



**NAPPO**

North American Plant Protection Organization

Organización Norteamericana de Protección a las Plantas

**MEXICO - USA - CANADA**

## **PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO DE LA NAPPO**

**PD 02**

**Huanglongbing de los cítricos**

Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas

1431 Merivale Rd., 3rd Floor, Room 140

Ottawa, Ontario, K1A 0Y9 Canadá

15 de octubre de 2012

## Índice

	página
Revisión .....	3
Aprobación .....	3
Implementación .....	3
Registro de enmiendas .....	3
Distribución .....	3
1. Información de la plaga .....	4
2. Información taxonómica.....	4
3. Detección.....	5
4. Identificación.....	6
4.2 Indexaje biológico .....	7
5. Muestro del material propagativo.....	7
6. Registros .....	8
7. Puntos de contacto para información adicional .....	8
8. Reconocimiento .....	9
9. Referencias.....	9

## Revisión

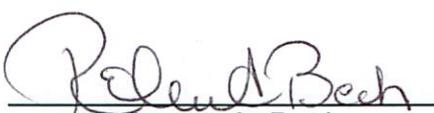
Los Protocolos de Diagnóstico de la NAPPO están sujetos a revisiones y enmiendas periódicas. La fecha de la próxima revisión de este Protocolo de Diagnóstico de la NAPPO es en el año 2017. De solicitarlo un país miembro de la NAPPO, se pueden llevar a cabo revisiones de cualquier Protocolo de Diagnóstico de la NAPPO en cualquier momento.

## Aprobación

El presente Protocolo de Diagnóstico fue aprobado por el Comité Ejecutivo (CE) de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO) el 15 de octubre del 2012 y entrará en vigor a partir de esta fecha.

Aprobada por:

  
\_\_\_\_\_  
Greg Stubbings  
Miembro del Comité Ejecutivo  
Canadá

  
\_\_\_\_\_  
Rebecca A. Bech  
Miembro del Comité Ejecutivo  
Estados Unidos

  
\_\_\_\_\_  
Javier Trujillo Arriaga  
Miembro del Comité Ejecutivo  
México

## Implementación

No aplica.

## Registro de enmiendas

Las enmiendas a esta norma serán fechadas y archivadas en la Secretaría de la NAPPO.

## Distribución

La Secretaría de la NAPPO distribuye esta norma a los Miembros Asociados, al Grupo Consultivo de la Industria y, la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) y a otras Organizaciones Regionales de Protección Fitosanitaria ORPF).

## 1. Información de la plaga

El huanglongbing (HLB) o enverdecimiento de los cítricos (da Graça y Korsten, 2004) es una de las enfermedades más graves que afectan a la citricultura mundial (Halbert, 1998). Está asociada con las bacterias *Candidatus Liberibacter* spp., una bacteria fastidiosa que reside en los psílicos infectados y en los elementos de los tubos cribosos del floema de las plantas infectadas.

Ha sido difícil detectar a la bacteria de manera constante por ensayos biológicos (Roistacher, 1991), por la presencia de sustancias fluorescentes y microscopía de luz o de electrones, o por serología, debido a la baja concentración y distribución irregular del patógeno en las plantas hospedantes e insectos vectores.

El HLB se detectó en el 2004 en Sao Paulo, Brasil, en la región de Araraquara (Coletta et al., 2004). En septiembre del 2005 se confirmó su presencia en Florida, en el 2006 fue detectado en Cuba y en el 2008 en Luisiana, Georgia, y Carolina del Sur (EE. UU.) (NAPPO, s.f.) .En el 2009, la bacteria se detectó en el estado de Yucatán, México, representando un riesgo inminente para la citricultura mexicana sobre todo porque el psílido vector (*Diaphorina citri* Kuwayana) de las razas americana y asiática está presente en todos los estados productores de cítricos. Desde entonces, también se ha reportado el HLB en los Estados de Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche, Colima, Sinaloa, Michoacán, Chiapas, Hidalgo, y Baja California Sur. En el 2012, el HLB se detectó en Texas (Texas Department of Agricultura, 2012) y en el condado de Los Angeles, California (EE. UU.) (CDFA, 2012).

## 2. Información taxonómica

Durante el 13er Congreso de la Organización Internacional de Virólogos de Cítricos realizada en Fuzhou, China, en 1995, los delegados adoptaron al “huanglongbing” (HLB) como el nombre oficial de la enfermedad en honor del profesor Lin Kongxiang (Kung Hsiang) (da Graça et al, eds. 1996) En chino, esto significa “enfermedad de los brotes amarillos”. También se conoce como enverdecimiento” en África y Estados Unidos (igualmente se traduce a varios otros idiomas europeos), “likubin” (=”deterioro”) en Taiwán, “degeneración de las venas del floema” en Indonesia, “moteado de la hoja” en Filipinas, y “muerte regresiva de los cítricos” en India (Bové, 2006).

El agente causal aparentemente asociado de manera constante a los síntomas del HLB es una bacteria gram negativa, limitada al floema perteneciente a la subdivisión alfa de las proteobacterias (Jagoueix et al., 1994). La microscopía electrónica ha revelado bacterias elongadas en forma de barras en los tubos cribosos de plantas infectadas. Puesto que la bacteria no ha sido aislada y no se han completado los postulados de Koch, hasta ahora se le denomina a la bacteria “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, “*Ca. L. africanus*” o “*Ca.*

L. americanus” en conformidad con la *International Journal for Systematic & Evolutionary Microbiology* (IJSEM, 2012).

El HLB existe en la naturaleza bajo tres razas que difieren en su patogenicidad por una combinación de condiciones ambientales e insectos vectores (Jagoueix et al., 1996); estas son:

- “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” Garnier (Las)
- “*Candidatus Liberibacter africanus*” Garnier (Laf)
- “*Candidatus Liberibacter americanus*” Texeira et al., 2005 (Lam)

La raza africana del HLB es sensible al calor y no causa síntomas a temperaturas mayores de 25 – 30 °C. La raza asiática está distribuida principalmente en Asia y se introdujo recientemente al hemisferio occidental en algún momento durante finales de los noventa o principios del 2000. Es tolerante al calor y puede causar síntomas a temperaturas mayores de 30 °C (Bové y Garnier, 2002; Bové, 2006). La raza americana, que se reportó en Brasil, parece tener tolerancia al calor semejante a la raza africana (Lopes et al., 2009).

### 3. Detección

El HLB es una enfermedad que afecta a toda la planta. La expresión de síntomas por lo general se retrasa hasta por varios meses después de que la planta se ha infectado. El síntoma inicial es amarillamiento de las hojas de algunas ramas que contrasta con el color verde de toda la planta. Estos son más evidentes durante la época otoño-invierno, observándose amarillamiento y moteado intensos (Bové, 2006).

**En las hojas** se observa una coloración amarillo pálido con áreas irregulares (asimétricas) de color verde (moteado) (figura 1), engrosamiento y aclaración de las nervaduras, que al cabo de un tiempo quedan con un aspecto corchoso. Se presentan diferentes niveles de defoliación. También se observa difusión de colores en las nervaduras y foliolos, lo cual puede confundirse con deficiencias de minerales (zinc y cobre) (Colletta-Filho et al., 2004).

**En las ramas** hay una defoliación intensa cuando la enfermedad ha evolucionado. Los síntomas pueden aparecer en toda la copa y los árboles pueden secarse y morir. **En frutos** se observa deformación y asimetría, reducción del tamaño, aparición de áreas de color verde claro que contrastan con el color amarillo o naranja normal del fruto. Internamente se observan diferencias en maduración y el aborto de semillas (figura 2), desviación del eje y en algunos casos, la parte blanca de la cáscara (albedo) se presenta con una espesura mayor de lo normal (Bové, 2006).



Figura 1. Moteado asimétrico, síntomas típicos de HLB en hojas. Foto: lobana Alanís.



Figura 2. Deformación de fruto y semillas abortivas. Foto: Pedro Robles.

#### 4. Identificación

Para el diagnóstico de HLB se han utilizado dos técnicas: reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) y la PCR en tiempo real (PCR-RT, también conocida como PCR cuantitativa = qPCR) que se basan en el uso de iniciadores de PCR que amplifican las secuencias de ADN de los Liberibacters asociados con HLB. Los métodos de PCR convencional emplean iniciadores específicos que amplifican las secuencias de los genes 16s rDNA e iniciadores basados en genes proteínicos (operon-B) (Jagoueix et al., 1996; Tian et al., 1996; Hocquellet et al., 1999, Teixeira et al., 2005). La concentración baja y distribución irregular del patógeno en las plantas hospedantes, así como los inhibidores de la PCR presentes en los extractos de cítricos, han dificultado la detección del patógeno. Aunque la PCR convencional y la qPCR son técnicas aceptadas como confirmatorias de árboles sintomáticos para el HLB en Brasil y Estados Unidos, la qPCR es mucho más sensible y robusta que la PCR convencional y la técnica ha sido validada en extractos de ADN de diferentes especies de cítricos y de tejidos diferentes, procedentes de diversas regiones geográficas. La técnica de qPCR aceptada actualmente fue desarrollada por Li y asociados (Li et al., 2006, 2007).

Los países de la NAPPO aprueban para uso los siguientes protocolos elaborados por el APHIS-USDA-PPQ-CPHST:

- 1) "Plant sample extraction for use in citrus greening or huanglongbing molecular diagnostic assays", y
- 2) "Real-time PCR for diagnostic detection of citrus greening or huanglongbing from plant samples".

Estos protocolos están disponibles en el capítulo "DNA extraction and PCR detection in citrus" del documento "New Pest Response Guidelines – Citrus Greening

([http://www.aphis.usda.gov/plant\\_health/plant\\_pest\\_info/citrus\\_greening/downloads/pdf\\_files/cg-nprg.pdf](http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/citrus_greening/downloads/pdf_files/cg-nprg.pdf)). Además de los protocolos mencionados, se recomienda confirmar el diagnóstico del HLB por PCR convencional, utilizando los iniciadores OI1-OI2c (Jagoueix et al., 1996), A2-J5 (Hocquellet et al., 1999) para las razas asiática y africana y los primers GB1-GB3 (Teixeira et al., 2005) para la raza americana. También es recomendable obtener las secuencias de los fragmentos amplificados.

## 4.2 Indexaje biológico

Aunque actualmente la qPCR es el método más empleado para el diagnóstico del HLB *in planta*, la técnica de indexaje biológico también está disponible y será resumida brevemente. Debido a que la tasa de transmisión de la bacteria asociada al HLB por injerto es ocasionalmente baja la tasa de éxito del indexaje biológico para HLB es variable. Las plantas indicadoras idóneas son naranja dulce o tangelo Orlando para la raza africana y naranja dulce o mandarina Ponkan para la raza asiática. La presencia del virus de tristeza de los cítricos (CTV) puede interferir en la expresión de síntomas del HLB y si el CTV está presente, la toronja puede utilizarse como indicadora. La técnica preferida de inoculación es el injerto lateral y como alternativo, injertos de hoja. Las plántulas indicadoras conservan un solo tallo principal y se mantienen a 20 – 25 °C para el HLB africano y 25 – 32 °C para el HLB asiático. La expresión de síntomas es moteado y clorosis típicos en hojas. Los brotes son claramente más pequeñas, más cloróticas y con hojas más pequeñas que los testigos no inoculados. Los síntomas deberían presentarse entre 8 a 12 semanas después de la inoculación. Para obtener más información sobre indexaje biológico en general y para el HLB específicamente, véase Roistacher (1991) o Roistacher (1998).

## 5. Muestro del material propagativo

Los métodos de muestreo son críticos para la detección, identificación y cuantificación de especies de *Liberibacter*, ya que su distribución en plantas hospedantes y en el psílido vector puede ser irregular o en una incidencia o título muy bajo. En árboles con síntomas, se colectan muestras de 1 a 4 ramas con hojas o frutos sintomáticos. Si no se encuentran síntomas en el árbol sospechoso, se colectan muestras de ramas de un año de edad con 5 a 10 hojas, tomadas de cuatro puntos de la parte superior del árbol. Si no hay ramas disponibles, como en el caso de los árboles pequeños de vivero, se colectan 1 a 12 hojas completamente maduras de cada árbol (Li et al., 2009). Antes y durante el envío de las muestras a analizar, éstas deberían protegerse del calor para evitar la posible degradación del ADN del patógeno.

La exploración periódica y el muestreo de las diferentes unidades de producción de material propagativo son fundamentales para detectar oportunamente al HLB. Es

importante señalar que estas unidades de producción deberían estar protegidas (con malla) y preferiblemente alejadas de las zonas o regiones productoras de cítricos. Se recomienda realizar las siguientes actividades de diagnóstico visual y molecular.

<b>Unidad</b>	<b>Diagnóstico molecular (qPCR)</b>	<b>Diagnóstico visual</b>
Banco de germoplasma	100% individual anual	100% cada tres meses
Lote fundación	100 % individual anual	100% cada tres meses
Lote multiplicador	10% anual, usando yemas de muestras compuestas de 5 plantas	100% cada mes
Huerta de semillas	25 % individual anual, rotativo para cubrir el 100 % de la huerta en 4 años	100% cada mes
Vivero	2% del total de las plantas a movilizar	100% cada mes

## 6. Registros

Se debería mantener un registro de las muestras analizadas para el diagnóstico de HLB, el cual debería contener:

- Código o número de referencia de la muestra.
- Variedad y origen de la muestra.
- Descripción de síntomas (incluyendo las fotografías, de ser pertinentes) o la ausencia de éstos.
- Métodos utilizados en el diagnóstico y los resultados obtenidos.
- Nombre del laboratorio y, cuando proceda, el nombre de las personas responsables del diagnóstico.

Los registros y las evidencias de los resultados del diagnóstico deberían conservarse por lo menos durante cuatro años con la finalidad de dar seguimiento a los resultados en las diferentes unidades de producción como el banco de germoplasma y la huerta productora de semillas.

## 7. Puntos de contacto para información adicional

Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Dirección General de Sanidad Vegetal.  
Guillermo Pérez Valenzuela No. 127 Col. Del Carmen, Coyoacán, Del. Coyoacán, México, DF 04100.

Citrus Clonal Protection Program, Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, CA 92521, USA.

USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository for Citrus & Dates, 1060 Martin Luther King Blvd., Riverside, CA 92507, USA.

## 8. Reconocimiento

Wenbin Li and Laurene Levy. National Plant Germplasm and Biotechnology Laboratory USDA-APHIS-PPQ-CPHST, Beltsville, MD 20705, United States.

Robert Krueger. USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository for Citrus & Dates, 1060 Martin Luther King Blvd., Riverside, CA 92507, USA.

Georgios Vidalakis. Citrus Clonal Protection Program, Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, CA 92521, USA.

Elena Iobana Alanís Martínez. Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. SENASICA. Rancho G. B. Km. 21 Carretera Amazcala – Chichimequillas. El Marques, Querétaro.

## 9. Referencias

Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.

Bové, J.M y M. Garnier. 2002. Phloem- and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science* 163:1083-1098.

Coletta-Filho, M. L., P. N. Targon, M. A. Takita, J. D. De Negri, J. Pompeu Jr., M. A. Machado, A. M. do Amaral y G. W. Muller. 2004. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing ("*Candidatus Liberibacter asiaticus*") in Brazil *Plant Disease* 88:12, 1382-1382.

CDFA. 2012.

[http://www.cdfa.ca.gov/egov/Press\\_Releases/Press\\_Release.asp?PRnum=12-012](http://www.cdfa.ca.gov/egov/Press_Releases/Press_Release.asp?PRnum=12-012)

da Graça J.V. y L. Korsten 2004. Citrus huanglongbing: review, present status and future strategies. Pp. 229-245 in: SAMH Naqvi (ed). *Diseases of Fruits and Vegetables*. Vol I. Kluwer.

Halbert S.E. 1998. Entomology Section. *Tri-ology* (May-June 1998) 37 (3): 6-7

Hocquellet, A., P.Toorawa, J.M. Bove y M. Garnier. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the h operon. *Mol. Cell. Probes* 13: 373-379.

*International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* (IJSEM) 2012. Some names included in the category *Candidatus*. J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/candidatus.html>. Consultada el 21 de

junio de 2012.

Jagoueix, S., J.M., Bové y M. Garnier.1994. The phloem-limited bacterium of Greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$  subdivision of the *Proteobacteria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44(3):379-386.

Jagoueix, S., J.M., Bové y M. Garnier.1996. PCR detection of the two 'Candidatus' Liberobacter species associated with greening disease of citrus. Mol. Cell. Probes 10:43–50.

Li, W.B., J.S. Hartung y L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. [PCR cuantitativa en tiempo real para detectar e identificar candidatos de especies de *Liberibacter* asociadas con el citrus huanglongbing] J. Microbiol. Methods 66:104-115.

Li, W.B., J.S. Hartung y L. Levy. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of “*Candidatus* Liberibacter species” associated with citrus huanglongbing. Plant Disease 91:51-58.

Li W. and Levy L. 2009. Citrus huanglongbing diagnosis based on molecular detection of associated Liberibacter species.

<http://www.calcitrusquality.org/wp-content/uploads/2009/05/manuscript.pdf>

Lopes, S.A., G. F. Frare, E. Bertolini, M. Cambra, N. G. Fernandes, A. J. Ayres, D. R. Marin y J. M. Bové. 2009. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, '*Ca* L *americanus*' is heat sensitive. Plant Dis 93:257-262.

NAPPO, s.f. <http://www.pestalert.org>

Roistacher, C.N. 1991. Graft-Transmissible Diseases Of Citrus. Handbook for detection and diagnosis. Rome: FAO. 280 pp.

Roistacher, C.N. 1998. Indexing for viruses in citrus. Páginas 301-319 en: Hadidi, A., R.K. Khetarpal and H. Koganezawa, eds. Plant Virus Disease Control. St Paul: APS Press.

Texas Department of Agriculture. 2012.

<http://www.texasagriculture.gov/NewsEvents/NewsEventsDetails/tabid/76/Article/1802/texas-department-of-agriculture-and-usda-confirm-detection-of-plant-disease-tha.aspx>

Texeira, D.C, J. Ayres, E. W. Kitajima, L. Danet, S. Jagoueix-Eveillard, C. Saillard y J. M. Bové. 2005. First Report of a Huanglongbing-Like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil and Association of a New Liberibacter Species, “*Candidatus* Liberibacter *americanus*”, with the Disease. Plant Disease 89:107.

Tian, Y., Ke, S., y Ke, C. 1996. Polymerase chain reaction for detection and quantitation of *Liberibacter asiaticum*, the bacterium associated with huanglongbing (greening) of citrus in

China. Páginas 252-257 en: Proc. 13<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists. J. V. da Graca, P. Moreno, y R. K. Yokomi, eds. University of California.