense (Otero et al., 2015) y en 2020 su distribución ha alcanzado la cornisa cantábrica, donde se ha reportado en las comunidades autónomas de Asturias, Cantabria y País Vasco (MAPA).

Por otro lado, la psila asiática de los cítricos *Diaphorina citri* no había sido reportada en la cuenca mediterránea hasta su llegada a Emek Hefer (Israel) en 2021 (Cebolla et al., 2022). Actualmente no se encuentra presente en España, pero su reciente aparición en Israel ligada a su gran potencial biótico es un hecho que pone en alerta al país.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS Hernández

La enfermedad del Huanglongbing está considerada actualmente como una de las mayores amenazas para la citricultura mediterránea, además, no se ha encontrado la forma de controlarla de manera efectiva. Las enormes pérdidas económicas por esta causa en las zonas donde está presente ponen de manifiesto la importancia que posee tener un buen conocimiento de esta enfermedad y la necesidad de anticiparnos a su aparición, además de poder encontrar estrategias que permitan evitar los perjuicios que ocasionaría su entrada a la producción cítrica en las zonas donde aún no se ha registrado. Por todo ello, en el presente Trabajo de Fin de Grado se pretende analizar las diferentes experiencias y estrategias en el mundo en cuanto al manejo de la enfermedad del HLB de los cítricos y sus vectores, identificar los daños que causa en

estos cultivos y estudiar la posible entrada del agente causal en España, así como las posibles actuaciones que se podrían llevar a cabo para la lucha contra la misma.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos del trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de muchas de las publicaciones disponibles sobre el HLB. Para ello se ha utilizado la plataforma Web Of Science, Google Scholar y Dama UMH. Para los antecedentes se han utilizado como palabras clave “Huanglongbing review”, “Enfermedad del HLB”, “Candidatus Liberibacter HLB”, “HLB vectors”, “Trioza erytreae”, “Diaphorina citri”, “HLB Symptoms” entre otras búsquedas más específicas. De entre los resultados se seleccionaron los que permitían obtener una visión general de la problemática y la obtención de los objetivos. Para la búsqueda de revisiones sobre el manejo del HLB se han introducido las palabras clave “HLB control”, “HLB strategies”, “Prevention of HLB disease”, “HLB vectors control”, “Antibiotics for huanglongbing disease”, “HLB tolerant rootstocks” etc. Se ha profundizado especialmente en la búsqueda de artículos relacionados con el control biológico de vectores y en los métodos de control del HLB, pues representan los hallazgos más prometedores en la lucha contra la enfermedad. Las búsquedas se han realizado entre noviembre de 2022 y febrero de 2023, y pese que se ha verificado que no se hayan publicado artículos que actualizaran la información expuesta en el presente trabajo, se tiene constancia de que hay numerosos estudios en marcha que podrían arrojar luz sobre alguno de los contenidos comentados.

Se ha dado prioridad a la inclusión de revisiones que no sobrepasen los 10 años de antigüedad cuando ha resultado posible, a excepción de los antecedentes, donde se han incluido también artículos más antiguos para conocer el histórico y los aspectos más importantes. No se han incluido artículos que profundizaran demasiado en los procesos bioquímicos que ocurren dentro de las plantas afectadas por el HLB, pero se ha procurado introducir una visión global de los de mayor relevancia para el cumplimiento de los objetivos y el correcto entendimiento de la enfermedad.

4. MANEJO DE LAS EPIDEMIAS DE HLB EN CÍTRICOS

Hoy en día no existe una cura establecida para la enfermedad del Huanglongbing, la mayoría de los esfuerzos se han concentrado en el uso de técnicas preventivas como el uso de material vegetal sano certificado, el control efectivo de los vectores, la eliminación de especies potencialmente portadoras de la bacteria y la tala de cultivos infectados. Además, se han puesto en práctica otras técnicas como la adecuada fertilización del suelo, el control químico de la bacteria, cultivos intercalados con los cítricos y uso de portainjertos tolerantes, con el fin de paliar las consecuencias que acarrea la aparición de esta grave enfermedad.

4.1. MÉTODOS DE DIAGNOSTICO

Una detección temprana del HLB podría ser clave para impedir su extensión, existen varios métodos para ello, siendo los más comunes la inspección visual y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), no obstante, ambos métodos resultan costosos por que requieren mucho tiempo y personal cualificado para llevarlos a cabo (Garza-Saldaña et al., 2017). Investigadores de Florida demostraron que la visualización de los síntomas tiene entre un 47% y un 61% de exactitud, sin embargo, la enfermedad debe estar avanzada para su diagnóstico. Por otra parte, la PCR es más precisa, pero se debe destacar que CLas se distribuye de manera desigual dentro del sistema vascular de los cítricos, por lo que la probabilidad de obtener resultados “falsos negativos” es alta (Gottwald, 2010).

Otros métodos utilizados son los basados en imágenes, tanto del espacio de color visible “RGB” como del espectro electromagnético visible y no visible al ojo humano obtenidas con cámaras especiales, UAV, drones etc., además, numerosos estudios proponen métodos donde se utilizan fotografías aéreas y satelitales donde se han obtenido, a tiempo real muy buenos resultados para la detección del HLB.

El uso de la cromatografía de gases también ha resultado muy útil en el diagnóstico del Huanglongbing, (Aksenov et al., 2014) encontraron compuestos orgánicos volátiles

emitidos por los árboles infectados que diferían de los de árboles sanos incluso en las primeras etapas de la enfermedad.

También es posible evaluar la presencia de *Candidatus Liberibacter* a través de los insectos vectores, para ello se han desarrollado kits de detección molecular utilizando tecnología de amplificación cíclica (LAMP) que se pueden utilizar en el campo y donde se obtiene un resultado positivo o negativo en unos 30 minutos.

4.2. ESTRATEGIAS PARA PREVENIR LAS EPIDEMIAS CAUSADAS POR HLB

Como sucede con cualquier plaga o enfermedad, prevenir su aparición siempre será la opción más ventajosa y económica. De manera general, la prevención del HLB va dirigida a la adopción de las siguientes prácticas: uso de material vegetal sano, selección de material tolerante, erradicación de árboles infectados, nuevas regiones para la plantación de cítricos, altas densidades de plantación, para compensar posibles pérdidas, producción de árboles en invernadero, uso de plantas repelentes para los vectores y atrayentes para sus enemigos naturales y cultivos intercalados.

El ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España ha elaborado un plan de contingencia para *Candidatus Liberibacter* spp. Para proponer acciones encaminadas a la prevención de la entrada de la enfermedad al país, algunos de los puntos se expondrán a continuación.

4.2.1. USO DE MATERIAL VEGETAL SANO

Una de las principales vías de dispersión a larga distancia del HLB es el uso de material vegetal infectado, por lo que la adquisición de plantas de cítricos debe de hacerse exclusivamente en viveros registrados que estén sometidos a inspecciones sanitarias periódicas. Actualmente, la introducción en la Unión Europea de *Citrus* L., *Fortunella Swingle*, *Poncirus* Raf., y sus híbridos (excepto frutos y semillas) está prohibida por el Reglamento de ejecución (UE) 2019/2027). En España, los viveristas deben utilizar

patrones y variedades importadas de Estaciones de Cuarentena para ofrecer planta certificada con garantía sanitaria.

Numerosos estudios han demostrado que los psílicos prefieren brotes y hojas de los cítricos, por lo que prestar atención a que los frutos no incluyan hojas ni pedúnculo es muy importante, no obstante, se ha demostrado que los psílicos pueden sobrevivir en frutas sin hojas, por lo que se hace necesaria la regulación de los frutos que son importados a zonas libres de los vectores del HLB (Urbaneja et al., 2020)

4.2.2. ESTRATEGIAS DE DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD: MUESTREOS

Actualmente existen medidas encaminadas a detectar la enfermedad en las diferentes áreas cítricas del país, estas prospecciones se apoyan en el conocimiento de las posibles vías de entrada de los agentes causales, a saber: insectos vectores, material de propagación y semillas. Para ello se ha propuesto un protocolo de prospecciones de *Candidatus Liberibacter* spp. en, el cual, se establece que en las Comunidades Autónomas donde existan plantaciones cítricas comerciales se realizará anualmente al menos una inspección visual por cada 500 hectáreas de cultivo para detectar síntomas del HLB, así como de sus vectores. Las prospecciones se deben realizar en diagonal muestreando 5 árboles de cada diagonal en todas sus orientaciones o en 5 de oros (Figura 14).

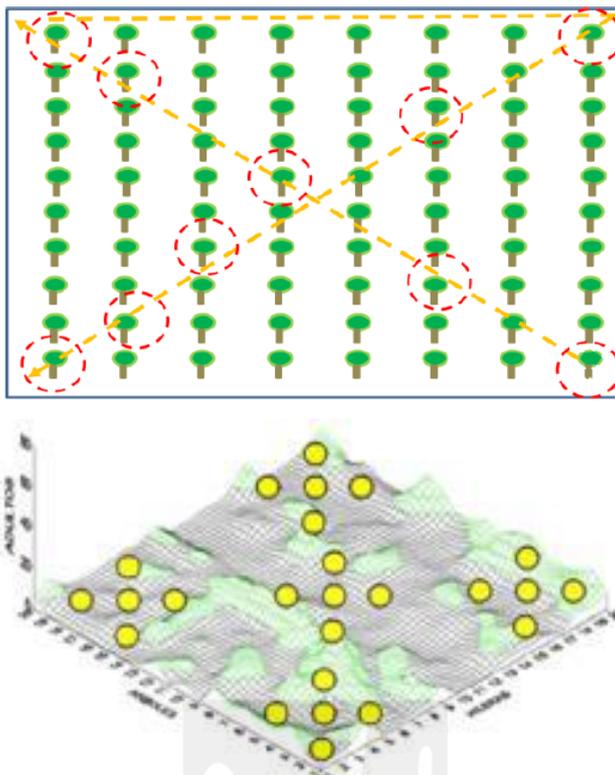


Figura 14: Procedimiento de inspección para la búsqueda de síntomas del HLB (Fuente: (MAPA, 2021).

Como hemos comentado anteriormente, la inspección visual se torna insuficiente si se tiene en cuenta que muchas plantas son asintomáticas, que el periodo de latencia entre la infección y la aparición de los síntomas es muy largo (hasta 2 años), que estos son fácilmente confundibles con deficiencias nutricionales y que la bacteria se distribuye de manera desigual dentro de los árboles.

Si se llegara a dar el aviso de sospecha de la presencia de la enfermedad en alguna zona muestreada comenzaría un plan de acción que va desde la corroboración de que la bacteria está presente en el cultivo, hasta la erradicación de la plantación afectada.

4.2.3. MEDIDAS A ADOPTAR UNA VEZ SE CONFIRMA LA PRESENCIA DE LA ENFERMEDAD

El plan de contingencia de *Candidatus Liberibacter* en España ofrece las directrices a adoptar en el caso de que se confirme la presencia de la bacteria en un lugar, ya sea en plantaciones, jardines, parques o huertos privados, viveros o garden center:

Tabla 1: Medidas a adoptar en caso de detección de la enfermedad del HLB. Fuente: (Plan de contingencia de *Candidatus Liberibacter* spp. bacterias asociadas a la enfermedad del Huanglongbing o greening de los cítricos, 2021).

Lugar de detección	Medidas a adoptar
<p>Plantaciones de cítricos</p> <p>Parques</p> <p>Huertos privados</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Detección de todos los árboles infectados - Arranque de raíz o talado y destrucción in situ de forma inmediata y bajo supervisión oficial. - Tratar raíces o tocón restante con herbicidas - Estudiar la trazabilidad para informar en los lugares de procedencia
<p>Viveros</p> <p>Garden center</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Detección de árboles infectados - Eliminación inmediata con quema o enterrar con cal viva en la misma parcela, bajo supervisión oficial. - Si se debe trasladar, tratar con insecticida autorizado - Eliminación de todas las especies sensibles que puedan haberse contaminado - Observación del pasaporte sanitario - Identificación de viveros cercanos con plantas huésped y solicitud de datos de origen, fechas de adquisición y destinos de los últimos 3 años. - Prohibición de movimiento de material vegetal (excepto frutos sin hojas ni pedúnculos)
<p>TODOS</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Futuras inspecciones en busca de síntomas de la enfermedad en la zona - Instalación de trampas cromáticas para verificación de ausencia de vectores

La eliminación de árboles afectados es una estrategia que se ha utilizado en todos los lugares que han sido afectados por el greening, sin embargo, presenta claras desventajas, la principal es que esta estrategia es muy poco atractiva para los agricultores, puesto que deben arrancar árboles en producción, y en muchos casos son numerosos. Además del coste económico que esto conlleva, no pueden estar seguros de las plantas que albergan la bacteria por los inconvenientes antes comentados. La replantación de cítricos también puede suponer un problema, puesto que los psíidos se sienten atraídos por el nuevo crecimiento, y los árboles jóvenes en una plantación de árboles maduros serán más propensos a ser infectados.

En Florida es muy común encontrar el 100% de árboles de una plantación infectados con HLB, por lo que es económicamente inviable la erradicación de todos y cada uno de ellos. A pesar de la enfermedad, es posible encontrar plantaciones que continúan siendo productivas a medio plazo y algunos agricultores optan por convivir con la enfermedad, concienciados de que mantener unas adecuadas prácticas agronómicas es imprescindible (Monzó et al., 2014).

4.2.4. CONTROL DE HLB MEDIANTE EL MANEJO DE LOS INSECTOS VECTORES

Como comentamos en apartados anteriores, *Trioza erytreae* junto a *Diaphorina citri* Kuwayama (*Hemiptera: Liviidae*) son los principales transmisores de la enfermedad incurable de los cítricos “huanglongbing” (HLB) (Monzó et al., 2015). El primero se encuentra en la península ibérica desde 2014, por su llegada a Galicia y extensión por Portugal (Pérez-Otero et al., 2015). El segundo se encuentra en países del Este de África, desde donde potencialmente podría llegar a la cuenca mediterránea.

Años atrás se han realizado aplicaciones masivas de insecticidas de síntesis en grandes áreas infestadas en diferentes partes del mundo (Candela Ferre, 2020; Rogers et al., 2012), esta actividad no sirve para curar los árboles infectados, además de ser una práctica insostenible y con grandes costos ambientales, dados los residuos químicos resultantes. Es por ello por lo que recientemente las investigaciones para el control del HLB están más centradas en la existencia de diferentes enemigos naturales de los

vectores *T. erytrae* y *D. citri* principalmente, incluyendo parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos (Rasowo, 2019). La correcta gestión de estos vectores, así como la pronta detección del HLB son requisitos indispensables para poder erradicar esta grave enfermedad en los cítricos (Monzó et al., 2015).

Estas medidas de control mediante el manejo de los vectores podríamos clasificarla en diferentes vertientes:

4.2.4.1. CONTROL BIOLÓGICO (C. B.)

4.2.4.1.1. C. B. CLÁSICO

En el cual son utilizados enemigos naturales, parasitoides específicos para el psílido en cuestión. Se realizaría la introducción en las zonas de origen del enemigo natural para más tarde liberar en la zona de nueva colonización. Antes de introducir cualquier especie, cabe mencionar que se llevan a cabo exhaustivos estudios de especificidad, para comprobar que el parasitoide no interaccione de manera negativa con alguna de las especies clave del ecosistema.

Se sabe que *Trioza erytrae* es parasitada por el himenóptero *Tamarixia dryi* gracias su descubrimiento en la Isla de Reunión, donde se alcanzó la erradicación del psílido vector de HLB tras la introducción de *T. dryi* desde Sudáfrica (Etiene y Aubert, 1980; Van der Berg and Greenlan, 2000). En el proyecto Tropic Safe, se constató que *T. dryi* es un parasitoide específico de *T. erytrae*, se alimenta de la ninfa, desde dentro, y deja unos opérculos muy característicos al eclosionar y salir el parasitoide. Investigaciones en Taiwán, durante el verano de 2019, en las que se realizaron sueltas de *T. dryi* (Abdullah et al., 2009; Cocuzza et al., 2017) dieron buenos resultados.

En la Península Ibérica, grupos de investigación del IVIA ya han demostrado su eficacia tras varias sueltas primero en Canarias y más tarde en Galicia (Tena et al., 2021, Baixauli, 2019; elperiodic.com, 2020), obteniendo resultados increíbles, pues en Canarias, donde era extraño encontrar plantaciones que no tuvieran los abultamientos característicos de

T. erytrae, *T. dryi* ha conseguido erradicar la enfermedad y actualmente ya no hay presencia de este vector de HLB.

Para el control de *Diaphorina citri*, se ha utilizado *Tamarixia radiata*, al ser éste un enemigo natural (Parra et al., 2016). En el caso de Ecuador, el vector *D. citri* fue detectado en el país en el año 2013, en plantas diferentes a los cítricos, pero se llevaron a cabo investigaciones para la prevención en cítricos, con resultados positivos para la asociación de *T. radiata* como ectoparásitoide de *D. citri* (Cuadros et al., 2020).

4.2.4.1.2. C. B. PREVENTIVO

Se realiza mediante la introducción de insectos generalistas. En el IVIA tienen una línea de investigación con *Pilophorus clavatus*, mívrido que presta un gran servicio a cítricos por alimentarse de un amplio rango de plagas comunes en esta familia. La presencia de *P. clavatus* induce la activación del sistema defensivo de la planta, con la acumulación de hormonas relacionadas con el estrés como la ruta del ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) (Dahmane et al., 2022). La difusión de compuestos volátiles por parte de la planta resulta atractiva para parasitoides como *T. radiata*, y es repelente para *D. citri*, por lo que resulta muy conveniente para la prevención de enfermedades en cítricos.

Tras estudios con *P. clavatus*, como hemos comentado anteriormente se derivaron trabajos que demuestran cómo la acción del HLB en la planta puede limitarse mediante la activación del sistema defensivo de la planta, de manera inducida químicamente, principalmente por la activación de la ruta del ácido salicílico (SA) (Pérez-Hedo et al., 2022). Esta activación se consigue exponiendo a las plantas a determinados volátiles que son reconocidos como señal de alerta frente a un ataque, y que contrarrestan activando su sistema inmune. Experimentación con difusores poliméricos conllevó la sobreexpresión de las defensas vegetales, con un 50% menos de puestas de los psílicos en las hojas de los cítricos (Pérez-Hedo et al., 2022). Esta práctica con difusores tiene hasta 4 meses de duración y provoca la resistencia inducida en las plantas expuestas, que se activarán de manera defensiva, mediante un procedimiento llamado ‘priming’.

4.2.4.2. CONTROL BIOTECNOLÓGICO MEDIANTE APLICACIÓN DE RNA DE INTERFERENCIA

Diversas investigaciones del IVIA generan perspectivas de futuro muy interesantes para el control del HLB mediante la aplicación de ARN exógeno de interferencia (El-Shesheny et al., 2013) en *T. erytrea*, para bloquear diferentes rutas del psílido. El ARN de interferencia es una tecnología que pretende silenciar genes críticos de los insectos a través de la interferencia de ARN. Este enfoque puede usarse para inhibir el crecimiento de insectos, aumentar su susceptibilidad a insecticidas, afectar a su fertilidad o causar su muerte.

4.2.4.3. CONTROL MEDIANTE PRODUCTOS FITOSANITARIOS

El control químico de los psílidos es la estrategia más utilizada actualmente para el control de vectores (Ghosh et al., 2022). Los insecticidas sistémicos imidacloprid, tiametoxam y clotianidina aplicados al suelo, se han utilizado en grandes cantidades para el control de los psílidos. Además, se sabe que los insecticidas de amplio espectro como los neonicotinoides, los organofosforados, los carbamatos y los piretroides son muy eficaces contra las poblaciones de estos vectores (Hall & Nguyen, 2010) sin embargo, muchas de estas sustancias ya están prohibidas en la UE desde hace años, además no son respetuosos con la fauna auxiliar. En la tabla 2 se exponen los productos insecticidas autorizados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para el control de estos Psílidos.

Tabla 2: Insecticidas autorizados en el registro de productos fitosanitarios para el control de Psílidos (MAPA, 2023).

FORMULADO	MATERIA ACTIVA
ACEITE DE COLZA 848,24 g/l [EC]	ACEITE DE COLZA
ACEITE DE NARANJA 58,96 g/l [ME]	ACEITE DE NARANJA
ACEITE DE PARAFINA (CAS 8042-47-5) 54,6%	ACEITE DE PARAFINA
CIPERMETRIN 10% [EC] P/V	CIPERMETRIN
DELTAMETRIN 1,5% [EW] P/V	DELTAMETRIN
DELTAMETRIN 2,5% [EC] P/V	
LAMBDA CIHALOTRIN 5% [EG] P/P	LAMBDA CIHALOTRIN
TRIFLUMURON 48% [SC] P/V	TRIFLUMURON

PIRETRINAS 12,9 g/l [EC]

PIRETRINAS

También se han estudiado los hongos entomopatógenos *Isaria fumosorosea* y *Beauveria bassiana* (Conceschi et al., 2016) y la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Dorta et al., 2020) para el control de vectores, observándose que las cepas de *Bt* indujeron niveles medio-altos de mortalidad en las ninfas del tercer estadio de *D. citri*.

4.2.4.4. MEDIDAS PARA EVITAR EL ESTABLECIMIENTO DE VECTORES EN NUEVAS ÁREAS.

Se conoce que la supervivencia en la fruta ya cortada puede llegar hasta los 10 días, es por ello por lo que se hace necesario el control en esta fase, para así evitar posibles contagios. Además, resulta muy recomendable la eliminación de árboles abandonados o improductivos, ya que pueden servir de refugio para los psílicos (Cocuzza et al., 2017).

En el caso de zonas libres de los vectores, la actuación más efectiva siempre será la prevención, ya que tanto *T. erytrae* como *D. citri* no son capaces de expandirse rápidamente por grandes áreas, es la actividad humana quien lo favorece. Es por esto que, como hemos comentado con anterioridad, el control por parte de las autoridades fitosanitarias se hace imprescindible. Países como España o Portugal ya han comenzado a implementar medidas de prevención a este respecto (Cocuzza et al., 2017).

A modo preventivo, y para poder localizar la presencia de vectores de manera temprana, se utilizan los muestreos por golpeo de rama y visual, para mayor precisión se utilizan trampas amarillas y métodos de muestreo por aspiración. Además, la utilización de mallas antitrips también impide el trasiego de *T. erytrae*.

4.3. ESTRATEGIAS PARA CONTROLAR LA ENFERMEDAD QUE CAUSA *C. Liberibacter* spp. EN LA PLANTA.

4.3.1 ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD A NIVEL DE PATÓGENO

Como ya se ha comentado, los agentes causales del HLB no han podido ser cultivados en laboratorio de manera efectiva, por lo que, desafortunadamente, las estrategias de manejo de la enfermedad a nivel de patógeno resultan muy complicadas. A nivel mundial se han producido numerosos esfuerzos para aislar estas bacterias y se han conseguido algunos logros, pero de ninguno se puede establecer un protocolo de cultivo exitoso. Al parecer, *Candidatus Liberibacter* carece de genes que codifican enzimas esenciales y, por tanto, requieren la asociación de otra microbiota del floema de los cítricos para su supervivencia (Ghosh et al., 2022). Existe la imperiosa necesidad de desarrollar estrategias que vayan encaminadas a la inhibición de la multiplicación de la bacteria dentro de la planta, por lo que se está tratando de identificar y desarrollar moléculas antimicrobianas que puedan combatir a estos patógenos. La posibilidad de cultivar esta bacteria otorgaría mucha información sobre cómo inhibir su crecimiento o erradicar su presencia dentro de los árboles infectados.

4.3.1.1. GESTIÓN DE HLB CON PRODUCTOS QUÍMICOS ANTIMICROBIANOS

Existe una variedad de antibióticos de amplio espectro eficaces contra CLas tanto en condiciones de invernadero como en campo, se encontró que una combinación de oxitetraciclina y penicilina pueden reducir la severidad de la enfermedad (Shokrollah et al., 2011). También se ha demostrado que la aplicación de penicilina junto con estreptomycin es efectiva para aliviar la población de CLas (Zhang et al., 2012), además de otros antibióticos como ampicilina, carbenicilina, calefaxina, rifampicina y sulfadimetoxina (Zhang et al., 2014). La agencia de protección ambiental de los EE. UU aprobó el uso de emergencia de oxitetraciclina y estreptomycin para las plantaciones de cítricos en Florida, sin embargo, la efectividad de estos tratamientos para la

erradicación del Huanglongbing continúa siendo un tema de debate (Andrade & Wang, 2020).

Diversos estudios corroboran que aplicar los antibióticos vía foliar implica una absorción muy limitada por parte de las hojas de cítricos debido a la naturaleza de la capa de su cutícula (Li et al., 2019) y, por tanto, se hace necesario un sistema de para que los componentes químicos antimicrobianos lleguen al floema. Se elaboró un estudio donde se eliminó con un láser de alta potencia la capa de la cutícula de las hojas y se aplicó oxitetraciclina, observándose una alta penetración del antibiótico y una reducción significativa de *Candidatus L. asiaticus* con respecto al control (Killini et al., 2020). Estos autores también probaron el uso de coadyuvantes mezclados con el antibiótico para comprobar si ejercía algún efecto mejorando la absorción de este, pero los resultados no fueron significativos.

Otra forma de aplicación que ha sido investigada es la inyección al tronco, en función de la edad y el tamaño de los árboles demostrando que la absorción era mayor y que la persistencia del antibiótico era detectable hasta después de 35 días, por lo que se podrían aumentar los plazos entre tratamientos (Al-Rimawi et al., 2019).

Cada antibiótico es distinto, por lo que cada uno en solitario y combinados se deben estudiar de forma diferente, el problema que se presenta ante su uso es que no se pueden descartar las resistencias, así como la contaminación de los frutos, con las repercusiones al ser humano que esto conlleva, además de los impedimentos legislativos y de que podrían no ser rentables por problemas logísticos y económicos. Por ello, para el correcto manejo del HLB en campo se investigan, alternativas al uso de antibióticos.

Otras líneas de investigación en el control del agente causal de la enfermedad es el estudio de los brasinoesteroides, estos son compuestos esteroideos vegetales que juegan un papel esencial en el crecimiento, desarrollo y tolerancia al estrés de las plantas. Canales et al., 2016 estudiaron la aplicación foliar de epibrasinólida en plantas infectadas con CLas, observando que las poblaciones de la bacteria disminuyeron significativamente tanto en condiciones de invernadero como en campo a consecuencia de la inducción de genes relacionados con la defensa en las plantas de cítricos.

4.3.1.2. TERMOTERAPIA

El uso de la termoterapia para tratar diferentes enfermedades causadas por microorganismos se ha utilizado durante décadas como una excelente alternativa a los productos químicos de síntesis. Diversos estudios han demostrado la efectividad de este método; Hoffman et al., 2013 aplicaron un tratamiento térmico (40-42 °C) en condiciones controladas de invernadero que eliminaron la bacteria durante 2 años. Por su parte, Fan et al., 2016 evaluaron la eficacia de la termoterapia con tratamientos de entre 45 y 48 °C obteniendo una reducción significativa de CLas. Recientemente se ha diseñado un dispositivo de administración de termoterapia móvil (sistema MHTS) (Figura 15) que consta de mecanismos necesarios para la generación de calor, y que cubre todo el árbol inyectando vapor y agua caliente mediante boquillas. Este sistema ha mostrado muy buena eficacia en la erradicación de la bacteria con temperaturas máximas de 54 °C durante 4 minutos (Ghatrehsamani et al., 2019)

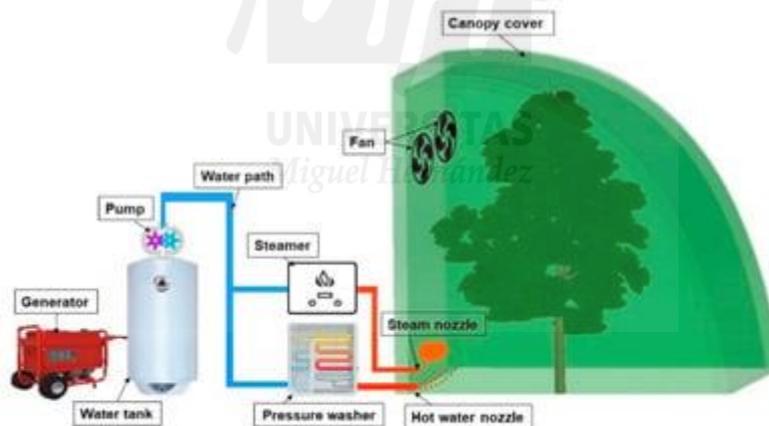


Figura 15: Diagrama esquemático del sistema de tratamiento térmico móvil (MHTS) y sus componentes. Fuente: (Ghatrehsamani et al., 2019).

En definitiva, el tratamiento térmico puede ser una de las estrategias de control más eficaces contra el HLB, no obstante, no carece de desventajas, ya que un aumento en la temperatura del árbol, más allá del nivel óptimo podría causar daños térmicos irremediables, además está en entredicho la efectividad del tratamiento en las raíces, donde el calor no llegaría de forma uniforme ni efectiva, y un sistema radicular que escape al tratamiento puede suponer la reinfección de toda la planta.

4.3.2. ESTRATEGIAS DE MANEJO A NIVEL HUESPED

4.3.2.1. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO DE LA PLANTA

Las plantas capaces de activar mecanismos de defensa ante sustancias, estímulos, condiciones y agentes inesperados. La membrana celular posee receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que actúan como antenas para detectar señales de peligro. Ante organismos patógenos, los cítricos inducen una serie de respuestas que inmunitarias como las especies reactivas del oxígeno (ROS), explosión de ácido nítrico, producción de etileno, entrada de calcio, deposición de calosa en la pared celular, expresión de genes de defensa llamados “inmunidad activada por PAMP” (PTI, PAMP Triggered Immunity) entre otras. Los patógenos, por su parte, han desarrollado sistemas para suprimir la PTI del huésped, lo que limita el reconocimiento de los PRR (Hou et al., 2019).

Los agentes causales asociados al HLB son capaces de inactivar la inmunidad provocada por el patrón molecular asociado a la planta (PAMP) del huésped cítrico, además la bacteria carece de enzimas que degraden la pared celular vegetal, y esto es necesario para que las plantas activen sus mecanismos de defensa. Existe la creencia de que estas bacterias evolucionaron a partir de animales y que esta podría ser la causa de que la planta no desarrollara sistemas de defensa contra la bacteria. Sin embargo, como hemos comentado anteriormente, trabajos recientes del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) han demostrado que la acción de la enfermedad puede limitarse mediante la activación de defensas en los cítricos, especialmente las liberadas a partir de la ruta de señalización del ácido salicílico. Los investigadores han desarrollado una técnica para activar el sistema inmune basada en la comunicación entre plantas. Esto se consigue a través de la exposición de las mismas a una serie de volátiles que activan las señales de alerta frente a un ataque inminente. Utilizaron difusores poliméricos para la propagación de 6 volátiles en 6 especies de cítricos y en la mayoría se consiguió sobreexpresar la ruta del ácido salicílico. La puesta de huevos ambos psílidos se vio reducida en un 50% en las plantas que habían activado sus defensas,

además, sus parasitoides *T. dryi* y *T. radiata* se vieron atraídos por estas (Pérez-Hedo et al., 2022).

4.3.2.2. SELECCIÓN DE MATERIAL TOLERANTE

La selección de material vegetal tolerante o inmune se investiga cada día en el mundo para combatir cualquier enfermedad, en especial en las de etiología fúngica y vírica, pero el HLB no es una excepción. Se ha hecho hincapié al estudio de portainjertos de cítricos que muestran cierta tolerancia a la infección por parte de las bacterias causales del greening y han resultado bastante prometedores. Se ha demostrado que el patrón *Poncirus trifoliata* porta genes de resistencia al HLB (Albrecht & Bowman, 2011) e investigadores de Florida ya cuentan con una variedad híbrida a la que han denominado “US Sun dragón” conseguida a partir de cruzamientos con *Poncirus*. En 2015, Bowman & McCollum seleccionaron 5 patrones de mejora tolerantes al HLB. En 2016 se realizó un impresionante estudio por parte de la Universidad de California donde se analizaron 98 especies (66 accesiones cítricas y 33 cultivos afines) evaluándolas en una zona con gran incidencia de Huanglongbing. Se introdujeron todas las especies en 8 categorías, donde la 0 eran las especies que presentaban inmunidad a la enfermedad y la 8 las que morían más rápidamente. Lo interesante de este estudio es que descubrieron que los géneros *Eremocitrus* y *Microcitrus* eran muy resistentes al HLB (Ramadugu et al., 2016).

Recientemente se ha descubierto que la especie de lima australiana, *Microcitrus australasica* también conocida como “caviar cítrico” es inmune al HLB, esto es debido a que posee péptidos antimicrobianos estables (SAMPs) responsables de la mejora de la inmunidad del árbol y la inhibición de la multiplicación de la bacteria (Alves et al., 2021). Huang et al., 2021 han observado que estos SAMP estabilizados por calor y aplicados mediante pulverización foliar se trasladaban al sistema vascular de la planta. De todos los péptidos presentes, comprobaron que MaSAMP de *Microcitrus australasica* inyectado en platas con alta carga bacteriana de *Candidatus* L. curaba la enfermedad, concluyendo que tenía actividad bactericida (Huang et al., 2021). Estos resultados son muy prometedores para el control de esta enfermedad.

4.3.2.3. NUTRICIÓN

Los objetivos de un programa de manejo óptimo de nutrientes son asegurar que las plantas poseen los nutrientes esenciales para su crecimiento y desarrollo en todas las etapas de crecimiento, garantizar el suministro adecuado de éstos y asegurar su disponibilidad para ser absorbidos por la planta ya sea por las raíces o por la parte aérea (Morgan et al., 2020). Para comprobar que todos los nutrientes esenciales están en niveles óptimos, se deben realizar análisis del tejido de las hojas y del suelo.

Los programas nutricionales mejorados (Enhanced nutritional programs, ENPs) son fertilizantes en formato de gránulos solubles, polvos y líquidos de liberación lenta que contienen macro y micronutrientes esenciales para el correcto funcionamiento de la planta y para mitigar los impactos de distintas deficiencias. Existen 3 criterios para calificar a un elemento mineral como nutriente vegetal esencial; que una planta no pueda completar su ciclo en su ausencia, que la función del elemento no puede ser reemplazada por otro y que el elemento debe de estar involucrado directamente en el metabolismo de la planta (Marschner, 2011, Pestana et al., 2011). Se ha demostrado que los ENP son una forma eficaz de mitigar el HLB, al parecer, el suministro de Zn, Mn o Cu a por vía foliar ayuda a los árboles infectados por HLB a evitar en gran medida los síntomas de la enfermedad, ya que se ha observado que se produce un déficit de estos oligoelementos durante la infección (da Silva et al., 2020).

Los árboles afectados por HLB sufren un sistema de raíces dañados y un trastorno nutricional debido al transporte de fotoasimilados desde el brote a la raíz y de nutrientes desde la raíz al brote (Gottwald *et al.* 2012). Diversos estudios han demostrado que los árboles con HLB necesitan una suplementación de micronutrientes mayor que la tradicional en cítricos (Kwakye & Kadyampakeni, 2023), por lo que es otra línea de investigación interesante para el control del HLB.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO.

Se ha demostrado que el Huanglongbing es la enfermedad más devastadora del cultivo de cítricos y su aparición conlleva la disminución masiva de plantaciones de estas especies, pérdida de empleos directos e indirectos y un gran impacto ecológico por el abandono y degradación de miles de hectáreas en áreas cultivadas. En el mundo se han llevado a cabo infinidad de pruebas para la gestión eficaz del HLB. A falta de una cura, los esfuerzos se han centrado sobre todo en la prevención de la enfermedad, ya sea mediante legislaciones que prohíben el uso e importación de material proveniente de áreas donde está presente el greening o el control de los insectos vectores, cuya aparición en un lugar siempre va precedida a la llegada de las bacterias causales. Para el control de los vectores se han utilizado diversas estrategias, como el control químico con fitosanitarios, el control biológico con las especies *Tamarixia dryi* y *T. radiata* y se está estudiando el control biotecnológico con RNA de interferencia. En algunas zonas se ha optado por convivir con los árboles infectados en lugar de erradicarlos. En cuanto a las estrategias para controlar la enfermedad causada por *Candidatus Liberibacter spp.* en las plantas cítricas existen dos vertientes, la que pretende controlar la enfermedad mediante el manejo del patógeno y la que lo hace a través del huésped. En cuanto al manejo del patógeno, existen diferentes técnicas que han dado buenos resultados, siempre teniendo en cuenta que no han conseguido erradicarlo por completo, estas son, el uso de químicos como los antibióticos y brasinoesteroides, pero también se está estudiando el uso de nanomateriales que faciliten la llegada de estos compuestos a las bacterias diana. En lo concerniente al manejo del huésped, se investigan técnicas como el uso de porta injertos tolerantes, la termoterapia, la crioterapia o la adecuada nutrición de los árboles para hacer frente a la enfermedad. Todas ellas han mostrado buenas expectativas para el control de la enfermedad, pero muchos no son económica o logísticamente factibles. La entrada del HLB a nuevas zonas, como sería el caso de la cuenca mediterránea supondría una catástrofe, pues las plantaciones de cítricos en estas áreas son muy numerosas, por lo tanto, existe la imperiosa necesidad de continuar buscando métodos centrados en prevenir y eliminar de manera exitosa la enfermedad del Huanglongbing.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Abdullah, T., Shokrollah, H., Sijam, K., & Abdullah, S. (2009). Control of Huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. *African Journal of Biotechnology*, 8(17).
- Achor, D. S., Etxeberria, E., Wang, N., Folimonova, S. Y., Chung, K. R., & Albrigo, L. G. (2010). Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. *Plant Pathol. J*, 9(2), 56-64.
- Agustí, M. (2010). Citricultura 2ª (Ed.). *Mundi Prensa*. Madrid, España. 507 p.
- Aksenov, A. A., Pasamontes, A., Peirano, D. J., Zhao, W., Dandekar, A. M., Fiehn, O., ... & Davis, C. E. (2014). Detection of Huanglongbing disease using differential mobility spectrometry. *Analytical chemistry*, 86(5), 2481-2488.
- Alemán, J., Baños, H., & Ravelo, J. (2007). Diaphorina citri y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Revista de Protección Vegetal*, 22(3), 154-165.
- Albrecht, U., & Bowman, K. D. (2011). Tolerance of the trifoliate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco × *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HortScience*, 46(1), 16-22.
- Al-Rimawi, F., Hijaz, F., Nehela, Y., Batuman, O., & Killiny, N. (2019). Uptake, translocation, and stability of oxytetracycline and streptomycin in citrus plants. *Antibiotics*, 8(4), 196.
- Andrade, M., Li, J., & Wang, N. (2020). Candidatus *Liberibacter asiaticus*: virulence traits and control strategies. *Tropical Plant Pathology*, 45, 285-297.
- Aubert, B. (1993). Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa. *Proc Intern Soc Citricult*, 1, 817-820.
- Baixauli, H. (2019, 25 octubre). *Tamarixia dryi* reduce las poblaciones de *Trioza erytrae* en Canarias. <https://www.phytoma.com/noticias/noticias-de-actualidad/tamarixia-dryi-reduce-las-poblaciones-de-trioza-erytrae-en-canarias>

- Balfagón, D., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2021). El futuro de los cítricos: Impacto del cambio climático en la citricultura. *Metode Science Studies Journal*, (12), 123-129.
- Beattie, G. A. C., & Broadbent, P. (2005). H-5 Huanglongbing: its possible origins, collaborative research in Southeast Asia, and developing incursion management plans for Australia.
- Beattie, G. A. C., Holford, P., Mabblerley, D. J., Haigh, A. M., Bayer, R., & Broadbent, P. (2006, December). Aspects and insights of Australia-Asia collaborative research on huanglongbing. In *Proceedings of the international workshop for the prevention of citrus greening disease in severely infected areas* (pp. 47-64). Tokyo, Japan: Multilateral Research Network for Food and Agricultural Safety, Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.
- Berger, J., Preussler, C., & Agostini, J. P. (2019). Identificación de síntomas de Huanglongbing en hojas de cítricos mediante técnicas de deep learning. *Electronic Journal of SADIO*, 18.
- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology*, 7-37.
- Bowman, K. D., & McCollum, G. (2015). Five new citrus rootstocks with improved tolerance to huanglongbing. *HortScience*, 50(11), 1731-1734.
- Camacho-Tapia, M., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Hernández-Deheza, M. G., Carrillo-Salazar, J. A., Rebollar-Alviter, A., & Ochoa-Martínez, D. L. (2011). Aetiology of chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *Journal of Plant Pathology*, 331-335.
- Canales, E., Coll, Y., Hernández, I., Portieles, R., Rodríguez García, M., López, Y., & Borrás-Hidalgo, O. (2016). ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’, causal agent of citrus Huanglongbing, is reduced by treatment with Brassinosteroids. *PLoS One*, 11(1), e0146223.
- Candela Ferre, J. (2020). Situación actual y perspectivas de control del Huanglongbing de los cítricos.
- Capoor, S. P. (1963). Decline of citrus trees in India. *Bull. Nat. Inst. Sci. India* 24, 48-64.

- Capoor, S. P., Rao, D. G., & Viswanath, S. M. (1967). Diaphorina citri Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. *Indian J. Agric. Sci*, 37(572.576), 1382-1382.
- Carrol, K.K., Kurowska, E.M., & Guthrie, N. (1999). Use of citrus limonoids and flavonoids as well as tocotrienols for the treatment of cancer. International Patent WO 991616.
- Carrol, K. K., Guthrie, N., & Kurowska, E. M. (2000). *European Patent Application No. 98947740A*.
- Cebolla, R., Pérez-Hedo, M., Monzó, C., & Barreda, A. T. (2022). El psílido asiático de los cítricos" Diaphorina citri": la mayor amenaza para la citricultura mediterránea. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (340), 25-32.
- Cen, Y., Zhang, L., Xia, Y., Guo, J., Deng, X., Zhou, W., ... & Gao, Y. (2012). Detection of 'Candidatus liberibacter asiaticus' in Cacopsylla (psylla) citrisuga (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 95(2), 304-311.
- Chen, Q., Min, A., Luo, S., He, J., Wu, R., Lin, X., ... & Wang, X. (2022). Metabolomic analysis revealed distinct physiological responses of leaves and roots to Huanglongbing in a citrus rootstock. *International journal of molecular sciences*, 23(16), 9242.
- Cocuzza, G. E. M., Alberto, U., Hernández-Suárez, E., Siverio, F., Di Silvestro, S., Tena, A., & Carmelo, R. (2017). A review on Trioza erytrae (African citrus psyllid), now in mainland Europe, and its potential risk as vector of huanglongbing (HLB) in citrus. *Journal of pest science*, 90, 1-17.
- Conceschi, M. R., D'Alessandro, C. P., Moral, R. D. A., Demétrio, C. G. B., & Júnior, I. D. (2016). Transmission potential of the entomopathogenic fungi Isaria fumosorosea and Beauveria bassiana from sporulated cadavers of Diaphorina citri and Toxoptera citricida to uninfected D. citri adults. *BioControl*, 61, 567-577.
- Cuadros, I. M., Velez, J., Velásquez, J., & Chirinos, D. T. (2020). La dispersión del psílido asiático, Diaphorina citri Kuwayama y su parasitoide, Tamarixia radiata (Waterston) en la provincia de Manabí, Ecuador. *Investigatio*, (13), 59-64.

- Da Graça, J. V. (2008). Biology, history and world status of huanglongbing. *Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido asiático de los cítricos. Hermosillo, Son.*
- Da Silva, J. R., de Alvarenga, F. V., Boaretto, R. M., Lopes, J. R. S., Quaggio, J. A., Coletta Filho, H. D., & Mattos, D. (2020). Following the effects of micronutrient supply in HLB-infected trees: plant responses and ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ acquisition by the Asian citrus psyllid. *Tropical Plant Pathology, 45*, 597-610.
- Dahmane, M., Urbaneja, A., Ruíz-Rivero, O., Alonso-Valiente, M., & Pérez-Hedo, M. (2022). The zoophytophagous predator *Pilophorus clavatus* (Hemiptera: Miridae) induces plant defences in citrus. *Journal of Pest Science, 95*(4), 1519-1530.
- Del Guercio, G. (1918). Note ed osservazioni di entomologia agraria. Il cecidio delle foglie del limone ed il suo cecidozoo in Eritrea. *L’Agricoltura Coloniale, 12*, 355-357.
- Donovan, N. J., Beattie, G. A. C., Chambers, G. A., Holford, P., Englezou, A., Hardy, S., & Om, N. (2012). First report of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ in *Diaphorina communis*. *Australasian Plant Disease Notes, 7*(1), 1-4.
- Dorta, S. D. O., Balbinotte, J., Monnerat, R., Lopes, J. R. S., da Cunha, T., Zanardi, O. Z., ... & de Freitas-Astúa, J. (2020). Selection of *Bacillus thuringiensis* strains in citrus and their pathogenicity to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) nymphs. *Insect science, 27*(3), 519-530.
- Elperiodic.com. (2020, 5 junio). *El IVIA inicia el seguimiento de la Tamarixia dryi, la avispa contra el insecto que contagia el HLB tras sus sueltas experimentales en Galicia y Portugal.* https://www.elperiodic.com/ivia-inicia-seguimiento-tamarixia-dryi-avispa-contrainsecto-contagia-tras-sueltas-experimentales-galicia-portugal_65329.
- El-Shesheny, I., Hajeri, S., El-Hawary, I., Gowda, S., & Killiny, N. (2013). Silencing abnormal wing disc gene of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* disrupts adult wing development and increases nymph mortality. *PLoS one, 8*(5), e65392.
- EPPO (2021). European and Mediterranean Plant Protection Organization.

- Etienne, J., & Aubert, B. (1980). Biological control of psyllid vectors of greening disease on Reunion Island. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* (Vol. 8, No. 8).
- Fan, G. C., Xia, Y. L., Lin, X. J., Hu, H. Q., Wang, X. D., Ruan, C. Q., ... & Bo, L. I. U. (2016). Evaluation of thermotherapy against Huanglongbing (citrus greening) in the greenhouse. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(1), 111-119.
- FAOSTAT. (2019). Acceso libre a estadísticas sobre alimentación y agricultura.
- Febres. (2011). Citrus Transformation: Challenges and Prospects. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/24526>.
- Fernandes, A., & Aguiar, A. F. (2001). Evolução das pragas de quarenta *Toxoptera citrida* (KIRKALDY) e *Trioza erytreae* (DEL GUERCIO) no Archipiélago da Madeira. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 27(1), 51-58.
- Garza-Saldaña, J. J., Varela-Fuentes, S., & Gómez-Flores, W. (2017). Métodos para la detección presuntiva de Huanglongbing (HLB) en cítricos. *CienciaUAT*, 11(2), 93-104.
- Ghatrehsamani, S., Czarnecka, E., Verner, F. L., Gurley, W. B., Ehsani, R., & Ampatzidis, Y. (2019). Evaluation of mobile heat treatment system for treating in-field HLB-affected trees by analyzing survival rate of surrogate bacteria. *Agronomy*, 9(9), 540.
- Ghosh, D., Kokane, S., Savita, B. K., Kumar, P., Sharma, A. K., Ozcan, A., ... & Santra, S. (2022). Huanglongbing Pandemic: Current Challenges and Emerging Management Strategies. *Plants*, 12(1), 160.
- Gottwald, T. R., Graham, J. H., Irely, M. S., McCollum, T. G., & Wood, B. W. (2012). Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection*, 36, 73-82.
- Gottwald, T.R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual review of phytopathology*, 48, 119–139.
- Halbert, S. E., & Manjunath, K. L. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida entomologist*, 87(3), 330-353.

- Hall, D. G., Gottwald, T. R., Chau, N. M., Ichinose, K., Dien, L. Q., & Beattie, G. A. C. (2007). Intercropping of citrus and guava trees for management of huanglongbing. In *Florida Entomological Society Annual Meeting*.
- Hall, D. G., & Nguyen, R. (2010). Toxicity of pesticides to *Tamarixia radiata*, a parasitoid of the Asian citrus psyllid. *BioControl*, 55(5), 601-611.
- Hartung, J. S., Paul, C., Achor, D., & Brlansky, R. H. (2010). Colonization of dodder, *Cuscuta indecora*, by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’. *Phytopathology*, 100(8), 756-762.
- Hoffman, M. T., Doud, M. S., Williams, L., Zhang, M. Q., Ding, F., Stover, E., ... & Duan, Y. P. (2013). Heat treatment eliminates ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology*, 103(1), 15-22.
- Hou, S., Liu, Z., Shen, H., & Wu, D. (2019). Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. *Frontiers in plant science*, 10, 646.
- Huang, C. Y., Araujo, K., Sánchez, J. N., Kund, G., Trumble, J., Roper, C., ... & Jin, H. (2021). A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus Huanglongbing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6), e2019628118.
- Huang, C. Y., Niu, D., Kund, G., Jones, M., Albrecht, U., Nguyen, L., ... & Jin, H. (2021). Identification of citrus immune regulators involved in defence against Huanglongbing using a new functional screening system. *Plant Biotechnology Journal*, 19(4), 757-766.
- Jagoueix, S., J.M., Bové & M. Garnier. (1994). The phloem-limited bacterium of Greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(3), 379-386.
- Killiny, N., Hijaz, F., Gonzalez-Blanco, P., Jones, S. E., Pierre, M. O., & Vincent, C. I. (2020). Effect of adjuvants on oxytetracycline uptake upon foliar application in citrus. *Antibiotics*, 9(10), 677.
- Koh, J. E., L. Zhou, D. S. Williams, J. Park, N. Ding, Y. P. Duan, & B. H. Kang. 2011. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem

transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Protoplasma*, 249, 687-697.

- Kwakye, S., & Kadyampakeni, D. M. (2023). Micronutrients Improve Growth and Development of HLB-Affected Citrus Trees in Florida. *Plants*, 12(1), 73.
- Li, J., Li, L., Pang, Z., Kolbasov, V. G., Ehsani, R., Carter, E. W., & Wang, N. (2019). Developing citrus huanglongbing (HLB) management strategies based on the severity of symptoms in HLB-endemic citrus-producing regions. *Phytopathology*, 109(4), 582-592.
- Li, T., Zhang, L., Deng, Y., Deng, X., & Zheng, Z. (2021). Establishment of a *Cuscuta campestris*-mediated enrichment system for genomic and transcriptomic analyses of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Microbial biotechnology*, 14(2), 737-751.
- Lin, K. H. (1956). Observations on yellow shoot of Citrus. Etiological studies of yellow shoot of Citrus. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2(1).
- MAPA (2021). Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Planes de contingencia para *Candidatus Liberibacter* spp., *Trioza erytrae* y *Diaphorina citri*.
- Marschner, H. (Ed.). (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- Pestana, M., Correia, P. J., Marques, H., Domingos, I., & de Varennes, A. (2011). Nutrient dynamics in orange trees: the effect of soil fertility. *Communications in soil science and plant analysis*, 42(19), 2351-2360.
- McClean, A. P. D., & Oberholzer, P. C. J. (1965). Citrus psylla, a vector of the greening disease of sweet orange-research note. *South African Journal of Agricultural Science*, 8(1), 297-298.
- Mead, F. & Fasulo, T. (2011). Psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama. *Ed Bioagro*, 30(3), 221-226.
- Monzó, C., Urbaneja, A., & Tena, A. (2015). Los psílicos *Diaphorina citri* y *Trioza erytrae* como vectores de la enfermedad de cítricos Huanglongbing (HLB): reciente detección de *T. erytrae* en la Península Ibérica. *Boletín SEEA*, 1, 29-37.

- Monzó, C., Vanaclocha, P., & Stansly, P. A. (2014). Gestión del HLB y su vector, el psílido asiático de los cítricos en Florida. *Levante Agrícola*, (421), 120-125.
- Morgan, K. T., Obreza, T. A., Kadyampakeni, D., Hamido, S., Ferrarezi, R. S., & Zekri, M. (2020). Nutrition of Florida Citrus Trees: Chapter 9. Irrigation Management to Improve Nutrient Uptake: SL463/SS676, 2/2020. *EDIS*, 2020(2).
- Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Buchman, J. L., & Fisher, T. W. (2012). Effects of temperature on ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Disease*, 96(1), 18-23.
- Otero, R. P., Vázquez, J. P. M., & Del Estal, P. (2015). Detección de la psila africana de los cítricos, *Trioza erytreae* (Del Guercio, 1918) (Hemiptera: Psylloidea: Triozidae), en la Península Ibérica. *Archivos Entomológicos*, (13), 119-122.
- Palomo, J., Siverio, F., & Cubero, J. (2017). Candidatus Liberibacter: agentes causales de enfermedades importantes en cultivos de interés en España. *Fitopatología. Publicación Oficial de la Sociedad Española de Fitopatología. Bacterias asesinas*, (1), 15-22.
- Pandey, S. S., Da Costa Vasconcelos, F. N., Wang, N. (2021). Spatiotemporal dynamics of ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ colonization inside citrus plant and Huanglongbing disease development. *Phytopathology*, 111(6), 921–928.
- Parra, J. R. P., Alves, G. R., Diniz, A. J. F., & Vieira, J. M. (2016). *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) × *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae): mass rearing and potential use of the parasitoid in Brazil. *Journal of Integrated Pest Management*, 7(1).
- Paudyal, K. P. (2015). Technological advances in huanglongbing (HLB) or citrus greening disease management. *Journal of Nepal Agricultural Research Council*, 1, 41-50.
- Pérez-Artiles, L., Busoli, A. C., Sotelo, P. A., & Arcila, A. M. (2017). Biología y parámetros reproductivos de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en diferentes hospederos de Rutaceae. *Revista Colombiana de Entomología*, 43(2), 141-150.
- Pérez-Hedo, M., Alférez, F., Qureshi, J. A., Alonso-Valiente, M., Gallego, C., Forner-Giner, M. A., & Urbaneja, A. (2022). Activación defensiva mediante

exposición a volátiles en cítricos: efecto sobre el HLB y sus principales vectores. In *XII Congreso Nacional de Entomología Aplicada* (pp. 137-137). SEEA.

- Pestana, M., Correia, P.J., Marques, H., Domingos, I., & De Varennes, A. (2011). Nutrient Dynamics in Orange Trees: The Effect of Soil Fertility. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 42(19), 2351–2360.
- *Phytoma*. (2022). Nº 337, 6-8.
- Polek, M. (2007). *Citrus bacterial canker disease and Huanglongbing (citrus greening)*. UCANR Publications.
- Ramadugu, C., Keremane, M. L., Halbert, S. E., Duan, Y. P., Roose, M. L., Stover, E., & Lee, R. F. (2016). Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in Citrus relatives. *Plant Disease*, 100(9), 1858-1869.
- Raychaudhuri, S. P., Nariani, T. K. & Lele V. C. (1969). Citrus die-back problem in India. In *Proceedings of the First International Citrus Symposium* (Vol. 3, pp. 1433-1437). Riverside, CA: University of California.
- *Registro de Productos Fitosanitarios*. (s.f.). <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-productos/>
- Rogers, M. E., & Stansly, P. A. (2007). 2007 Florida Citrus Pest Management Guide: Asian Citrus Psyllid and Citrus Leafminer: ENY-734/IN686, 11/2006. *EDIS*, 2007(10).
- Rasowo, B. A. (2019). *Assessment of incidence, severity and distribution patterns of citrus greening in Kenya and Tanzania; the role of African Citrus Triozid endosymbionts in disease epidemiology* (Doctoral dissertation, Universität Bonn).
- Sáenz Pérez, C. A., Hernández, E. O., Estrada Drouaillet, B., Poot Poot, W. A., Delgado Martínez, R., & Herrera, R. R. (2019). Principales enfermedades en cítricos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(7), 1653-1665.
- Shokrollah, H., Abdullah, T. L., Sijam, K., & Abdullah, S. N. A. (2011). Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks against HLB disease in Malaysia. *Crop Protection*, 30(5), 521-525.

- Stall, R. E., & Civerolo, E. L. (1991). Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. *Annual review of phytopathology*, 29(1), 399-420.
- Stout, M. J., Thaler, J. S., & Thomma, B. P. (2006). Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 663-689.
- Swingle W., & Reece P. (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther W, Webber HJ, Batchelor LD (eds) *The citrus industry. The botany of Citrus and its wild relatives*. Berkeley CA: University of California 1: 190-430.
- Teixeira, D. C., Eveillard-Jagoueix, S., Wulff, N. A., Saillard, C., Ayres, A. J., & Bové, J. M. (2008a). The rplKJL-rpoBC operon of the liberibacters: further proof that *Candidatus Liberibacter americanus* is a distinct species. *Proc. 17th Conf. Int. Org. Citrus Virol.*
- Tena, A., Urbaneja, A., Hernández-Suárez, E., Moure, M., González-Freijo, A. B., Fraga-Vega, X. L., & Cuenca-Valera, B. (2021). Introducción del parasitoid *Tamarixia dryi* en la península ibérica para el control de *Trioza erytreae*. *Phytoma*, (329), 16-23.
- Texeira, D. D. C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., & Bové, J. M. (2005b). 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 disease*, 89(1), 107-107.
- Urbaneja, A., Pérez-Hedo, M., Marco-Noales, E., Urbaneja-Bernat, P., Hernández-Suárez, E., Monzó, C., & Tena, A. (2020). La prevención es todavía la mejor arma contra el huanglongbing o greening de los cítricos. *Vida Rural*, (480), 30-36.
- USDA. (2021). U.S Department of agriculture. Coordinated response to citrus greening disease.
- Van den Berg, MA & Greenland, J. (2000). *Tamarixia dryi*, parasitoid of the citrus psylla, *Trioza erytreae*: a review. *African Plant Protection*, 6(1), 25-28.
- Wang, N. (2019). The citrus huanglongbing crisis and potential solutions. *Mol. Plant* 12(5), 607-609.

- Wang, N., Li, W., Irey, M., Albrigo, G., Bo, K., & Kim, J. S. (2009). Citrus huanglongbing. *Tree Forestry Science Biotechnology*, 3, 67-72.
- Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y. Z., & Martins, J. (2017). The Candidatus Liberibacter-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 107(4), 451-482.
- Zhang, C. (2019) Citrus greening is killing the world’s orange trees. Scientists are racing to help. *Chemical & Engineering News*, 97, 1–11.
- Zhang, M., Powell, C. A., Guo, Y., Doud, M. S., & Duan, Y. (2012). A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and rescuing huanglongbing-affected citrus plants. *Phytopathology*, 102(6), 567-574.
- Zhang, M., Guo, Y., Powell, C. A., Doud, M. S., Yang, C., & Duan, Y. (2014). Effective antibiotics against ‘Candidatus Liberibacter asiaticus’ in HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation. *PloS one*, 9(11), e111032.

