

Compendium para el manejo integrado del HLB



ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL
DE SANIDAD AGROPECUARIA

TAIWAN





ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL
DE SANIDAD AGROPECUARIA



COMPENDIUM PARA EL MANEJO INTEGRADO DEL HLB

EN ACCIÓN CONTRA EL HLB

Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria
Compendium para el manejo integrado del HLB

DIRECTORIO

M.Sc. EFRAÍN MEDINA GUERRA
Director Ejecutivo

MVZ. OCTAVIO JAVIER CARRANZA DE MENDOZA
Director Técnico

M.Sc. NOEL BERMÚDEZ CRUZ
Director de Administración y Finanzas

DR. CARLOS URÍAS
Director Regional de Sanidad Vegetal

DR. ABELARDO DE GRACIA
Director Regional de Salud Animal

ING. RAÚL RODAS SUAZO
Director Regional de Servicios Cuarentenarios

PH.D. LAURIANO FIGUEROA QUIÑÓNEZ
Director Regional de Inocuidad de Alimentos

MSc. XAVIER ISAAC EUCEDA
Programa Regional de HLB de los Cítricos

ISBN: 978-99923-896-9-0

OIRSA
Calle Ramón Belloso, final Pasaje Isolde,
Edificio OIRSA, Colonia Escalón,
San Salvador, El Salvador
PBX: + (503) 2263-1123 / + (503) 2209-9200
www.OIRSA.org
OIRSA@OIRSA.org

COMUNICACIÓN INSTITUCIONAL Y RELACIONES PÚBLICAS

M. Sc. Juan Pablo Guzmán
comunicaciones@OIRSA.org
Tel.: + (503) 2209-9200, Ext. 403

PRODUCCIÓN EDITORIAL:

F&G Editores
informacion@fygeditores.com
www.fygeditores.com

San Salvador, marzo de 2019

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| Mensaje del Director ejecutivo del OIRSA, Ing. Efraín Medina Guerra | vii |
| Mensaje de Timothy T. Y. Hsiang Secretario general de Taiwán ICDF | ix |
| Introducción | xi |

PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS SANAS DE CÍTRICOS

1

| | |
|--|----|
| Glosario | 5 |
| I. La historia del huanlongbing (HLB) en Taiwán | 7 |
| II. El huanglongbing de los cítricos | 9 |
| III. Tecnología para la producción de plantas sanas | 11 |
| IV. Buenas prácticas de manejo de invernaderos de cítricos | 33 |
| Apéndice 1. Información básica de las principales enfermedades de los cítricos | 45 |
| Apéndice 2. Plagas reglamentadas y su método de diagnóstico en un programa de certificación de plantas sanas de cítricos | 51 |
| Apéndice 3. Esterilización de sustratos en sistemas de producción de planta sana de cítricos | 55 |
| Apéndice 4. Planos de los viveros para planta sana | 57 |
| Bibliografía | 61 |

PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO DE HUANGLONGBING EN HOJAS DE CÍTRICOS

63

| | |
|---|----|
| I. Procedimiento de muestreo de huanglongbing en hojas de cítricos | 67 |
| II. Sugerencia para el muestreo de HLB en hojas de cítricos | 69 |
| III. Método de la reacción almidón con yodo para prediagnóstico del huanglongbing de los cítricos | 71 |
| IV. Preparación de reactivos para la extracción de ADN | 75 |
| V. Procedimiento para extraer ADN de tejido vegetal | 81 |
| VI. Procedimientos de PCR convencional y electroforesis | 83 |
| VII. Formato para presentar informes de la detección de HLB con PCR convencional | 85 |
| Bibliografía | 87 |

**PROTOCOLO DEL MANEJO INTEGRADO
DEL HUANGLONGBING
89**

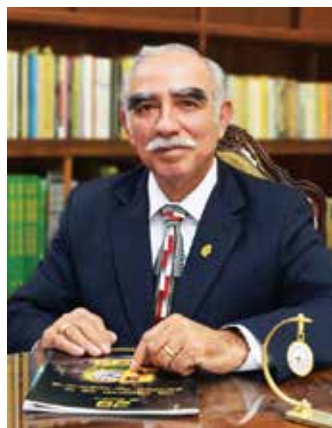
| | |
|---|-----|
| I. Impacto económico del HLB sobre los cítricos en la región del OIRSA | 93 |
| II. Transmisión de la bacteria asociada al HLB | 94 |
| III. Control del HLB según la incidencia de la infección | 98 |
| IV. Tratamiento alternativo con endoterapia | 103 |
| V. Bases de la metodología MIP para el control del HLB | 105 |
| VI. Medios de diseminación de algunas enfermedades de los cítricos | 125 |
| VII. Parcelas demostrativas MIP, experiencia en Honduras | 126 |
| VIII. Guía de campo para la identificación de síntomas de HLB y otras enfermedades | 131 |
| IX. Recomendaciones | 148 |
| Bibliografía | 149 |

**PROTOCOLO PARA EL MONITOREO DE
DIAPHORINA CITRI KUWAYAMA (HEMIPTERA)
151**

| | |
|--|-----|
| I. Objetivos | 155 |
| II. Antecedentes y resumen de la información | 155 |
| III. Materiales y metodología | 156 |
| Bibliografía | 161 |

MENSAJE DEL DIRECTOR EJECUTIVO DEL OIRSA, ING. EFRAÍN MEDINA GUERRA

Los cítricos son de gran importancia para Centroamérica y el Caribe. Son alimentos accesibles y útiles en la dieta de las comunidades más pobres y una rica fuente de vitamina C y nutrientes que fortalecen el sistema inmunológico del organismo humano. También proveen ingresos alternativos para productores y viveristas. Por ello, para el OIRSA, ministerios y secretarías de Agricultura, con el apoyo de la República de China (Taiwán) ha sido prioridad mantener accesibles las fuentes de cítricos en términos fitosanitarios por medio de la generación y transferencia de tecnología para facilitar y mejorar su producción.



A partir de 2008, la citricultura regional está siendo seriamente afectada por los daños que ocasiona el huanglongbing (HLB), la más devastadora enfermedad de los cítricos a nivel mundial, que a la fecha no tiene cura y no existen variedades tolerantes, y cuya presencia está confirmada en ocho países miembros del OIRSA.

El propósito del OIRSA y de los ministerios y secretarías de Agricultura de los países que lo conforman es brindar asistencia técnica para fortalecer la capacidad regional en el control del HLB en forma sostenible que permita disminuir las pérdidas económicas por esta enfermedad salvaguardando la citricultura regional.

Este *Compendium para el manejo integrado del HLB* contribuirá a salvaguardar la citricultura regional para beneficiar a más de 120,000 productores de la región del OIRSA, contribuyendo de esta manera a la seguridad alimentaria, en la tarea de alcanzar los objetivos de desarrollo sostenible, mostrando acciones cada vez más eficientes, participativas y en sintonía con los grandes desafíos del sector agrícola mundial.

Ing. Efraín Medina Guerra
Director Ejecutivo de OIRSA

MENSAJE DE TIMOTHY T. Y. HSIANG SECRETARIO GENERAL DE TAIWÁN ICDF

Representa un honor y placer para Taiwán ICDF trabajar en conjunto con el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). Este sólido equipo presenta este *Compendium para el manejo integrado del HLB*, que recopila estrategias técnicas para enfrentar la enfermedad más devastadora de los cítricos: el huanglongbing o HLB. Taiwán posee una experiencia de más de 65 años de convivir con esta enfermedad, es por ello que nuestro pueblo ha puesto a disposición del OIRSA y los países que lo conforman especialistas altamente calificados y de renombre mundial que continuamente brindan acompañamiento técnico y generan capacidades en técnicos, productores y viveristas nacionales, para lograr el éxito con esta alianza estratégica con los ministerios de Agricultura.




A través de la vinculación con OIRSA y lo que éste representa para la seguridad alimentaria, la República de China (Taiwán) contribuye a alcanzar los objetivos de desarrollo sostenible de Naciones Unidas.

El mayor objetivo de este *Compendium* es controlar esta devastadora enfermedad a través de la transferencia de tecnología y brindando a productores y viveristas las herramientas necesarias para obtener rendimientos acordes con la demanda de alimentos que existe regional y mundialmente.

Una de las principales estrategias es desarrollar la capacidad de suplir árboles de cítricos sanos, de alta calidad productiva y genética y propiciar que los productores adopten tecnología efectiva para el manejo integrado del HLB.

Los invito a seguir trabajando arduamente en favor de los citricultores y viveristas de la región, dado que el presente *Compendium* forma parte del esfuerzo de mi pueblo, que se siente orgulloso de lograr una estrecha relación de confianza con una citricultura regional con enorme futuro.

Muchas gracias,



Timothy T. Y. Hsiang
Secretario general de Taiwán ICDF

INTRODUCCIÓN

La industria cítrica de la Región del Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) (México, Guatemala, Belice, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá y República Dominicana) cuenta con una superficie de 703,900 ha (alrededor de 220 millones de plantas) en manos de 129,191 productores, con un rendimiento promedio de 14 tm/ha; de manera directa da ocupación a más de 127 mil personas, a indirectamente a casi 228 mil.

A partir de 2008, la citricultura está amenazada por la introducción del huanglongbing, una de las más devastadoras enfermedades de los cítricos, ya presente en ocho de los nueve países miembros (89%). En las plantaciones infectadas con el HLB, los árboles viven solamente de 6 a 8 años y los frutos no son utilizables, pues pequeños, de forma irregular, de baja calidad y no buen sabor. En algunas áreas cítricas con HLB económicamente es inviable producir frutos.

Dada la importancia de la citricultura, el OIRSA, siguiendo el mandato del Comité Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (CIRSA), estableció un convenio de Cooperación con la Fundación Internacional de Cooperación y Desarrollo (ICDF) de la República de China (Taiwán) para ejecutar conjuntamente un proyecto con duración de cinco años para el control y manejo de la enfermedad. Este proyecto finalizó en diciembre de 2017; luego surge un programa regional de control de HLB de los cítricos de forma permanente con el respaldo de OIRSA y sus Estados miembros.

Entre las actividades relevantes del programa para el manejo integrado del HLB, actualmente vigente, están: la generación de capacidades técnicas (entre citricultores, viveristas, técnicos, autoridades locales y público en general) para la producción de planta sana de cítricos de alta calidad genética y productiva, el fortalecimiento de un diagnóstico confiable para HLB y otras plagas de interés, y el desarrollo de un sistema regional de vigilancia fitosanitaria para detectar oportunamente la aparición de brotes en las zonas cítricas y urbanas (traspáticos).

El manejo integrado del HLB implica reducir el daño que esta enfermedad causa a los cítricos. Es un proceso de toma de decisiones que combina diferentes estrategias para aplicar soluciones de corto, mediano y largo plazo. El manejo integrado del HLB utiliza una combinación de métodos biológicos, culturales y químicos de una forma compatible para obtener un control satisfactorio, con consecuencias económicas favorables y el mínimo impacto ambiental posible.

Este *Compendium* recopila diversas estrategias de manejo del HLB y su vector, basadas en la experiencia de Taiwán y en los proyectos regionales

del OIRSA. Está destinado a ser una guía para productores y técnicos en el manejo asertivo de la enfermedad.

El *Compendium* recoge cuatro documentos técnicos, tres de ellos publicados previamente: Protocolo para la producción de plantas sanas de los cítricos, Protocolo de diagnóstico de huanglongbing en hojas de cítricos, Protocolo para el manejo integrado del huanglongbing, y Protocolo para el monitoreo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera).

En el Protocolo de diagnóstico de huanglongbing... se explica la metodología de la República de China (Taiwán) para la producción de plantas sanas, la infraestructura de invernadero de yemas sanas y la instrucción de cómo cultivarlas en el bloque de multiplicación de yemas.

El Protocolo de diagnóstico de huanglongbing... desarrolla procedimientos para el muestreo de hojas de cítricos destinados a establecer la existencia del HLB. De manera puntual explica cómo aplicar las técnicas de yodo-almidón, extracción de ADN y uso de la técnica de laboratorio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*).

El Protocolo para el manejo integrado... explica la aplicación de distintos procedimientos, entre ellos endoterapia y eliminación de árboles infectados. Particular atención merece en esta parte la guía de campo, profusamente ilustrada, para la identificación de síntomas del HLB y otras enfermedades de los cítricos.

Por último, se incluye un protocolo destinado al monitoreo de *Diaphorina citri*, vector de *Candidatus Liberibacter* sp., bacteria causante del HLB.

No está demás indicar que este documento deberá ajustarse a las condiciones agroecológicas locales y las capacidades de reacción de esta plaga en los diferentes cultivares cítricos, en cada país de la Región OIRSA.

Protocolo para la producción de plantas sanas de cítricos

En acción contra el HLB



CONTENIDO

| | |
|--|----|
| GLOSARIO | |
| | 5 |
| I. | |
| LA HISTORIA DEL HUANLONGBIGN (HLB) EN TAIWÁN | |
| | 7 |
| II. | |
| EL HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS | |
| | 9 |
| III. | |
| TECNOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS SANAS | |
| | 11 |
| 3.1. El sistema de plantas sanas | 11 |
| 3.2. Procedencia del material sano | 14 |
| 3.3. Limpieza del material con la metodología del <i>shoot-tip micrografting</i> (STG) | 15 |
| 3.4. Condiciones y requerimientos para la construcción de invernaderos para la producción de plantas sanas | 19 |
| 3.5. Selección de patrones | 21 |
| 3.6. Producción de patrones de cítricos | 22 |
| 3.7. Procedimiento de injertación | 29 |
| IV. | |
| BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO DE INVERNADEROS DE CÍTRICOS | |
| | 33 |
| 4.1. Buenas prácticas de bioseguridad | 33 |
| 4.2. Uso de abonos y sustratos | 33 |
| 4.3. Manejo dentro de los invernaderos de nivel 1 y 2 | 34 |
| 4.4. Normativa regional | 35 |
| 4.5. Control de plagas | 37 |
| 4.6. Desinfección del personal de los sistemas de producción de cítricos | 42 |

APÉNDICE 1.
INFORMACIÓN BÁSICA DE LAS
PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS
45

| | | |
|----|--|----|
| A. | HLB (<i>Citrus Huanglongbing</i> , <i>Citrus greening</i>) | 45 |
| B. | Citrus tristeza | 46 |
| C. | <i>Citrus Tatter-leaf</i> | 47 |
| D. | Citrus exocortis | 48 |

APÉNDICE 2.
PLAGAS REGLAMENTADAS Y SU MÉTODO
DE DIAGNÓSTICO EN UN PROGRAMA DE
CERTIFICACIÓN DE PLANTAS SANAS DE CÍTRICOS
51

| | | |
|----|--------------------------------|----|
| A. | Las especies de detección | 51 |
| B. | Las formas de detección | 51 |
| C. | El procedimiento de inspección | 51 |

APÉNDICE 3.
ESTERILIZACIÓN DE SUSTRATOS EN SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN DE PLANTA SANA DE CÍTRICOS
55

APÉNDICE 4.
PLANOS DE LOS VIVEROS PARA PLANTA SANA
57

BIBLIOGRAFÍA
61

GLOSARIO

BLOQUE DE FUNDACIÓN. Nivel 1, o planta madre.

BLOQUE DE MULTIPLICACIÓN DE YEMAS. Nivel 2, o árbol de yema.

CCaV-XYV refiriéndose a la caquexia-xiloporosis de los cítricos.

CEVd se refiere a *Citrus exocortis viroid*.

CiLV. Denominación para el virus de la leprosis de los cítricos.

CÍTRICOS. En ese caso se refiere a los géneros *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus* pertenecientes a la familia de las rutáceas.

CPsV. Denominación para el virus de psorosis de los cítricos

CTLV. *Citrus tatter leaf capillovirus*.

CTV. *Citrus tristeza closterovirus*.

CVC. Clorosis variegada de los cítricos.

DIAGNÓSTICO DE HLB puede ser por PCR (*polymerase chain reaction*), o por prueba de reacción yodo-almidón, es una prueba rápida de campo.

HUANGLONGBING (HLB) se conoce como *Citrus greening*, *Likubin*, *Yellow Dragon Disease*. Es una bacteria, cuyo nombre científico es *Candidatus Liberibacter*.

MICRO-INJERTO. O STG (*shoot-tip micrografting technique*), es un método de saneamiento o limpieza de plantas de cítricos.

PLANTA SANA. Una planta sana es una plántula de cítrico que se cultiva bajo un sistema de manejo específico y observado científicamente, bajo un ambiente protegido (invernaderos), que restrinja el ingreso de insectos y patógenos que puedan propagar plagas como el HLB. Para diagnosticar las plantas como sanas, deben hacerse las pruebas de laboratorio necesarias y realizarse en un laboratorio oficial o acreditado por la autoridad competente.

PRODUCCIÓN DE PLANTAS SANAS. Nivel 3, o vivero de plantas comerciales.

Vector de HLB. El insecto *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae [psyllidae]).

I. LA HISTORIA DEL HUANLONGBIGN (HLB) EN TAIWÁN

Taiwán ha convivido con el HLB por más de 66 años y ha producido plantas sanas por 35 años. De forma cronológica, la historia es la siguiente:

- **1907.** *Diaphorina citri* (Kuwayama 1908) fue descrita para cítricos en Taiwán y publicado en 1908.
- **1951.** Huanglongbing (Likubin) fue identificado en Taiwán.
- **1955.** La enfermedad de huanglongbing arrasó con las plantaciones comerciales de las variedades de cítricos: Pokan, Tankan y Liuchen.
- **1975.** Los pomelos Wentan y Peiyu se volvieron susceptibles al huanglongbing.
- **1981.** Se estableció un bloque de fundación.
- **1983-1986.** Se liberaron en campo 64 adultos del parasitoide *T. radiata* obtenidos de Isla Reunión para el control del psílido vector.
- **1986.** Se declaró que el patógeno del HLB era una bacteria fastidiosa, ya que los síntomas desaparecían temporalmente cuando se inyectaban antibióticos.
- **1991.** Se realizó el descubrimiento de los métodos de diagnóstico, por PCR, utilizando ADN para detectar el patógeno del HLB en plantas y en psíidos infectados.
- **1996.** Se establecen las regulaciones para la producción de plantas sanas y la cuarentena interna.
- **2005.** Inicia el programa de certificación de yemas y de viveros.

II. EL HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS

El HLB, *citrus greening* o enverdecimiento de los cítricos es una enfermedad causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., gram negativa, vascular, limitada al floema, que no es posible cultivarla en forma aislada en medios artificiales.

El HLB puede ser transmitido por *Trioza erythrae* y *Diaphorina citri*, pero el vector más importante para el continente americano es el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae [Psyllidae]). La bacteria es de difícil control, afecta la vida útil de las plantas tanto jóvenes como adultas de todos los cítricos, incluyendo a sus híbridos.



Figura 1. *Candidatus Liberibacter* spp. es una bacteria gram negativa, limitada al floema de las plantas.

Por el momento no existe ningún tipo de cítricos capaz de sobrevivir al HLB (por no haber tolerancia y/o resistencia). Es una enfermedad que causa desnutrición, siendo este un síntoma común que tiende a confundirse con otras causas. Por ende, la detección del HLB es difícil, ya que los síntomas pueden tardar en aparecer o confundirse con otras enfermedades y/o deficiencias nutricionales. Sin embargo, mediante el *kit* de reacción yodo-almidón es útil para la detección de HLB en el campo y de ser necesario confirmar por medio de PCR en los laboratorios oficiales en cada uno de los países miembros del OIRSA.

Las principales características de las deficiencias nutricionales es que presentan moteados “simétricos” en las hojas, esto debido a que las plantas sufren una disponibilidad insuficiente de nutrientes, expresan unas características anormales visibles específicas para esos elementos, mien-

tras que la enfermedad del HLB es un moteado difuso o asimétrico. En particular, para las principales deficiencias nutricionales en cítricos podemos mencionar:

Hierro: amarillamiento de hojas nuevas, en casos moderados las venas de la hoja permanecen de color verde (clorosis intervenal). En casos severos, las hojas se vuelven color marfil sin una venación visible, seguido por abscisión de la hoja y ramas tiernas.

Zinc: las hojas nuevas son amarillas, moteadas simétricamente, si los síntomas son moderados, las venas son verdes, con áreas intervenales de color amarillo o crema. Cuando los síntomas son severos, las venas se vuelven amarillas.

Manganeso: clorosis intervenal en el follaje nuevo. El tamaño de la hoja es normal. Las venas son de color verde pero indistinto o moteado simétrico.

Magnesio: amarillamiento en forma de V invertida en el ápice de la hoja, especialmente en las hojas viejas.

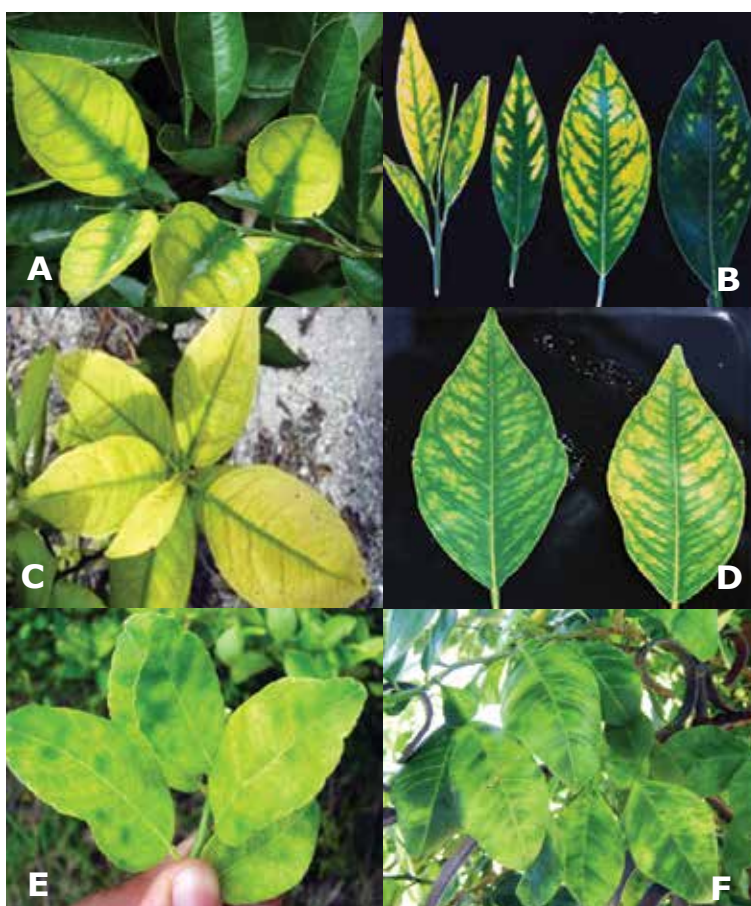


Figura 2. Deficiencias nutricionales: **A:** magnesio; **B:** zinc; **C:** hierro; **D:** manganeso; **E y F:** síntomas de HLB.

III. TECNOLOGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS SANAS

3.1. EL SISTEMA DE PLANTAS SANAS

Los agentes patógenos (virus y enfermedades infecciosas) son difíciles de transmitir a través de plantas producidas por semilla sexual. La producción de una planta enferma proveniente de semilla es muy baja, sin embargo la calidad es pobre y la vida económica de la plantación es corta.

En todo el mundo, el daño más grave es provocado por huanglongbing (HLB). Sin embargo, la tristeza, la exocortis y *phytophthora* son también enfermedades importantes.

Enfermedades como el huanglongbing, la tristeza y la leprosis pueden ser transmitidas por insectos vectores, lo que hace fácil su dispersión, y estas enfermedades constituyen una de las principales limitantes para el desarrollo del cultivo.

El plan de producción de plantas sanas de cítricos, según la tecnología de Taiwán sigue los siguientes pasos:

- Selección de la plantas madres;
- Limpieza del material de propagación;
- Diagnóstico de patógenos reglamentados;
- Confirmación de caracteres de cultivos seleccionados;
- Producción de yemas en bloque de fundación (nivel 1);
- Producción de yemas en bloque multiplicador (nivel 2);
- Producción de plantas en bloques comerciales (nivel 3).

NIVELES DE PRODUCCIÓN DE PLANTA SANA DE CÍTRICOS



El sistema de producción de plantas sanas de cítricos, además de ser una herramienta para luchar contra los agentes patógenos puede ser efectivo para reducir la posibilidad de mutación de yemas de cítricos. La reproducción asexual a largo plazo, de árboles madre seleccionados con las características de la variedad, puede disminuir o reducir las variaciones genotípicas y fenotípicas. Por lo cual se debe hacer una excelente selección de árboles madre para la población original de la especie, preservar los brotes generados, eliminar el agente patógeno, establecer un sistema de pruebas de verificación (indexación), realizar pruebas de indexación y certificar la sanidad de las plántulas.

El sistema se desarrolla mediante el establecimiento de tres bloques: de fundación (primer nivel) de las variedades comerciales o de interés nacional; el vivero de multiplicación de yemas (segundo nivel); y el vivero comercial (tercer nivel). La producción de plantas de cítricos en cualquiera de estos niveles deberá ser bajo ambientes protegidos, denominados invernaderos (nivel 1 y 2) o casa malla (nivel 3).

En el bloque de fundación se deben establecer de 10-20 árboles como mínimo de cada variedad como seguridad. El manejo de los árboles de primer y segundo nivel deberá ser manejado por OIRSA y/o el Ministerio de Agricultura de cada país. El vivero para la producción de plantas sanas comerciales de tercer nivel podrá ser manejado por productores privados.

Para iniciar el establecimiento del sistema de producción de yemas sanas se parte de identificar y seleccionar árboles madre sanos. Para la



Figura 3. Casa malla de plantas comerciales cítricas (nivel 3) del sector privado en Honduras.



Figura 4. Invernadero de multiplicación de yemas de cítricos (nivel 2) del Proyecto HLB-OIRSA-ICDF en Honduras.

obtención de plantas sanas de cítricos se combinan la tecnología del micro-injerto y la termoterapia.

Se utiliza la técnica de PCR como la principal prueba de diagnóstico para la detección del patógeno causante del huanglongbing. Además, esta técnica sirve para el diagnóstico de los virus de la tristeza, la exocortis y la enfermedad de la hoja rota (*tatter-leaf*).

El manejo de árboles de primer y segundo nivel para la producción de yemas sanas, requiere de protección contra insectos, por lo que se necesita producir en invernaderos bajo condiciones controladas.

En las instalaciones (invernaderos) debe construirse un cuarto oscuro (preferible en forma de “L”) en la única entrada para evitar la invasión de insectos, que son más frecuentes encontrarlos en estas instalaciones que en un huerto a cielo abierto, debido a la ausencia de controladores biológicos naturales. Las condiciones ambientales de las instalaciones (altas temperaturas y alta humedad del aire) son importantes, ya que pueden favorecer el desarrollo de ciertas enfermedades fungosas.

Para un manejo eficiente del sistema de producción de plantas sanas se requiere que el personal en general se familiarice con la tecnología descrita en el presente protocolo. Generalmente, el nivel técnico requerido no es muy alto, pero la experiencia y la estabilidad del personal es muy importante; porque el sistema, una vez establecido, deberá entrar en producción comercial tan pronto como sea posible para demostrar la eficacia, ya que

todo el proceso de establecimiento, tomaría de varios meses a un año, por lo tanto, el personal técnico debe estar bien entrenado.

3.2. PROCEDENCIA DEL MATERIAL SANO

La obtención de material sano se refiere a la planta madre y las plantas productoras de yemas. Todas las plantas productoras de yemas requieren una protección anti-plagas; sin embargo, la planta madre tiene mayores requisitos de manejo.

El proceso de instalación de los tres niveles para la producción de plantas sanas es largo. Puede durar más de 5 años.

Pasos para el establecimiento del sistema de producción de plantas sanas bajo el esquema de tres niveles:

- 1) Elegir la yema de buenas variedades con características genotípicas y fenotípicas deseadas, hacer micro-injerto (STG) y termoterapia. Esperar de uno a dos años hasta que se desarrollen las nuevas yemas.
- 2) Obtener yemas de primer nivel, para injertar en un buen patrón. Esperar de uno a dos años, hasta que crezcan nuevas yemas.
- 3) Del nivel 1 se producen las yemas para el nivel 2, del nivel 2 se producen las yemas para el nivel 3. Se podrían tomar yemas del nivel 1 para

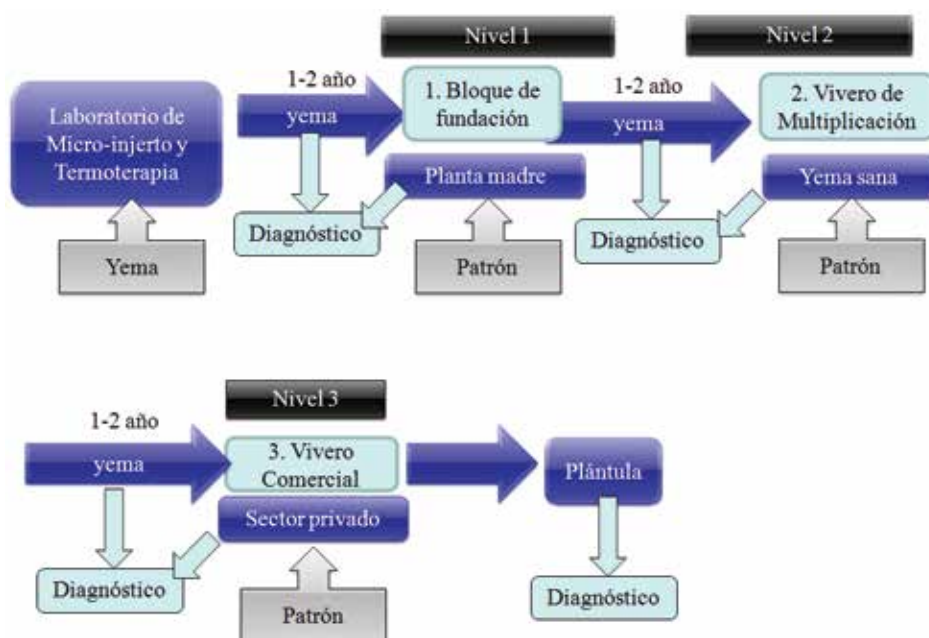


Figura 5. Sistema de producción de plantas sanas basado en la experiencia de la República de China (Taiwán). En Centroamérica los tiempos pueden variar.

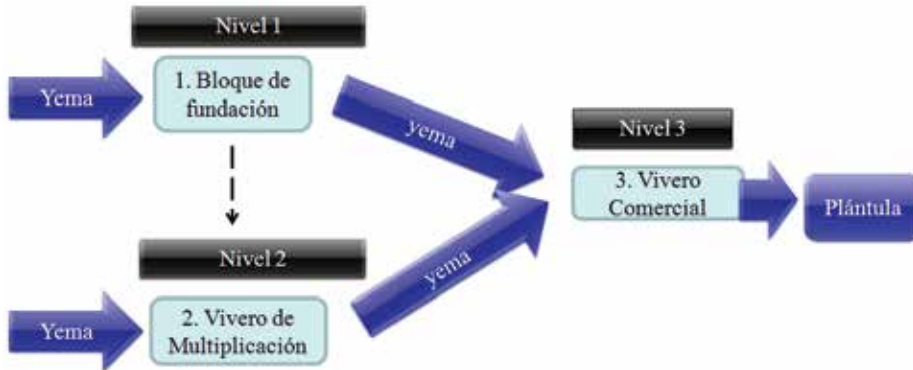


Figura 6. Esquema de producción de yemas y sus posibles destinos.

el nivel 3, pero no se permite producir yemas para el mismo nivel. Considerando la situación actual de América Latina, la enfermedad HLB se ha convertido en un problema muy serio y no se debe esperar más. Se puede instalar el primer y segundo nivel al mismo tiempo, y obtener las yemas de los dos niveles para el nivel 3. Para tener plantas sanas lo más rápido posible. Este método se debe aplicar solo como una medida de emergencia. Posteriormente, debe establecerse la producción de plantas siguiendo la secuencia de los niveles 1 - 2 y 3.

- 4) Realizar diagnósticos de enfermedades reglamentadas entre cada nivel. Para producir plantas sanas hay que realizar pruebas de diagnóstico de los patógenos de al menos ocho enfermedades: huanglongbing (HLB), tristeza de los cítricos (CTV), psorosis (CPSV), cachexia-xyloporosis (CCAV-XYV), hoja rota (*tatter-leaf*, CTLV), *citrus leprosis* (CiLV), clorosis variegada de los cítricos (CVC) y exocortis (CEVd). Para la cantidad de la muestra y los métodos de prueba, véase el *Protocolo de diagnóstico de huanglongbing en hojas de cítricos* del proyecto HLB-OIRSA-ICDF.

3.3. LIMPIEZA DEL MATERIAL CON LA METODOLOGÍA DEL *SHOOT-TIP MICROGRAFTING* (STG)

El método STG es seguro para obtener una muestra sana (libre de patógenos) proveniente de una planta infectada. El brote o meristemo de las plantas infectadas está generalmente libre de virus y bacterias. Las plantas regeneradas a partir de brotes de meristemas suelen estar libres de patógenos del HLB. El método original de STG (Murashige *et al.*, 1972) se ha mejorado al cambiar el corte tipo T por el corte en triángulos y hoyos (Su y Chu, 1984).

El procedimiento completo de STG debe llevarse a cabo en una cámara de flujo laminar, sobre una superficie limpia y en condiciones estériles.

3.3.1. Preparación de las plántulas para injertar

Los patrones más utilizados para la técnica del STG son Troyer y Carrizo. Sin embargo, también se pueden utilizar otras especies de cítricos como pomelo, limón y naranja dulce.

- 1) Las semillas son extraídas de los frutos frescos justo antes de que se establezca el semillero *in vitro*.
- 2) La testa (cáscara) de las semillas debe ser removida.
- 3) Las semillas desnudas deben ser esterilizadas por 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1%.
- 4) Las semillas esterilizadas deben ser lavadas tres veces con agua esterilizada y deben ser puestas en un medio sólido en tubos de ensayo.
- 5) Las plántulas enraizadas serán cultivadas en el medio, dentro de una incubadora a 28°C entre dos a cuatro semanas sin luz. Las plántulas están listas para ser usadas en el STG.



Figura 7. Plántulas de patrones de cítricos cultivadas sin luz.

3.3.2. Preparación de los brotes de cítricos

- 1) Los brotes jóvenes son recolectados en huertos con árboles infectados. Las plantas de cítricos cultivadas en invernaderos son forzadas a brotar con defoliadores o con podas. Los brotes jóvenes de tamaño adecuado (0.5 a 3 cm) son como el retoño recolectado para el STG.
- 2) Los brotes son guardados en bolsas plásticas para mantenerlas limpias y húmedas.



Figura 8. Selección y recolección de brotes jóvenes de cítricos para STG.

3.3.3. Microinjerto de los brotes apicales

- 1) Las hojas jóvenes de los brotes deben ser retiradas y recortar el brote a menos de 0.5 cm.
- 2) Los brotes recortados deben ser esterilizados por 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%.
- 3) Un cuchillo afilado debe ser usado para la preparación del STG.
- 4) Los brotes esterilizados se lavan tres veces con agua esterilizada y son transferidos a platos petri con papel filtro.
- 5) Para el STG se puede usar los brotes terminales y axilares. El meristemo apical con dos o tres primordios foliares (0.1 mm – 0.2 mm de largo desde el fin del corte hasta el tope de primordio foliar más largo) se corta bajo un iluminador con la ayuda de un estereomicroscopio.
- 6) Portainjertos de dos a tres semanas son adecuados para el STG. Un corte de forma rectangular (0.3-0.5 mm) debe realizarse en un costado del rizoma a unos 2-3 mm de la parte superior. La punta del brote se coloca en el corte y se cubre con tejido que se extrae de los brotes



Figura 9. Corte de triángulo; la punta del brote se coloca en la plántula del patrón.

recolectados. El método recomendado para hacer STG es realizar un corte en forma triangular en la parte superior del portainjerto y se coloca la sección de la punta del brote en su interior.

- 7) Las plántulas microinjertadas son transferidas sobre una plataforma de papel filtro en el tubo de ensayo que contiene el medio líquido. Los tubos de ensayo de cultivo se mantienen en una incubadora oscura durante el día.
- 8) Los tubos de ensayo se mueven a una cámara de crecimiento a 26° C con una sombra creada por una gasa de una sola capa y se exponen a una iluminación de 400 lux durante 16 horas diarias.
- 9) La gasa para la sombra se retira después de dos semanas de incubación. Después de un mes, en el brote crecen dos o tres hojas que se desarrollan desde el vástago.

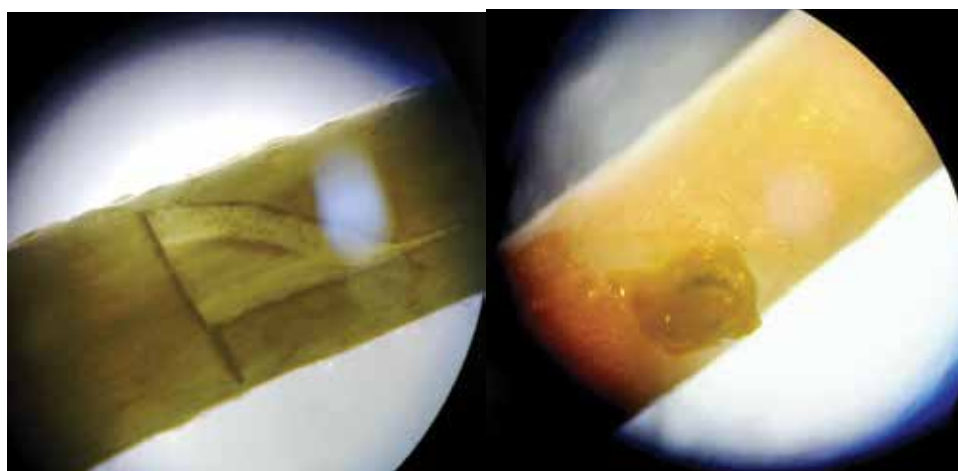


Figura 10. Izq.: preparación y corte de punta del brote; Der.: *shoot-tip* insertado en el corte.



Figura 11. Colocación de planta STG en tubos de ensayo para su desarrollo.

3.4.

CONDICIONES Y REQUERIMIENTOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE INVERNADEROS PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS SANAS

3.4.1. *Condiciones relacionadas con el clima*

El rango de temperatura óptima para producir los cítricos es de 25~30° C. Normalmente en zonas secas hay más plagas insectiles y en zonas húmedas hay más enfermedades como bacterias y hongos. Una finca tiene que tener una buena fuente de agua, tanto en calidad como en cantidad.

En zonas con incidencia de huracanes los invernaderos no se pueden cubrir con plástico, tampoco se tiene que usar la malla con densidad mayor de 40 mesh, ya que esto eleva la temperatura interna a causa de la mala ventilación. Si la temperatura sube hay que instalar equipos como malla de sombra, pared con agua, ventilador y/o pulverizador para bajar la temperatura, o aumentar la altura del invernadero. Pero un invernadero alto con plástico y/o malla de alta densidad afectará la estabilidad de la estructura si hay viento fuerte, éstos causan daños y aumentan el costo de administración.

3.4.2. *Condiciones de aislamiento*

Debe existir cierta distancia entre el bloque de fundación y el bloque de multiplicación de yemas con las fincas comerciales de cítricos, sobre todo el primero para que no sea contagiado por insectos vectores HLB y la triste-

za de los cítricos principalmente. Contando con instalaciones anti-plagas y un buen manejo bastaría con 5 kilómetros para conseguir el aislamiento. Se sugiere usar agua corriente o de pozo libre de *Phytophthora* spp. como agua de riego y proveer un buen drenaje si las plantas se cultivan directamente en el suelo.

La distancia entre el bloque de fundación y la finca de cítricos más próxima debe ser de 5 kilómetros o más. La densidad de la malla para los invernaderos debe de ser de 40 mesh o más. Es necesario rodear el invernadero con una canaleta para agua que sirva para evitar la entrada de hormigas y otros insectos que puede difundir ciertos patógenos.

Al instalar la malla metálica se debe sujetar con platinas. Se evita perforar las vigas y columnas galvanizadas para no destruir su efecto antioxidante.

3.4.3. Condiciones de bioseguridad

- 1) La entrada contará con un cuarto oscuro que tiene dos puertas en forma de “L” y las dos no se pueden abrir al mismo tiempo, si hay necesidad de aumentar la bioseguridad en este espacio instalar una lámpara de trampa (trampa de luz para matar insectos).



Figura 12. Cuarto oscuro de entrada para invernaderos con trampa de luz uv para insectos

- 2) En la entrada instalar un pediluvio (depósito de desinfección de calzado) y un lavamanos.
- 3) Revisar semanalmente el vivero para ver si hay grietas o daños.
- 4) Ejecutar revisiones después de cada catástrofe natural y realizar las reparaciones requeridas.



Figura 13. Uso de grava como cobertura del suelo dentro del invernadero y las macetas sobre bloques.

- 5) Usar insecticidas cuando sea necesario.
- 6) Para prevenir salpicaduras de gotas de agua a las plantas, el suelo deberá estar cubierto con grava o una cobertura vegetal adecuada, o bien se debe levantar el nivel de las macetas con mesas de cemento o bloques.
- 7) Toda persona que ingresa al invernadero debe sumergir los zapatos o limpiarse la suela del calzado pasando por el pediluvio y luego colocarse una funda plástica.

3.5. SELECCIÓN DE PATRONES

El limón, la naranja ácida, la mandarina, la trifolieta y su híbrido son las principales especies de patrones de cítricos, sobre todo los dos últimos se han convertido en la corriente principal. En cuanto a las yemas, hay que pensar tanto en el rendimiento económico y en su adaptación al clima.

Existe una gran diferencia de susceptibilidad en los patrones de cítricos. Generalmente, las fincas normales escogen patrones dependiendo de su tolerancia a las enfermedades, adaptabilidad al tipo de suelo y clima, tecnología de cultivo, etc. La resistencia conlleva la característica estable y hereditaria.

Una adecuada selección de patrones (con resistencia a enfermedades de suelo, virus y bacterias, cuando sea posible) ayudará a diferenciar el tipo de diagnóstico a realizar, ya que sólo se hacen las pruebas diagnósticas para las enfermedades a las cuales no se tiene resistencia.

Todos los patrones tienen sus ventajas y desventajas, por ejemplo: *Swingle* tiene resistencia contra los nemátodos de los cítricos, la tristeza y otras enfermedades, pero es vulnerable frente a CEV (exocortis) y CTLV (hoja rota, *tetter-leaf*). Debido a la incompatibilidad no es recomendable usar citrumelo, citrange y trifoliato como patrón para limón. Debido a los factores de tierra, *Swingle* no es una buena opción en Belice. En general, *Rangpur lime* y *Sour orange* son dos tipos que tienen más amplia adaptabilidad tanto en la producción de brotes sanos como en la producción comercial de cítricos.

3.6. PRODUCCIÓN DE PATRONES DE CÍTRICOS

Para preparar los patrones, hay que sembrar el doble de semillas de las que se necesitan para poder seleccionar después, considerando que la viabilidad y porcentaje (%) de germinación se encuentren bajas.

Cantidad de semillas que se encuentran en un (1) kilo de cada variedad de patrones:

- Sour Orange 3,600
- Troyer 2,700
- Swingle 3,200
- Rangpur lime 9,500
- Flying Dragon 4,500

Las semillas tienen que ser recolectadas de fruta madura y que todavía no se han caído al suelo, se deben sumergir en agua de tres a cinco días y cambiar el agua cada día, luego secarlas en la sombra por unos días y aplicar un fungicida antes de sembrarlas. El sustrato puede ser de turba: perlita: vermiculita en proporción de 3:1:1 (v/v) respectivamente, y su pH tiene que ser estable entre 5.5 a 6.5, en la práctica se puede utilizar un sustrato de acuerdo con la experiencia y los materiales locales. Aplicar los abonos líquidos, fungicidas, y pesticidas regularmente dependiendo de la situación local.

Cuadro 1. Susceptibilidad de los patrones de los principales cítricos a enfermedades

| Rootstock | <i>Phytophthora</i> spp. | Nemátodo de los cítricos | Nemátodo Burrowing | Tristeza | Xyloporosis | Exocortis | Tetter-leaf |
|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------|-------------|-----------|-------------|
| Variedad de limón | | | | | | | |
| Rough lemon | X | X | X | ○ | △ | ○ | ○ |
| Milam | X | X | ○ | ○ | △ | ○ | |
| Volkameriana | X | X | X | ○ | △ | ○ | |
| Macrophylla | ○ | X | X | X | X | ○ | |
| Rangpur lime | X | X | X | ○ | X | X | ○ |
| Palestine sweet lime | X | X | X | ○ | X | ○ | ○ |
| Variedad de naranja agria | | | | | | | |
| Sour orange | △ | X | X | X | △ | ○ | ○ |
| Taiwanaica | △ | ? | X | △ | ? | ○ | |
| Variedad de naranja dulce | | | | | | | |
| Sweet orange | X | X | X | △ | △ | ○ | ○ |
| Ridge Pineapple | X | X | ○ | △ | △ | ○ | |
| Trifoliolate y sus híbridos | | | | | | | |
| Trifoliolate | ○ | ○ | X | ○ | △ | X | X |
| Carrizo | △ | △ | △ | ○ | △ | X | X |
| Troyer | ○ | ○ | X | ○ | △ | X | X |
| Rusk | △ | ? | X | ○ | △ | X | X |
| Swingle Citrumelo | △ | △ | X | ○ | △ | X | X |
| Mandarina | | | | | | | |
| Sunki | X | X | X | ○ | ? | ○ | ○ |
| Cleopatra | △ | X | X | ○ | △ | ○ | ○ |

○= (resistente); X= (susceptible); △= (tolerante).

Modificado de Broombsen, 1984; Castle, 1987; Newcomb, 1978; Castle & Gmitter, 1999.

Cuadro 2. Influencias causadas por patrones de cítricos en la adaptabilidad ambiental y la productividad de las plantas.

| Patrón | Adaptabilidad a suelo y clima | | | | | Efecto de la raíz en el árbol | | | |
|------------------------------------|-------------------------------|--------|--------------------|-----------|----------------|-------------------------------|------------------|-----------------|----------------------|
| | Inundación | Sequía | Bajas temperaturas | Salinidad | Calcio elevado | Rendimiento | Calidad de fruta | Tamaño de Fruta | Vigor de Crecimiento |
| Variedad de limón | | | | | | | | | |
| Rough lemon | B | B | P | I | A | A | L | LG | A |
| Milam | B | B | P | ? | ? | A | L | LG | A |
| Volkameriana | B | B | P | ? | A | A | L | LG | A |
| Macrophylla | B | B | P | B | A | A | L | LG | A |
| Rangpur lime | ? | B | P | B | A | A | L | LG | A |
| Palestine sweet lime | B | B | P | P | I | A | L | LG | A |
| Variedades de naranja agria | | | | | | | | | |
| Sour orange | I | I | B | I | A | I | A | I | I |
| Taiwanica | ? | ? | ? | I | A | ? | ? | I | A |
| Variedades de naranja dulce | | | | | | | | | |
| Sweet orange | P | P | I | I | L | I | I | I | I |
| Ridge Pineapple | P | P | I | I | L | I | I | I | I |
| Trifoliolate y sus híbridos | | | | | | | | | |
| Trifoliolate | I | P | B | P | L | I-L | A | SM | L |
| Carrizo | P | B | I | P | L | ? | I | I | A |
| Troyer | B | I | B | I | ? | I | A | I | I |
| Rusk | ? | P | I | P | L | ? | ? | I | L |
| Swingle Citrumelo | ? | B | I | P | L | A | I | I | A |
| Mandarina | | | | | | | | | |
| Cleopatra | P | I | B | B | I | LI | A | SM | A |

B = Bueno; **I** = Intermedio; **A** = Alto; **L** = Bajo; **LG** = Largo; **P** = Pobre; **SM** = Pequeño; **?** = Incierto.
Fuente: Modificado de Broembsen, 1984; Castle, 1987; Newcomb, 1978; Castle & Gmitter, 1999.

Cuadro 3. Compatibilidad entre yemas de cítricos y los patrones.

| Rootstock Rizoma | Kumquat | Navel | Valencia | Grapefruit | Mandarina | Limón Lisbon | Limón Eureka |
|---------------------|---------|-------|----------|------------|-----------|-----------------|-----------------|
| Rough lemon | — | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × |
| Cleopatra | — | ○ | ○ | ○ | ○ | × | × |
| Rangpur lime | — | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Taiwanica | — | △ | ○ | ○ | △ | — | — |
| Naranja agria | × | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × |
| Naranja dulce | — | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Macrophylla | — | — | ○ | ○ | — | × | × |
| Volkameriana | — | △ | ○ | ○ | △ | ○ | ○ |
| Trifoliata | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × |
| Carrizo | — | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × |
| Troyer | — | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | × |
| Swingle | — | ○ | ○ | ○ | △ | ○ | × |

○ = compatible; × = incompatible; △ = incierto, debido a observaciones con menos de 10 años; — = sin información.

Fuente: Modificado de Ferguson *et al.*, 1990.

Cuadro 4. Comparación de influencias, causadas por diferentes patrones, en la calidad y productividad de cítricos.

| Rizoma | Calidad de fruta | | | Producción por planta | | |
|-------------------|------------------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|
| | Murcott | Ponkan | Tankan | Murcott | Ponkan | Tankan |
| Rough lemon | 3 | 1 | 1 | 3 | 3 | 2 |
| Rangpur lime | 1-2 | 1-2 | - | 3 | - | 2 |
| Sunki | 2-3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2-3 |
| Sour orange | 3 | - | 3 | 1 | 2 | - |
| Swingle citrumelo | 2-3 | 3 | 2-3 | 2-3 | 2 | 3 |
| Troyer | 3 | 3 | 2-3 | 2 | 3 | 3 |
| Trifoliata | 2-3 | - | - | 3 | - | - |
| Cleopatra | - | 2 | 1-2 | - | 3 | 3 |
| Pomelo | 2 | - | 2-3 | 2 | 1 | 1 |

*1= Nivel Bajo; 2= Nivel Intermedio; 3= nivel alto; (-) = Sin datos.

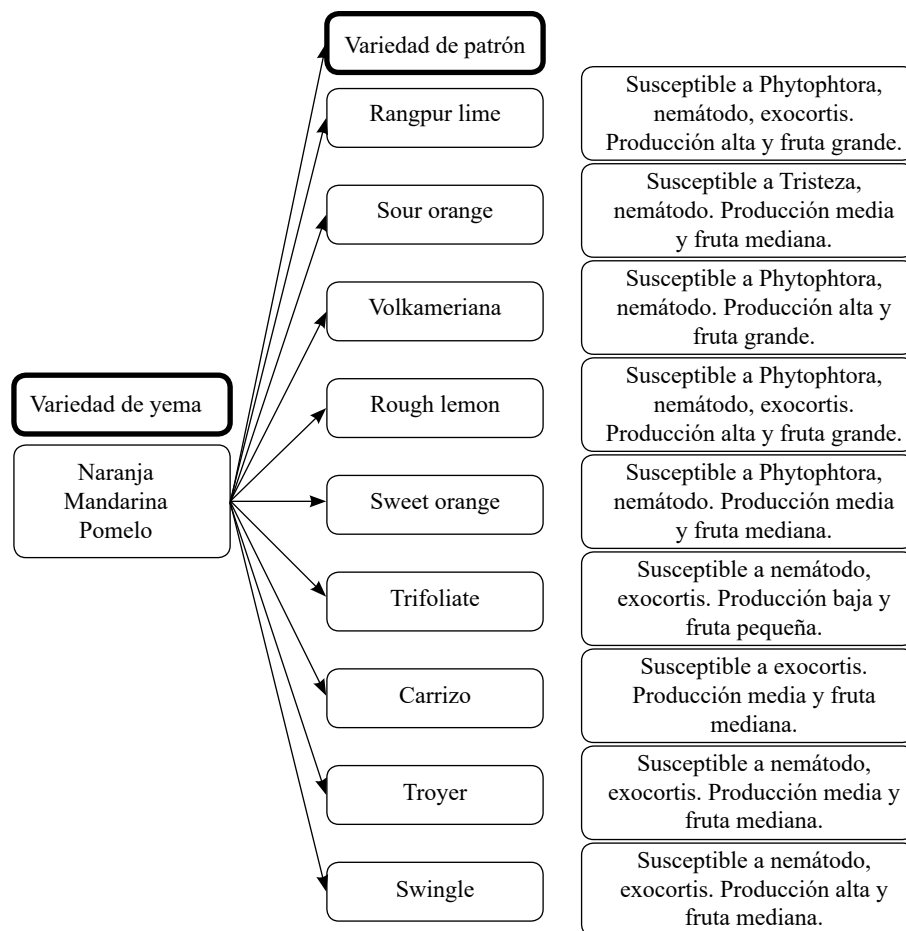


Figura 14. Esquema de compatibilidad de yemas de naranja, mandarina y pomelo en diferentes patrones.

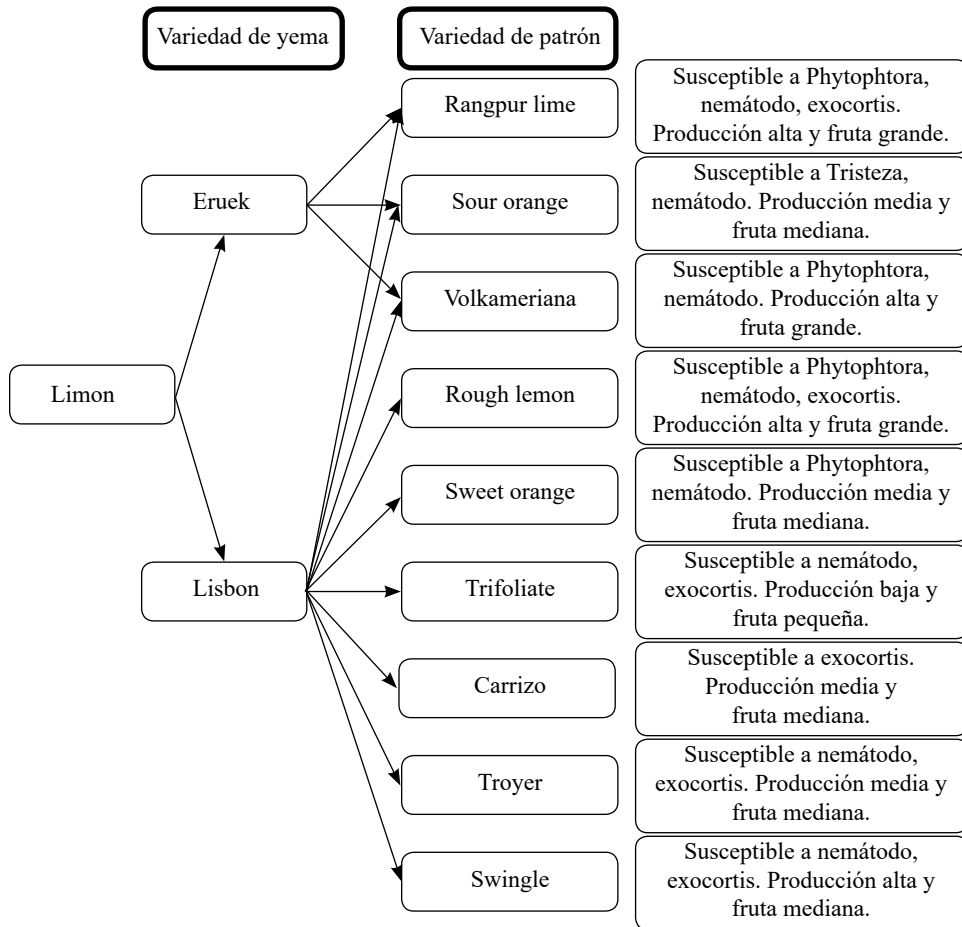


Figura 15. Esquema de compatibilidad de dos variedades de yemas de limón con diferentes patrones.

Es necesario desinfectar con calor los sustratos o la tierra que se use para sembrar. Ver Apéndice 3 para conocer más detalles.



Figura 16. Esquema para producción de plantas sanas de cítricos.



Figura 17a. Para evitar que las raíces se enreden, se recomienda que el tamaño de macetas para los brotes maduros sea con capacidad de 2.5 a 3.0 L y mida 30 cm.



Figura 17b. Evitar la selección de patrones germinados con malformaciones del tallo.

3.7. PROCEDIMIENTO DE INJERTACIÓN

Para obtener las yemas hay que elegir las varetas (rama madura pero que esté verde y que no ha sido lignificada). De la misma se seleccionan las yemas a utilizar, el diámetro de las yemas debe ser aproximadamente de 2 a 4 mm. Si no se van a usar inmediatamente, se pueden conservar en la refrigeradora en una bolsa plástica con zíper y cubierta con papel periódico mojado, así durarán hasta dos semanas.



Figura 18. Varetas de cítricos.

Para hacer el injerto hay que preparar el patrón cortando todas las ramas y hojas, dejando sólo el tronco. Se realiza el corte en la parte superior del tronco y se coloca por aproximación la yema seleccionada, luego cubrir con parafina como protección. Cuando la yema crece hasta 70 cm, se debe podar dejándola a 45 cm, para que se produzca una mayor ramificación.



Figura 19. Izk.: corte de yema de cítrico; Der.: injerto de yema en tronco de patrón.

Un brote injertado puede permanecer en un recipiente pequeño durante 2 a 3 años. En Centroamérica los brotes injertados pueden salir a la venta en 3 meses.



Figura 20. Planta de cítrico injertada exitosamente.

3.7.1. Procedimientos para la producción de yemas

La poda puede estimular el crecimiento, un brote cortado puede hacer crecer cuatro o cinco brotes tiernos más. La poda suave forma parte de la poda frecuente; se recurre a la poda fuerte cada cuatro o cinco años.

A la hora de la poda, si es necesario cortar toda la rama, se debe cortar en donde está la otra ramificación y mantener su superficie plana. El primer o segundo brote de la rama son ciegos que no logran crecer, es necesario dejar más de 3 a 4 brotes y dejarlos crecer.

Para acelerar la proliferación de brotes, cuando la rama esté lista para sacar la vareta, se recolectan las yemas lo más temprano posible antes que se lignifique, dejando de 3 a 4 yemas en la rama en donde se cortó la vareta para su posterior crecimiento. Si se seca la rama, hay que podar justo arriba del nudo activo más cercano.

Se debe tomar en cuenta que, en maceta, la naranja y la mandarina pueden producir aproximadamente 10 yemas el primer año, para el segundo año se obtiene una producción entre 50 y 100 yemas/año/árbol, y después del tercer año en adelante la producción de yemas será entre 100 y 150



Figura 21. Plantas multiplicadoras de yema con sistemas de producción en maceta.



Figura 22. Plantas multiplicadoras de yema con sistemas de producción en siembra directa en el suelo.

yemas/año/árbol; aunque se ha observado en los países del OIRSA –dependiendo del clima, variedad, distancia entre macetas y otras condiciones– entre 250 y 300 yemas/año/árbol. Sin embargo, los pomelos y las toronjas producen menos que otras variedades y su máximo de producción es de 20 a 50 yemas/año/árbol. Otra forma de producir yema es sembrando directamente en el suelo las plantas multiplicadoras (siempre bajo ambiente protegido) y a distancias de entre 3X3, 4x4 y 4x5, dependiendo de la va-

riedad y factores abióticos; así, la cosecha de yemas en el tercer año puede alcanzar más de 2,500 yemas/año/árbol.

La cosecha de las yemas se realiza de dos a tres veces por año. Sólo se cosecha uno o dos años cada rama y las yemas cosechadas deben ser ramas de color verde oscuro y no se deben doblar fácilmente con los dedos. Además, hay que realizar un poda de formación mínima, que mantenga el crecimiento lento de la planta y de esta manera no se den mutaciones. En Taiwán las plantas en maceta siguen siendo cosechadas después de 35 años sin problemas. Una planta alcanza su máximo de producción entre los 3 y los 5 años, y por su valor a esa edad sería una pérdida muy grande botarla.

IV. BUENAS PRÁCTICAS DE MANEJO DE INVERNADEROS DE CÍTRICOS

4.1. BUENAS PRÁCTICAS DE BIOSEGURIDAD

- 1) Las herramientas que se usan dentro de los invernaderos, tienen que ser desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1% cada vez que se realicen cortes (poda o injertos) a las plantas, al finalizar la jornada diaria se deben lavar con agua y engrasarlas para prevenir la oxidación.
- 2) Limpiar la malla del invernadero regularmente o cuando se observe algún tipo de obstrucción. Con una bomba de agua de baja presión se asperja la malla de adentro hacia afuera. La bomba de alta presión y cepillo duro pueden dañar la malla.
- 3) Asperjar el camino y el suelo con sulfato de cobre para eliminar bacterias y algas.
- 4) Revisar semanalmente el vivero para ver si hay grietas o daños; ejecutar revisiones después de cada catástrofe natural. Reparar inmediatamente lo que haga falta. Usar insecticidas en caso necesario.
- 5) El personal de trabajo (jornaleros) de los invernaderos debe cambiarse los zapatos antes de entrar en el vivero; los visitantes, igualmente; también pueden limpiar las suelas del calzado en el pediluvio y colocarse una cubierta plástica.
- 6) Evitar entrar en el vivero si en el mismo día han trabajado en una finca de cítricos.
- 7) Usar el agua corriente o el de pozo libre de *Phytophthora* spp. como agua de riego.
- 8) Picar las ramas desechadas, llevarlas afuera del invernadero y destruirlas con fuego o enterrarlas.

4.2. USO DE ABONOS Y SUSTRATOS

- 1) Usar el abono (nitrógeno, fósforo y potasio) con la proporción de 1:1:1.
- 2) Para reutilizar el sustrato se debe realizar una desinfección como está descrita en el Apéndice 3.

Debido a que la presencia de ácaros y otros insectos pequeños es inevitable, será imprescindible su control. El uso de plaguicidas químicos puede llegar a crear resistencia en los insectos; por lo que se recomienda el uso de plaguicidas orgánicos u otros métodos que puedan ayudar a minimizar el uso de los plaguicidas químicos.

4.4. NORMATIVA REGIONAL

Para asegurar la condición fitosanitaria cítrica de la región del OIRSA, los países que la conforman han adoptado regulaciones para la importación, producción, comercialización y movilización de material propagativo; estableciendo para tal fin requisitos y procedimientos fitosanitarios que eviten la introducción de plagas cuarentenarias y la diseminación de plagas de importancia económica del cultivo, con el acompañamiento técnico del OIRSA.

Cada unidad de producción certificada por la autoridad competente debe designar a un responsable capacitado en la materia quien tendrá, las siguientes obligaciones:

- 1) Llevar los registros de las actividades técnicas (desinfección de suelos, toma de muestras, resultados de laboratorio, control de plagas, podas, injertación, extracción de yemas y cosecha de semillas, almacenaje de material propagativo, cambio de mallas o polietilenos).
- 2) Llevar registros de la comercialización del material propagativo (fecha de salida, cantidad de plantas, nombre y dirección del comprador, destino de las plantas, códigos, especie, variedad y edad de la planta).
- 3) Llevar registros de la fenología de las plantas.
- 4) Informar periódicamente a la autoridad competente cualquier modificación o cambio producido en la unidad de producción con la debida anticipación.
- 5) Asegurar el buen manejo agronómico de las plantas.
- 6) Revisar periódicamente las condiciones físicas de las unidades de producción certificada.
- 7) Informar o denunciar a la autoridad competente sobre detección de patógenos o plagas cuarentenarias.
- 8) Cada unidad debe tener las condiciones generales de aislamiento y bioseguridad establecida en este protocolo de producción de planta sana.
- 9) Otras obligaciones necesarias que deberán ser notificadas a la autoridad competente.

FRECUENCIA DE ANÁLISIS DE LAS ENFERMEDADES PARA LA CERTIFICACIÓN

| Patógeno | Frecuencia de análisis | | | | | Viveros (Nivel 3) |
|---------------------------------|---|--|--|--|--|---|
| | Banco de germoplasma (Nivel 0) | Bloque o lote fundación (Nivel 1) | Bloque o lote multiplicador (Nivel 2) | Bloque productor de semilla | | |
| Huanglongbing (HLB) | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Se muestra 10% del lote-por especie para la venta |
| Exocortis (CEVd) | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | | | Se muestra 10% del lote-por especie para la venta |
| Psorosis (CPSV) | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Se muestra 10% del lote-por especie para la venta |
| Cachexia-xyloporosis (CCaV-XYV) | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | Una vez cada tres años, 100% de las plantas. | | Se muestra 10% del lote-por especie para la venta |
| Citrus leprosis (CILV) | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | | Se muestra 10% del lote-por especie para la venta |
| Tristeza (VTC) | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Una vez cada año, 100% de las plantas | Se muestra 10% del lote-por especie para la venta |
| Clorosis variegada/cancro | Monitoreo anual, supervisión de síntomas visuales y diagnóstico en laboratorio cuando se trate de síntomas parecidos. | | | | | |

Como parte de la certificación por parte de la autoridad competente, se presentan los diferentes patógenos que en la región del OIRSA se encuentran regulados y bajo diagnósticos frecuentes y constantes para asegurar que las plantas que se producen son sanas y libres de patógenos.

4.5. CONTROL DE PLAGAS

Es mucho más complicado el control de plagas insectiles o artrópodos dentro de un invernadero, debido a que no encuentran sus depredadores o parasitoides (enemigos naturales) dentro del mismo. Refiriéndose principalmente a ácaros, hormigas y áfidos, entre otros. Por lo tanto hay que revisar frecuentemente las plantas y realizar las medidas correctivas del caso, principalmente con la aplicación de un plaguicida. A continuación se mencionan algunas plagas y los plaguicidas que se recomiendan para su control.

4.5.1. *Nemátodos*



Figura 24. El nemátodo *Tylenchulus semipenetrans* es considerado el más común entre los cítricos.

Plaguicidas recomendados: Fenamifos, Carbosulfan, DCIP, Terbufos.

Observación: Cuando se encuentren en crecimiento brotes jóvenes o nuevos, lo recomendable es la aplicación del plaguicida dirigida al suelo.

4.5.2. *Cochinillas de cítricos*

Pesticidas recomendados: Isoxathion y Diametoato.

Observación: aplicar una sola vez cuando se detecten.



Figura 25. Las cochinillas *Icerya purchasi* y *Pseudococcus* sp. son consideradas de mucha importancia en plántulas de cítricos.

4.5.3. Trips de los cítricos



Figura 26. Los trips *Heliothrips haemorrhoidalis* y *Pezothrips kellyanus* comúnmente encontrados en cítricos.

Plaguicidas recomendados: Carbosulfan, Dimethoate, Carbofuran, Benfuracarb.

Observación: si ocurre en brote, aplicar 2 veces, cada 10 días.

4.5.4. Áfidos



Figura 27. Entre los áfidos o pulgones comunes en cítricos encontramos: *Toxoptera aurantii*, *Aphis spiraecola*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*.

Plaguicidas recomendados: Diametoato, Carbosulfan.

4.5.5. Minador de la hoja de cítrico



Figura 28. El minador *Phyllocnistis citrella* se encuentra entre los principales minadores de hoja de cítricos.

Pesticidas recomendados: Diametoato, Methomyl, Thiometon, Cartap, Fenoxycarb, Tiametoxam.

4.5.6. *Diaphorina citri*



Figura 29. El insecto vector del HLB es considerado la principal amenaza en la citricultura mundial.

Pesticidas recomendados: Diametoato, Carbosulfan, Imidacloprid, Formothion, Tiametoxam.

Observación: si ocurre en brote, aplicar 2 veces cada 10 días.

4.5.7. Ácaros



Figura 30. En cítricos, *Tetranychus urticae*, *Panonychus citri* y *Eutetranychus orientalis* son las mayores amenazas.

Plaguicidas recomendados: Abamectina, Spiromesifen, Fenpyroximate, Diametoato, Amitraz, Dicofol, Fenothiocarb, Etoxazole, Milbemectin, o aceite mineral.

Observación: Muy fácil para adquirir resistencia, es necesario tener varias alternativas de rotación tanto del ingrediente activo como de la familia química del producto.

4.5.8. *Mosca de la fruta*



Figura 31. Géneros de la familia *Tephritidae* (Diptera) son de relevancia en los sistemas de producción de planta sana.

Plaguicidas recomendados: Spinosad, Fenvalerate, Fenthion.

Observación: también es posible usar trampas *multilure* y Jackson con sus respectivos atrayentes.

4.5.9. *Phytophthora* spp.



Figura 32. *Phytophthora* spp. es uno de los hongos más importantes que ataca y se manifiesta en el cuello (base) del tallo de los cítricos.

Plaguicida recomendado: Sulfato de cobre.

4.5.10. Roña de los cítricos



Figura 33. La sarna o roña de los cítricos, conocida en inglés como *citrus scab*, es causada por el hongo *Elsinoe fawcetti*.

Pesticida recomendados: Azoxystrobin, Benomyl, thiophanate-methyl, Imibenconazole, Dithianon.

Observación: si ocurre cuando se encuentran brotes jóvenes, aplicar entre 4 a 5 veces, cada 10 días.

4.5.11. Mancha negra de los cítricos (*black spot, Melanose*)



Figura 34. Los síntomas en cítricos de *Black spot* son manchas "duras", moteado tipo melanosis; es decir manchas extendidas color castaño, moteado rojizo.

Plaguicidas recomendados: Mancozeb, benomyl, Dithianon.

Observaciones: antes de la época de lluvia es recomendable su aplicación con periodicidad mensual.

4.5.12. Canker

Plaguicidas recomendados: Bordeaux, Cuprous, Kasugamycin.

Observaciones: aplicar entre 4 a 5 veces, cada tres semanas.



Figura 35. Esta enfermedad, causada por la bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, se caracteriza por ocasionar defoliación severa, disminución en la producción y daño a la calidad de la fruta.

4.5.13. *Black rot*



Figura 36. Esta enfermedad fúngica se caracteriza por producir pudrición en la fruta.

Pesticidas recomendados: Mancozeb, Propineb, Benomyl, Dithianon.

Observaciones: una vez iniciada la lluvia, aplicar una vez y hacer otra aplicación una semana después.

4.6. DESINFECCIÓN DEL PERSONAL DE LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE CÍTRICOS

Las personas que laboran dentro de los invernaderos de nivel 1 y 2, o los visitantes deberán considerarse como vías de contaminación (ej. insectos u hongos). Por ende, son un riesgo para la producción de plantas sanas de cítricos y habrá que tomar las medidas de bioseguridad necesarias.

4.6.1. *Desinfección para el personal*

- 1) Lavar y desinfectar las manos con alcohol o jabón cuando ingresen al invernadero.
- 2) Uso obligatorio de botas.



Figura 37. Uso obligatorio de gel antibacterial para desinfección de manos a todo el personal que ingrese a invernaderos de producción de plantas sanas de cítricos.

4.6.2. Desinfección para entrar al invernadero

- 1) Instalar una cortina de aire para prevenir la entrada de insectos. Encenderla cuando entre y salga todo el personal de dichos invernaderos.
- 2) Instalar un pediluvio de desinfección en la puerta de ingreso, añadir 5% de cloro cada día. Sumergir el calzado cubriendo toda la suela del mismo.
- 3) Instalar una trampa de luz, y mantenerla encendida.



Figura 38. Invernadero nivel 1 del Proyecto HLB-OIR-SA-ICDF, con cortina de aire para evitar la entrada de insectos y pediluvio.

4.6.3. Para aplicación de agroquímicos

- 1) Uso obligatorio con equipo de protección, ej.: gorra, mascarilla, guantes, y demás.
- 2) Almacenar los plaguicidas en un lugar seguro, fresco y ventilado, sobre anaqueles o tarimas, debidamente identificado con sus respectivas fechas de vencimiento.

APÉNDICE 1. INFORMACIÓN BÁSICA DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS

A. HLB (*CITRUS HUANGLONGBING*, *CITRUS GREENING*)

1. Los síntomas

Síntomas en las hojas: los síntomas más comunes son el amarillamiento de venas y la caída de hojas. Al principio, sólo aparece en las hojas de una o dos ramas en cada árbol. Desde el segundo año, la enfermedad se agrava cuando las ramas y hojas cercanas empiezan a mostrar los síntomas con el moteado asimétrico en hojas. El síntoma se extiende desde ramas pequeñas a medianas y en 2 a 3 años, se expande a toda la planta causando un amarillamiento severo, la caída de hojas y favorece el apareamiento de otras plagas. Aparte del amarillamiento, las hojas se tuercen y endurecen, y se engruesa la nervadura central de las hojas. Es posible que los síntomas de HLB tiendan a confundirse con deficiencia de zinc, o sea el amarillamiento de venas y el encogimiento de hojas.

Síntomas en flores y frutos: se acelera la floración y las flores son pequeñas y en gran cantidad. Los frutos son pequeños, deformados y de color anormal. Las cáscaras son gruesas y los frutos no son jugosos y con bajo *brix*.

Síntomas de plantas: las plantas infestadas son enanas y débiles, crecen y multiplican lentamente, y en la situación más grave terminan muriendo. Si están infectadas por *Phytophthora* spp., la enfermedad se agravará.

2. Características de patogenicidad y modos de transmisión

Patogenicidad: una de las patogenicidades es la bacteria fastidiosa. Esta bacteria tiene requerimientos nutricionales complejos, por lo que no se puede cultivar en laboratorio. Son parásitos en las células de tamiz y tienen limitaciones del floema. Se multiplican rápidamente en verano, y lentamente en invierno, pero las podemos encontrar todo el año. Desde la observación de la microscopía electrónica, podemos descubrir que las maduras células bacterianas son generalmente de tipo barra, su tamaño es 350-550×600-1500 nm y que tienen dos adventicias y su espesor es aproximadamente 20 a 25nm. Los patógenos son polimórficos. Los gérmenes patógenos recién emergidos son más finos con un tamaño de 100-250×500-

2500 y los envejecidos son esféricos con diámetro de aproximadamente 700-800 nm y tiene citoplasma más delgado. Por lo general, el patógeno se multiplica en ciernes, fusión binaria o cedenas. Podemos clasificarlas en dos tipos por sus características ecológicas:

Candidatus Liberibacter asiaticus: tipo resistente al calor, también lo llamamos el tipo asiático. Se puede multiplicar en ambientes de baja y alta temperatura (entre 27 a 32 grados) y dañar a los cítricos. El sistema bacterial asiático pertenece a este tipo.

Candidatus Liberibacter africanus: tipo sensible al calor, también llamada tipo africano. Causa síntomas muy grave entre 22 a 24°C y se va a mitigar más 30°C. El sistema bacterial sudafricano pertenece a este tipo.

3. Incidencia ecológica

- 1) Propagación por injerto: forma principal de la transmisión de HLB es la propagación de yemas infestadas.
- 2) Insectos vectores: se transmite la enfermedad desde dos tipos de psílidos de una forma sostenible. El vector de la bacteria asiática es *Diaphorina citri* Kuwayama y la africana o sudafricana es *Trioza erytrae* Del Guercio. *Murraya paniculata* es el hospedero más adecuado para la multiplicación de la *Diaphorina* sp. pero no es para los patógenos. Los patógenos se transmiten muy lento en los tejidos vegetales de los cítricos. Al principio, los patógenos se quedan en los tejidos de ramas donde *Diaphorina* sp. la transmite y se tarda para transmitirla a toda la planta, por eso se mantiene un periodo largo de incubación.

B. CITRUS TRISTEZA

1. Los síntomas

Síntomas en las hojas: amarillamiento, encogimiento de hojas. Las hojas se rizan hacia arriba con una forma parecida de cuchara y parece clorosis. En las plantas infectadas se adelantan la defoliación y marchitez gradualmente.

Síntomas en los tallos: en algunas ramas, aparece el síntoma del picado de tallo.

Síntomas en las flores y frutos: las plantas infectadas son bajas y su crecimiento es lento. Además crecen muchas ramas nuevas pero son débiles. En los casos de ponkans y mandarinas, no hay síntomas claves en la superficie.

2. Características de patogenicidad y modo de transmisión

Patogenicidad: Citrus tristeza virus (CTV). En el sistema de clasificación de virus, el código decimal de ICTV es 17.0.1.T.1.01. CTV es uno de los virus con granos más largos y pertenece a Closteroviridae, Closterovirus. CTV es virus filamentosos con curvatura mayor, su tamaño de grano es más o menos 2000 nm × 12 nm. CTV es (+)SSRNA y su tamaño de genoma total es 17 a 20 kb. Este virus vive en las células del floema del anfitrión, así que afecta al sistema de transportación de las plantas. La temperatura más adecuada para la infección y multiplicación es entre 20 a 25°C. En la naturaleza, CTV tiene muchos sistemas diferentes. Como sólo se usan los tipos de portainjertos resistentes al CTV en la cultivación de cítricos en Taiwán, casi no detectamos síntomas claves. En Taiwán, la mayoría de los aislados de CTV causa síntomas de *seeding yellow* en limón Eureka. En general, Taiwán tiene 3 sistemas de CTV.

- 1) CTV-SYCTV-*seeding yellow strain*. Por lo general, no aparecen los síntomas en las especies cultivadas en Taiwán. Pero cuando afecta a lima mexicana, limón eureka, *Citrus aurantium* L. y *Citrus limonia* Osbeck, las plantas de semilleros se vuelven amarillas y se produce una muerte regresiva desde el pico.
- 2) CTV-Pum/SP: CTV-*pummelo stem-pitting strain*. Este virus causa la atrofia de las plantas, sus frutos, y la grave depresión del xilema. Puede causar síntomas graves en los pomelos Wentan. Descubrieron este *strain* primero en Taiwán en 1981 y está bastante diferenciado de los demás.
- 3) CTV-SwO/SP: CTV-*sweet orange stem-pitting strain*. Este virus causa la depresión del xilema en la naranja valencia.

Incidencia ecológica

- 1) Propagación por injerto: esta enfermedad se disemina por injertos infectados.
- 2) Insectos vectores: se disemina el virus principalmente por *Toxoptera citricida* Kirkaldy en forma semi-permanente. Algunos informes indican que *Aphis gossypii* Glover y *Myzus persicae* también diseminan el virus pero con menos eficiencia.

C. CITRUS TATTER-LEAF

1. Los síntomas

Este virus afecta la mayoría de los cítricos con la infección latente y por eso aparecen síntomas muy generales. Pero cuando infesta a *Citrus excelsa* y Citrange aparecen atrofiamientos, deformidades, marcas y rupturas en las hojas de las plantas. A veces causa la distorsión de forma en zigzag

en los brotes de Citrange. Cuando se injerta en *Citrus aurantium* o Citrange, aparecen grietas en la conjunción y se fracturará cuando haya viento fuerte.

2. Características de patogenicidad y modo de transmisión

Patogenicidad: *Citrus tatter leaf virus*. Código decimal de ICTV: 13.0.1.0.002. Pertenece a 15 Capillovirus. Es un virus (+)ssRNA. Es virus filamentosos con la flexión moderada. El tamaño de su grano es sobre 650(nm)×19(nm). Se parece a *Apple stem grooving virus* y *Lily symptomless virus* en pruebas serológicas.

3. Incidencia ecológica

- 1) Propagación por injerto: esta enfermedad se disemina por los injertos infestados.
- 2) Propagación mecánica: se disemina la enfermedad desde las herramientas utilizadas en poda y en actividades fitosanitarias. Si se corta una planta infestada y luego otra sana, así es posible dispersar la enfermedad.

D. CITRUS EXOCORTIS

1. Los síntomas

Su influencia tiene una gran relación con las especies de cítricos. Solo aparecen los síntomas en las especies susceptibles de los portainjertos como *Citrus aurantium*, Citrange o *Citrus limonia* Osbeck. La naranja dulce, mandarina Ponkan, naranja agria y Tankan son especies resistentes. El virus causa los síntomas en la corteza de los portainjertos, por ejemplo, la ampliación, el desprendimiento de la corteza. Si se agrava impedirá el desarrollo de la planta y causará retraso en el crecimiento.

2. Características de patogenicidad y modo de transmisión

Patogenicidad: *Citrus exocortis* viroid (CEVd). Código decimal ICTV: 80.0.1.0.003. Pertenece a familia *Pospiviroidae* y género *pospiviroid*. Su tamaño es 371 *nucleotide* que no tiene *coat protein* y es SSRNA de circular.

3. *Incidencia ecológica*

- 1) Propagación por injerto: el injerto infestado es el principal acceso de la dispersión.
- 2) Propagación mecánica: se disemina la enfermedad desde las herramientas para la poda. Si se corta una planta infectada, se va a dispersar la enfermedad a otra sana.

APÉNDICE 2. PLAGAS REGLAMENTADAS Y SU MÉTODO DE DIAGNÓSTICO EN UN PROGRAMA DE CERTIFICACIÓN DE PLANTAS SANAS DE CÍTRICOS

A. LAS ESPECIES DE DETECCIÓN

- Bloque de fundación:
 - Huanglongbing (HLB)
 - Exocortis (CEVd)
 - Psorosis (CPsV)
 - Cachexia-xyloporosis (CCaV-XYV)
 - Citrus leprosis (CiLV)
 - Tristeza (VTC)
 - Clorosis variegada de los cítricos
 - Canker
 - Citrus Tatter-leaf
- Bloque de multiplicación:
 - HLB
 - Citrus Tatter-leaf
 - Citrus Tristeza
- Vivero comercial:
 - HLB
 - Citrus Tatter-leaf

B. LAS FORMAS DE DETECCIÓN

HLB- Dot hybridization con ADN probe o PCR

Citrus Tristeza- ELISA o RT-PCR

Citrus Tatter-leaf- RT-PCR o bioensayo de Rusk.

Citrus Exocortis- RT-PCR o bioensayo de Etrog citron 861-S

C. EL PROCEDIMIENTO DE INSPECCIÓN

El vivero de bloque fundación (nivel 1)

- 1) Los inspectores deben supervisar los viveros para revisar toda la instalación con una frecuencia determinada (se sugiere semanalmente), con base en la regulación nacional.

- 2) Inspeccionar las plantas recién plantadas cada temporada y revisar las almacenadas cada seis meses. Cuando hagan el muestreo, los inspectores deben sacar las muestras de la parte de la planta y cantidad apropiada y luego numerarlas. Colocarlas dentro de una bolsa de plástico con cierre hermético y enviarlas al laboratorio de referencia oficial en cada país para su diagnóstico.
- 3) El laboratorio de referencia oficial debe enviar el resultado al solicitante. Si hay algunas plantas infectadas, el solicitante tiene que sacar las plantas contaminadas del vivero inmediatamente.

El vivero de multiplicación de yema (nivel 2)

- 1) Los inspectores deben visitar los viveros para revisar la instalación con una frecuencia determinada (se sugiere semanalmente), con base en la regulación nacional.
- 2) El manejo de los viveros de multiplicación de yemas debe estar conforme con las regulaciones nacionales. Los inspectores deben realizar la inspección en cualquier momento. Si hay alguna anomalía, se tiene que informar a la autoridad y detener los próximos procesos de venta de yemas.
- 3) Se debe revisar las yemas cada medio año y muestrear al menos 4 plantas de cada variedad. Cuando hagan el muestreo, los inspectores deben sacar las muestras de la parte de la planta y cantidad apropiada y luego numerarlas. Colocarlas dentro de una bolsa de plástico con cierre hermético y enviarlas al laboratorio de referencia oficial en cada país para su diagnóstico.
- 4) Una semana antes de la demanda de las yemas, los inspectores deben ir a los viveros para revisar el proceso de procesamiento y envío de yemas. Si es necesario, deben muestrear la planta y enviarla al laboratorio de referencia oficial.
- 5) El laboratorio de referencia oficial debe enviar el resultado al solicitante. Si hay algunas plantas infectadas, el solicitante tiene que sacar las plantas contaminadas del vivero inmediatamente.
- 6) Si los viveros pasan el proceso de certificación, la autoridad certificadora (comúnmente los ministerios de Agricultura) informará el resultado a los solicitantes dentro de una semana. Después del recibimiento del resultado, la autoridad competente deberá emitir el certificado al solicitante.
- 7) En el caso de que los viveros no puedan cumplir con el proceso de certificación, la autoridad competente va a informar el resultado a los solicitantes dentro de una semana, para realizar las correcciones pertinentes.

Viveros de plantas comerciales de cítricos (nivel 3)

- 1) Los inspectores deben visitar los viveros de plántulas comerciales para revisar la instalación con una frecuencia determinada (sugiere semanalmente), basada en la regulación nacional.
- 2) El manejo de los viveros de plantas comerciales de cítricos debe estar conforme con las regulaciones nacionales. Los inspectores deben realizar la inspección en cualquier momento. Si hay alguna anomalía se tiene que informar a la autoridad y detener los próximos procesos de venta de yemas.
- 3) Las plantas de cítricos deben revisarse cada medio año y muestrear al menos cuatro plantas de cada variedad. Cuando hagan el muestreo, los inspectores deben sacar las muestras de la parte de la planta y cantidad apropiadas y luego numerarlas. Colocarlas dentro de una bolsa de plástico con cierre hermético y enviarlas al laboratorio de referencia oficial en cada país para su diagnóstico.
- 4) Dos a tres semanas antes de la venta, la autoridad competente debe ir a los viveros (nivel 3) para realizar el muestreo según las variedades. Ellos deberán muestrear 1% de cada 1000 plantas y 0.5% de cada 10,000 plantas.
- 5) El laboratorio de referencia oficial debe enviar el resultado al solicitante. Si hay algunas plantas infectadas, el solicitante tiene que sacar las plantas contaminadas del vivero inmediatamente.
- 6) En el caso de que los viveros comerciales superen el proceso de certificación y el muestreo visual, ya pueden inscribirse como viveros certificados. La autoridad competente tendrá que informar el resultado al solicitante dentro de una semana. Después de recibir el resultado, la autoridad competente deberá emitir el certificado al solicitante dentro de una semana.
- 7) En el caso de que los viveros no puedan completar el proceso de certificación, la autoridad competente tendrá que informar el resultado al solicitante dentro de una semana.

APÉNDICE 3. ESTERILIZACIÓN DE SUSTRATOS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE PLANTA SANA DE CÍTRICOS

Los métodos de esterilización de sustratos utilizados en la producción de plantas sanas de cítricos en condiciones de invernadero son los siguientes:

- 1) Esterilización con vapor (media hora a 80°C). Utilizando el siguiente procedimiento:
 - a) Si el sustrato tiene un empaque impermeable, insertar un tubo metálico de una pulgada de diámetro con agujeros de 1/8" cada 20 centímetros. El largo del tubo dependerá del tamaño del empaque, procurando llegar hasta el fondo.
 - b) Colocar un sensor de temperatura en el sustrato y se debe mantener por lo menos a 30 centímetros del tubo de salida de vapor. Lo ideal es colocarlo en la parte más alejada del tubo de salida de vapor para asegurarnos de que todo el medio alcance los 80°C de temperatura por el tiempo deseado (30 minutos).
 - c) Repetir el proceso en cada empaque de sustrato.
 - d) Para sustratos a reutilizarse, la esterilización debe realizarse en recipientes metálicos con un tamaño de 1 m3 (1x1x1 mts) donde se inserta el tubo de vapor en el fondo y se realiza el procedimiento descrito anteriormente.
 - e) Si la cantidad de sustrato es pequeña, se puede construir una cámara simple para la esterilización con vapor. La misma se construye con una estructura de sostén (ladrillos o madera) para la colocación de una lona plástica donde se colocará el sustrato y se cubrirá con la misma, asegurando la hermeticidad de la cámara.
- 2) Si el tamaño de los sustratos no es tan grande también puede utilizar la esterilización simple.
 - a) Primero, hay que apilar ladrillos huecos en forma de horno (en forma de U) y se cubren con láminas de plástico refractarias. El ancho de la lámina debe ser 2.5 veces más que lo de la forma que amontonado por los ladrillos.
 - b) Insertar la tubería de vapor para la esterilización y el sensor de temperatura. Insertar la tubería de vapor para la esterilización y el sensor de temperatura. Cubrir el sustrato sobre los ladrillos huecos y empezar la esterilización de vapor.
 - c) Cuando la temperatura del sustrato llegue a 80 grados, se puede parar la transportación de vapor y se mantiene la temperatura por 30 minutos.

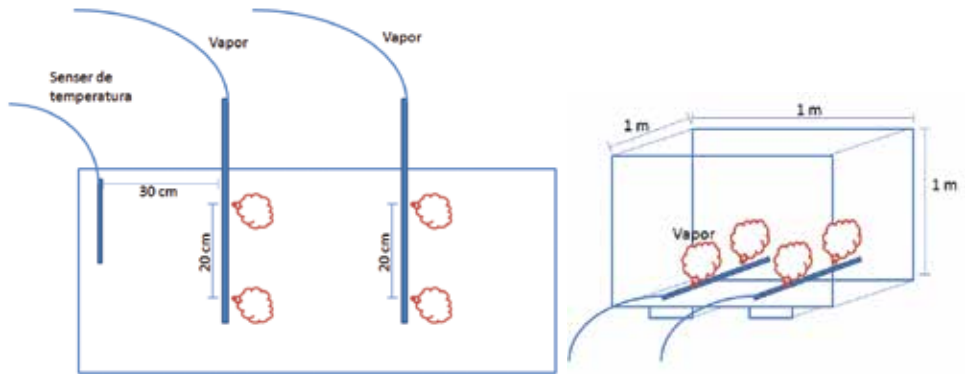


Figura 37. Esterilización del sustrato con vapor (media hora a 80°C).

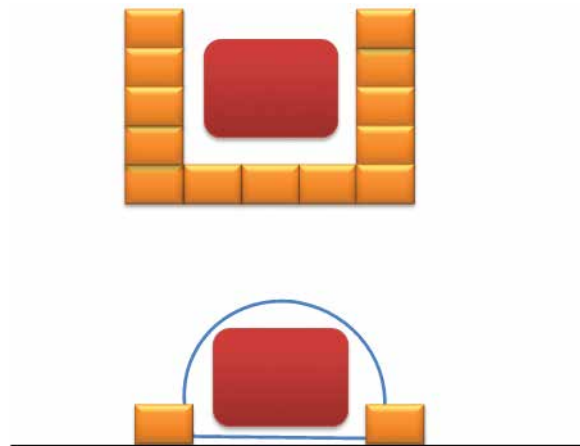


Figura 38. Esterilización simple del sustrato.

APÉNDICE 4. PLANOS DE LOS VIVEROS PARA PLANTA SANA

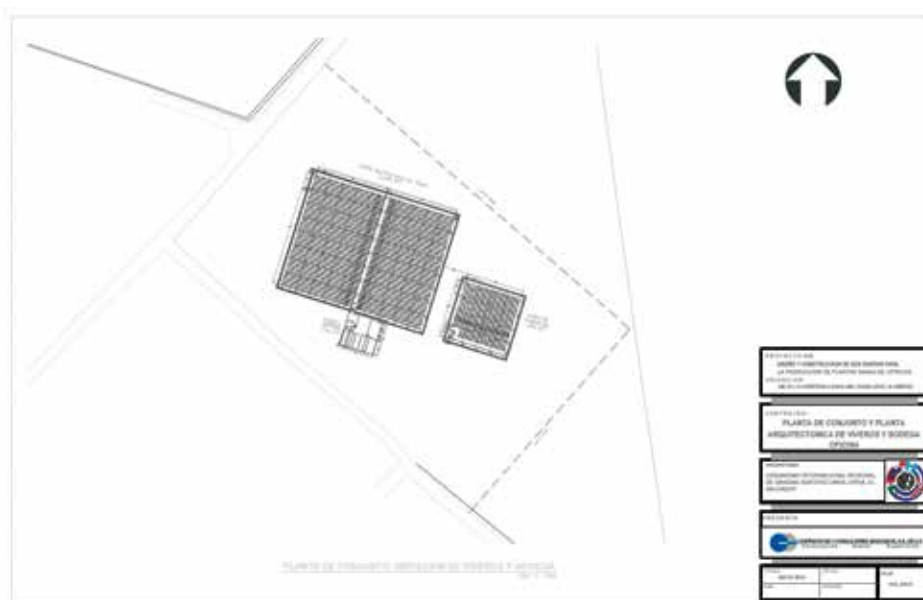


Figura 39. Orientación de viveros de nivel 1 y 2 del Proyecto HLB-OIRSA-ICDF en la Región del OIRSA.

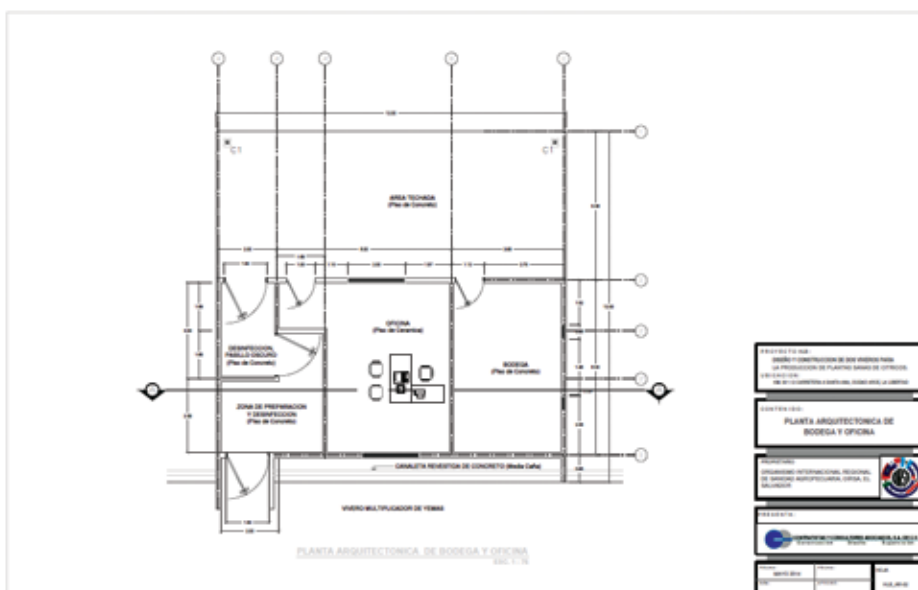


Figura 40. Entrada de los invernaderos de producción de planta sana. Es necesario instalar un cuarto oscuro que tenga dos puertas en forma de "L".

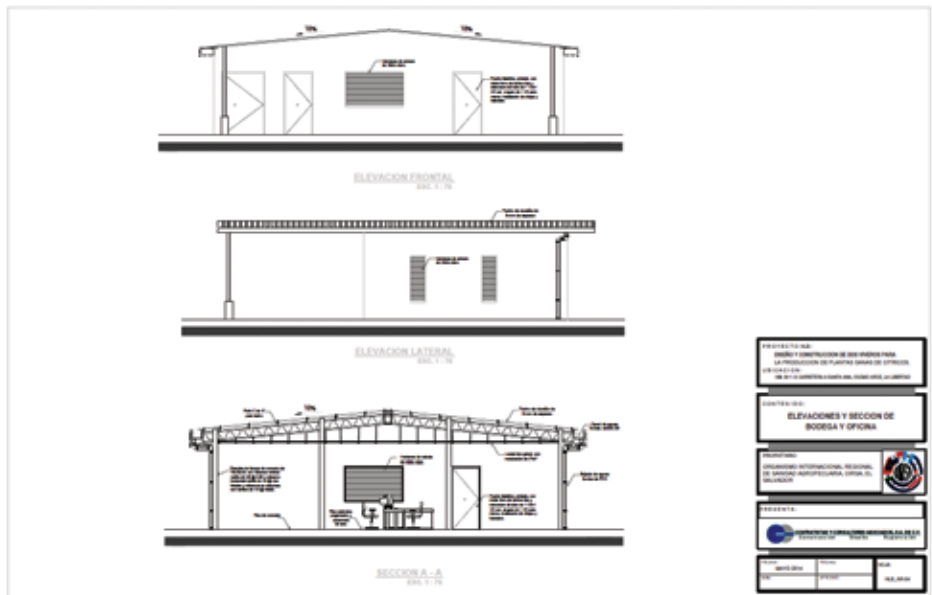


Figura 41. Fachada (frente) de entrada, oficina y bodega de invernaderos presentes del Proyecto HLB-OIRSA-ICDF en la región.

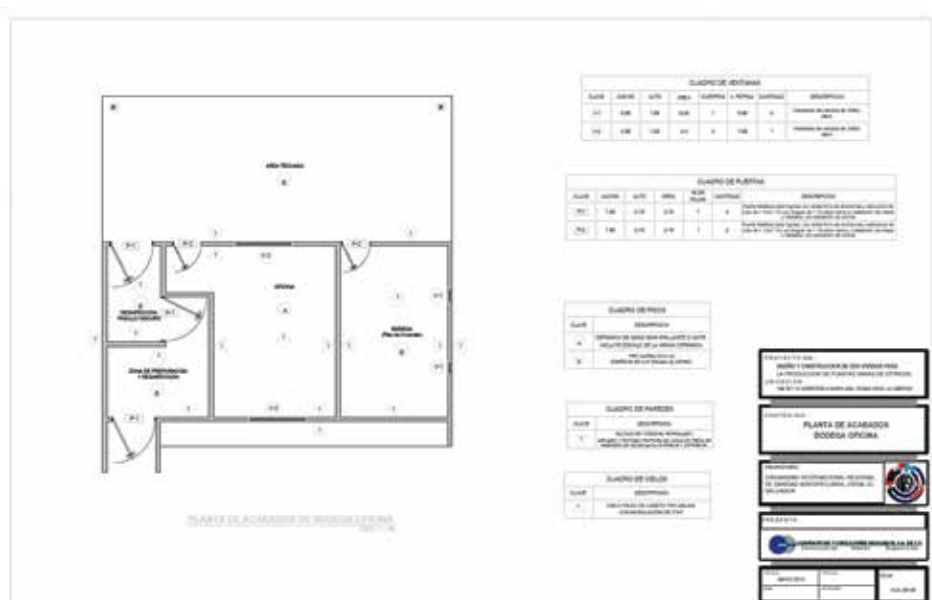


Figura 42. Planta de acabados, bodega y oficina.

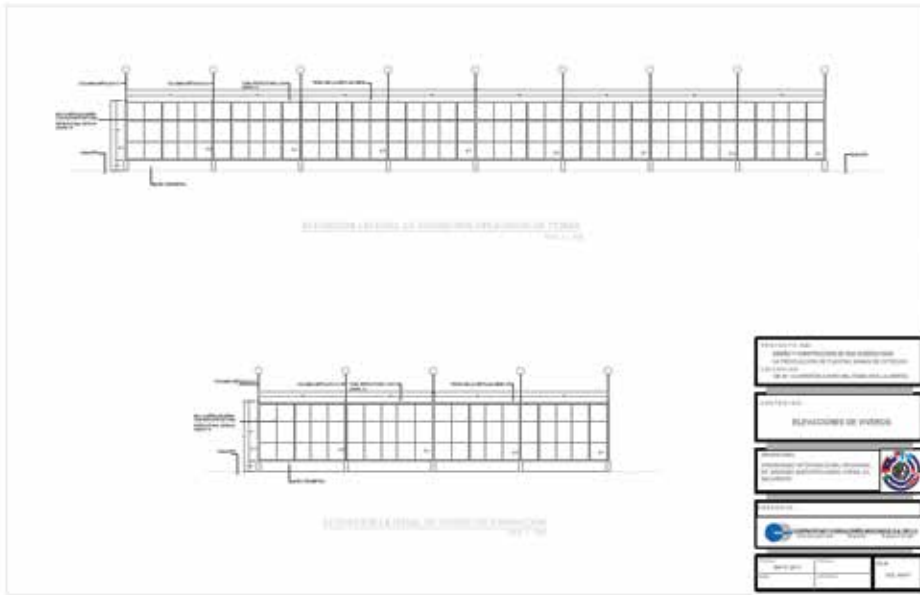


Figura 43. Plano de vivero de nivel 2.

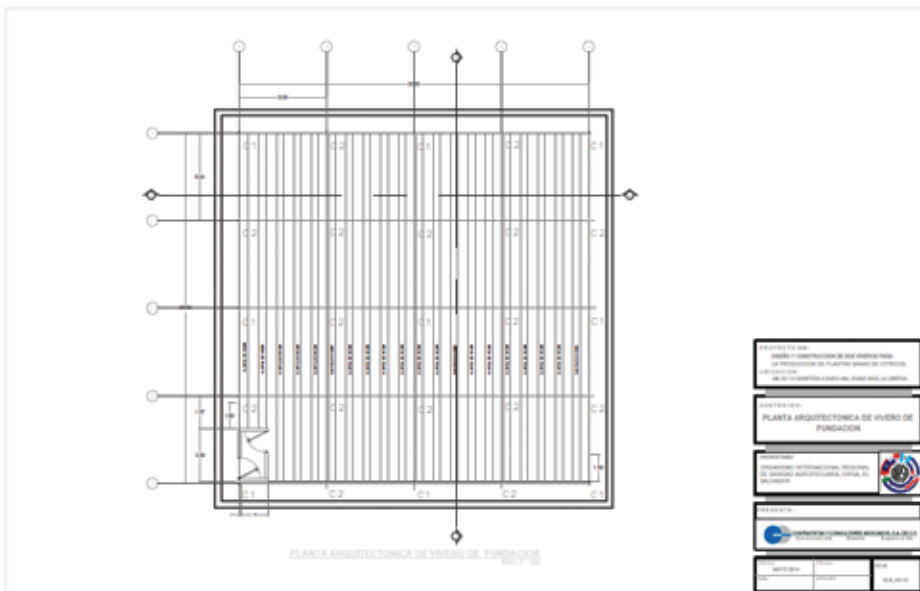


Figura 44. Planta arquitectónica del vivero nivel 1 con su entrada en forma de "L" oscura.

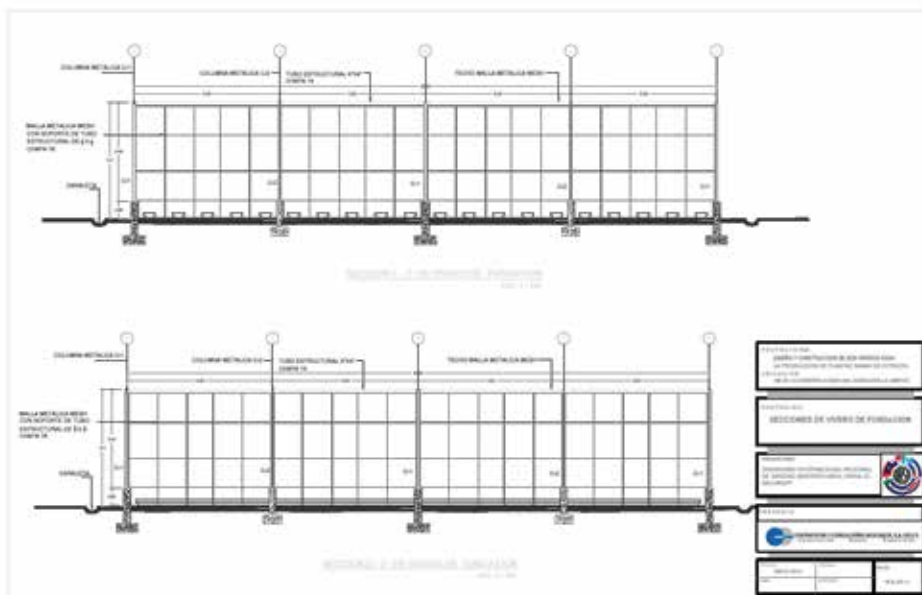


Figura 45. Secciones de vivero de fundación del Proyecto HLB-OIRSA-ICDF.

BIBLIOGRAFÍA

- A. S. HWANG, 2000. Characteristics of Citrus Rootstocks and Its Choice in Citriculture. *China Hort.* 36(2):133-146.
- A. S. HWANG, J. M. YANG, 2004. Citrus Healthy Budwood Program and the Projects Executed in Taiwan. *Healthy Breeding*, 6(2): 21-31.
- A. S. HWANG, C. S. YU, C.C. HUNG, T. S. HUNG, 2005. La aplica de patrón de producción de cítricos. *Boletín de Conferencia de Desarrollo de Cítricos en Taiwán*. p. 85-99.
- FFTC . 2003. Container-grown nursery trees. Chapter 3. p. 7-13. en : *Citrus production, A manual for Asian Farmers*. FFTC. Taipei.



Protocolo de diagnóstico de Huanglongbing en hojas de cítricos

En acción contra el HLB

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| I. | |
| PROCEDIMIENTO DE MUESTREO DE HUANGLONGBING EN HOJAS DE CÍTRICOS | |
| 67 | |
| II. | |
| SUGERENCIA PARA EL MUESTREO DE HLB EN HOJAS DE CÍTRICOS | |
| 69 | |
| III. | |
| MÉTODO DE LA REACCIÓN ALMIDÓN CON YODO PARA PREDIAGNÓSTICO DEL HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS | |
| 71 | |
| 3.1. Materiales | 71 |
| 3.2. Procedimiento | 72 |
| IV. | |
| PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN | |
| 75 | |
| 4.1. Lista de reactivos | 75 |
| 4.2. Preparación de reactivos | 75 |
| V. | |
| PROCEDIMIENTO PARA EXTRAER ADN DE TEJIDO VEGETAL | |
| 81 | |
| VI. | |
| PROCEDIMIENTOS DE PCR CONVENCIONAL Y ELECTROFORESIS | |
| 83 | |
| VII. | |
| FORMATO PARA PRESENTAR INFORMES DE LA DETECCIÓN DE HLB CON PCR CONVENCIONAL | |
| 85 | |
| BIBLIOGRAFÍA | |
| 87 | |

I. PROCEDIMIENTO DE MUESTREO DE HUANGLONGBING EN HOJAS DE CÍTRICOS

A) Búsqueda de síntomas:

- Buscar las plantas (hojas) sospechosas del huanglongbing (HLB).
- Localizar las plantas y registrar los datos necesarios (coordenadas por medio de GPS, aldea, municipio, departamento, propietario, finca, fecha, variedad, y otros).

B) Toma de muestras:

- Tomar las muestras en áreas donde las plantas muestran los síntomas más evidentes.
- Tomar las muestras de tres ramas diferentes.
- Un total de 16~32 hojas con pecíolos.
- Evite tocar lesiones en las plantas.
- En las plantas asintomáticas tomar las muestras en ocho diferentes posiciones.
- Posteriormente dividir el follaje de la planta en dos partes: parte superior e inferior.
- En la parte superior del follaje, tomar las muestras en las posiciones: norte, sur, este y oeste.
- En la parte inferior tomar las muestras en las posiciones noreste, noroeste, sudeste y suroeste.
- En cada posición tomar 2~4 hojas con pecíolos, para un total de 16~32 hojas con pecíolos por planta.

C) Etiquetado y embolsado de muestras:

- Limpiar las hojas con una manta para remover el polvo o materias extrañas, antes de colocarlas dentro de la bolsa plástica.
- Marcar las bolsas con los números de identificación de las muestras.
- Mantener frescas las muestras (temperatura ambiente), pero no someterlas a congelación.
- Si las muestras se tardan más de tres días en llegar al laboratorio:
 - Se sugiere colocar un papel húmedo en una esquina dentro de la bolsa.
 - El agua que se utilice para humedecer el papel debe estar limpia.

D) Envío de muestras:

- Las muestras deben recibirse frescas en el laboratorio.
- Las muestras deben ir identificadas.
- Asegurarse de que las muestras lleguen al laboratorio.

II. SUGERENCIA PARA EL MUESTREO DE HLB EN HOJAS DE CÍTRICOS

- 1) Comunicarse con el laboratorio de diagnóstico previo a realizar el muestreo, para asegurarse que el laboratorio realizará el diagnóstico y coordine la disposición del horario.
- 2) Realizar la prueba de yodo antes de decidir el envío de las muestras al laboratorio de diagnóstico.

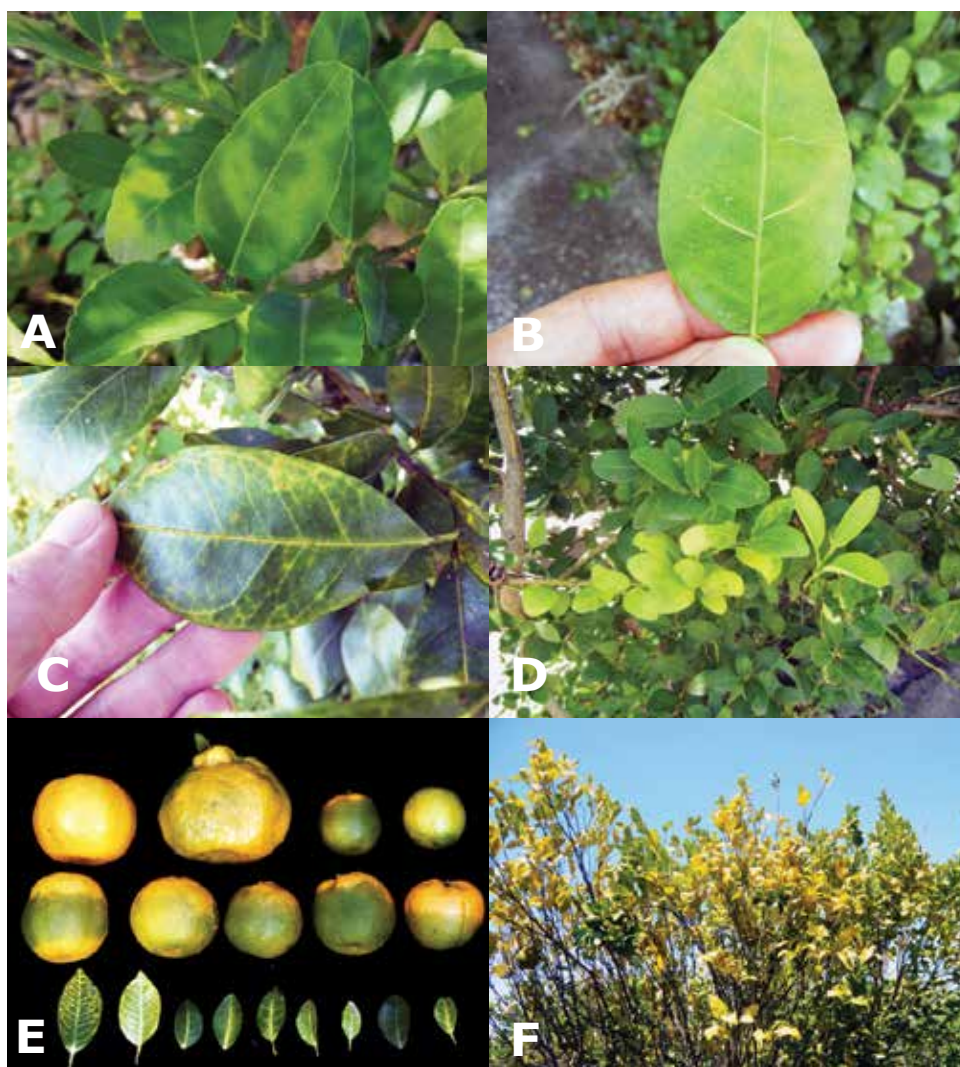


Figura 1. Síntomas ocasionados por HLB. A: Hojas con moteado difuso; B: Hojas con acorchado de nervaduras; C: Hojas con aclaramiento de nervaduras; D: Hojas con amarillamiento; E: Frutos con inversión de color y F: Ramas secas. (Ting-Hsuan Hung, 2011).

III.

MÉTODO DE LA REACCIÓN ALMIDÓN CON YODO PARA PREDIAGNÓSTICO DEL HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS

La técnica se basa en una reacción del yodo con el almidón acumulado en la planta enferma. La bacteria del HLB causa una obstrucción de los haces vasculares en el floema, y la planta acumula 20 veces más almidón en las hojas, que cuando la planta está sana. Este diagnóstico rápido de campo tiene un 80% de certeza, pero requiere de un diagnóstico confirmativo, mediante la técnica de laboratorio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*).

3.1.

MATERIALES

- 1) Yodo:
 - La fórmula del yodo es (KI 3% + I2 1.5%).
 - Disolver 3g de KI y 1.5g de I2 en 100 ml de agua destilada.
 - Evitar el contacto directo con la luz.
 - Se puede guardar la solución a temperatura ambiente.
- 2) Bolsa plástica. Se sugiere usar la bolsa Ziploc: 5 x 8.5 cm.
- 3) Agua destilada.
- 4) Papel de lija de grano 160~200:
 - Se sugiere cortar una superficie aproximada de 2 cm² (2 x 1 cm).
- 5) Hojas con síntomas de HLB.



Figura 2. Kit de diagnóstico rápido (prueba de yodo).

3.2. PROCEDIMIENTO

- 1) Limpiar de cuerpos extraños y acumulaciones de polvo sobre las hojas.
- 2) Frotar con papel de lija 20 veces sobre la vena central, en el haz o envés de la hoja.
- 3) Poner la lija frotada en el envés de la hoja, en una bolsa y agregar 1cc de agua destilada.
- 4) Amasar, mover o agitar la lija que está dentro de la bolsa, para que los tejidos pegados en la misma se desprendan y se mezclen con el agua destilada.
- 5) Mover la lija a un lado de la bolsa y agregar una gota de yodo a la solución de tejido y agua.
- 6) Esperar de 3 a 5 minutos para la reacción del yodo con el almidón.
- 7) Observar el cambio de color del líquido:
 - El color azul violeta significa que la planta posiblemente (80%) está infectada con HLB (fig. 3, derecha).
 - El color amarillo indica que la planta está sana (fig. 3, izquierda).

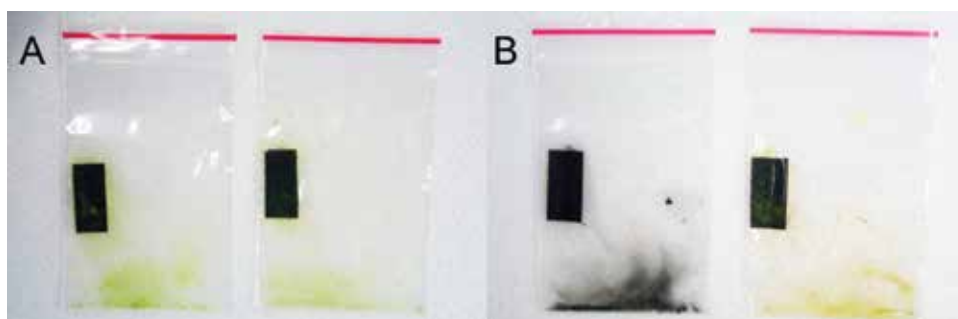


Figura 3. Método de la reacción de almidón con yodo. A: Tejidos obtenidos del frotis del envés de la hoja agregando un cc de agua destilada. B: Izquierda: si después de agregar una gota de yodo, se observa una coloración oscura, indica que la muestra está infectada con HLB; derecha: muestra sana libre de HLB (Ting-Hsuan Hung, 2011).

En la figura 4, se puede observar el conjunto de hojas infectadas con HLB del lado izquierdo. Con prueba de reacción con yodo se observa la acumulación de almidón en color azul violeta; al lado derecho se observan hojas sanas, que en la reacción con yodo se ven con una coloración amarillenta. 1. Ponkan; 2. naranja; 3. pomelo; 4. limón. (Dr. Ting-Hsuan Hung, 2011).

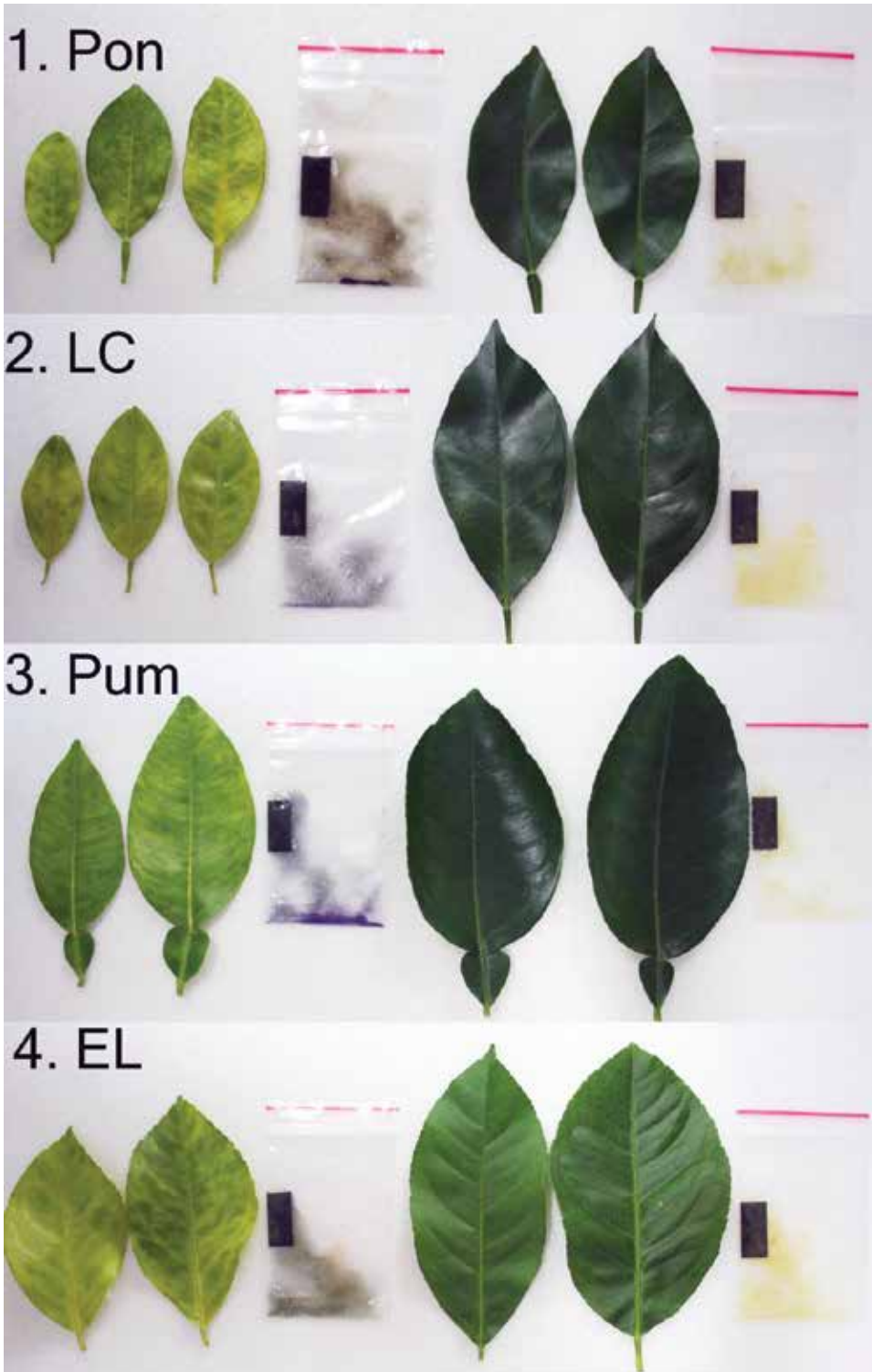


Figura 4. Izquierda, hojas infectadas con HLB y derecha, hojas sanas (Ting-Hsuan Hung, 2011).

IV. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

4.1. LISTA DE REACTIVOS

- 1) Buffer extracción de ADN (pH 8.0),
- 2) Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine) 10%,
- 3) NaCl 5M,
- 4) 10% CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) en NaCl 0.7M,
- 5) Solución CI,
- 6) Solución PCI,
- 7) Isopropanol líquido,
- 8) Ethanol 70%,
- 9) Buffer TE 1X / Tris HCL / EDTA 0.5 M,
- 10) *Primer pair* 226 bp,
- 11) *Master mix* o mezcla de reactivos PCR,
- 12) Buffer TAE 50X,
- 13) Buffer TAE 0.5 X,
- 14) Gel de agarosa 1.4%.
 - Peso molecular /PM del EDTA-2Na = 372.24 g/Mol.
NaCl = 58.5, NaOH=40, Tris-base = 121.14, Tris-HCl = 157.56,
EDTA = 292.24

4.2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Buffer extracción de ADN

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|--------------------|----------------|---------------------|
| Tris-base | 4.840 g | 0.1M |
| EDTA-2Na | 14.898 g | 0.1M |
| NaCl | 5.840 g | 0.25M |
| ddH ₂ O | afore a 400 ml | |

Ajustar el pH a 8.0
Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
Se debe guardar la solución en frasco de vidrio con tapadera, a temperatura 4°C en refrigerador.

2. Sarkosyl (*N-Lauroylsarcosine*) 10%

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|--------------------|---------------|---------------------|
| Sarkosyl | 7 g | 0.1M |
| ddH ₂ O | afore a 70 ml | |

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
Se debe guardar la solución en frasco de vidrio con tapadera, a temperatura ambiente.

3. NaCl 5M

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|--------------------|---------------|---------------------|
| NaCl | 23.376 g | 5M |
| ddH ₂ O | afore a 80 ml | |

Esterilizar en auto clave a 121 °C durante 20 minutos.
Se debe guardar la solución en frasco de vidrio con tapadera, a temperatura ambiente.

4. 10% CTAB en NaCl 0.7M

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|--------------------|---------------|---------------------|
| NaCl | 3.272 g | 0.7M |
| ddH ₂ O | afore a 80 ml | |

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Después de esterilizar la solución de NaCl 0.7M. Agregue CTAB a la solución.

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|-----------|----------|---------------------|
| CTAB | 8 g | 10% |
| NaCl 0.7M | 80 ml | |

Se puede guardar la solución en el frasco de vidrio con tapadera, a temperatura ambiente.

5. Solución CI

Cloroformo: alcohol isoamílico =24 : 1

| Reactivo | Cantidad |
|--------------------|----------|
| Cloroformo | 24 ml |
| Alcohol isoamílico | 1ml |

Se debe guardar la solución en el frasco de vidrio con tapadera, a temperatura ambiente en la campana de gases.

6. Solución PCI

Fenol : cloroformo : alcohol isoamílico = 25 : 24 : 1

| Reactivo | Cantidad |
|--------------------|----------|
| Fenol (pH 7.9) | 25 ml |
| Cloroformo | 24 ml |
| Alcohol isoamílico | 1 ml |

Se debe guardar la solución en el frasco de vidrio oscuro con tapadera, a temperatura 4°C en refrigerador.

7. Isopropanol líquido (Se debe guardar en el frasco de vidrio con tapa a 4°C en refrigerador.)

8. Etanol 70%

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|--------------------|----------|---------------------|
| Etanol 99% | 210 ml | 70% |
| ddH ₂ O | 90 ml | |

Se debe guardar la solución en el frasco de vidrio con tapa a temperatura ambiente.

9. Buffer TE 1X

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|--|----------------|---------------------|
| Tris-HCl 1 M (pH 8.0) | 5 ml | 10 mM |
| ESTA 0.5 M (pH 8.0) | 1 ml | 1 mM |
| ddH ₂ O | afore a 500 ml | |
| Se debe guardar la solución en frasco de vidrio con tapa a temperatura ambiente. | | |

Tris-Cl. 1 M (pH 8.0)

| Reactivo | Cantidad |
|--|-----------------|
| Tris-Cl. | 157.56 g |
| ddH ₂ O | 800 ml |
| Ajustar el pH a 8.0 | |
| ddH ₂ O | afore a 1000 ml |
| Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos Guardar la solución en frasco de vidrio con tapa a temperatura ambiente. | |

EDTA 0.5M (pH8.0)

| Reactivo | Cantidad |
|---|-----------------|
| EDTA-2Na | 186.1 g |
| ddH ₂ O | 800 ml |
| Ajustar el pH a 8.0 | |
| ddH ₂ O | afore a 1000 ml |
| Guardar la solución en frasco de vidrio oscuro con tapadera, a temperatura 4°C en refrigerador. | |

10. Primer pair 226 bp (Hung, et al., 1999)

| Reactivo | Cantidad (µl) |
|--------------------------------|---------------|
| ddH ₂ O (TE buffer) | 180 |
| <i>Forward primer</i> | 10 |
| <i>Reverse primer</i> | 10 |
| Total | 200 |

Guardar a temperatura -20°C en congelador.

11. Master mix o mezcla de reactivos PCR

| Reactivo | Cantidad (µl) |
|---------------------------|---------------|
| ddH ₂ O | 14.75 |
| 10X PCR buffer | 2.50 |
| MgCl ₂ 25 mM | 2 |
| dNTPs 2.5 mM | 2 |
| <i>Primer pair</i> 226 pb | 1 |
| Polimerasa Taq | 0.25 |
| Total | 22.5 |

Agregue 20 µl de mezclas de PCR y 2.2 µl de ADN de muestra. Aproximadamente el volumen de la reacción total es de 23 µl .
Guardar a temperatura -20°C en congelador.

12. Buffer TAE 50X

| Reactivo | Cantidad |
|---|-----------------|
| Tris base | 242 g |
| Ácido acético glacial | 57.1 ml |
| EDTA 0.5M (pH 8.0) | 100 ml |
| ddH ₂ O | afore a 1000 ml |
| Agregue ácido acético glacial para ajustar el pH a 8.3 Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Guardar la solución en frasco de vidrio con tapa a temperatura ambiente. | |

13. Buffer TAE 0.5 X

| Reactivo | Cantidad |
|--|----------------|
| TAE buffer 50X | 5000 µl |
| ddH ₂ O | afore a 500 ml |
| Se debe guardar la solución en frasco de vidrio con tapa a temperatura ambiente. | |

14. Gel de agarosa 1.4%

| Reactivo | Cantidad |
|----------------------------------|----------|
| Agarosa grado biología molecular | 0.35 g |
| Buffer TAE 50X | 250 µl |
| ddH ₂ O | 25 ml |

V. PROCEDIMIENTO PARA EXTRAER ADN DE TEJIDO VEGETAL

- 1) Depositar en un mortero, aproximadamente 0.5 g de venas centrales y de pecíolos.
- 2) Agregar 2.7 ml de buffer extracción de ADN y 300 µl de Sarkosyl y se procede a moler los tejidos con un mortero.
- 3) Incubar a 55°C por una hora.
- 4) Centrifugar a 4,000 g (6,000rpm) por 5 min.
- 5) Transferir 800 µl del sobrenadante a un nuevo tubo. Agregar 100 µl NaCl 5M y 100 µl de CTAB al 10%. Mezclar uniformemente. Incubar a 65°C por 10 min.
- 6) Agregar 600 µl de CI (Cloroformo: alcohol isoamílico = 24 : 1). Mezclar por inversión.
- 7) Centrifugar a 10,000 g (11,000rpm) por 5 min.
- 8) Transferir 800 µl del sobrenadante a un nuevo tubo. Agregar 600 µl de PCI (fenol : cloroformo : alcohol isoamílico=25:24:1). Mezclar por inversión.
- 9) Centrifugar a 10,000 g (11,000 rpm) por 5 min.
- 10) Transferir 600 µl del sobrenadante a un nuevo tubo. Agregar 360 µl de isopropanol. Mezclar por inversión suave.
- 11) Incubar a -20°C por 30 min. Centrifugar a 10,000g (11,000rpm) por 10 min a 4°C.
- 12) Descartar el sobrenadante. Lavar el precipitado con 500 µl de etanol al 70%. Secar el precipitado al vacío durante 10 min.
- 13) Resuspender en 150 µl de buffer TE. Almacenar el ADN resuspendido a 4°C.

VI. PROCEDIMIENTOS DE PCR CONVENCIONAL Y ELECTROFORESIS

- 1) Programa de ciclado de PCR convencional
 - 1 ciclo a 94°C durante 3 min.
 - 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 60°C durante 1 min, 72°C durante 2 min.
 - 1 ciclo a 72°C durante 10 min.
 - 1 ciclo a 4°C permanente.
- 2) Electroforesis en geles de agarosa:
 - Preparar un gel de agarosa en concentración de 1.4%.
 - Regular el voltaje a 100V y dejar transcurrir la electroforesis 25~30 min.
 - Teñir el gel con tinte (ej. teñir el gel con EtBr por 4 min. y luego desteñir el gel en agua por 10min).
- 3) Visualización de gel.

VII. FORMATO PARA PRESENTAR INFORMES DE LA DETECCIÓN DE HLB CON PCR CONVENCIONAL

El resultado de cada análisis debe contener:

Una figura del gel agarosa, una tabla de resultados y las fotos de las muestras.

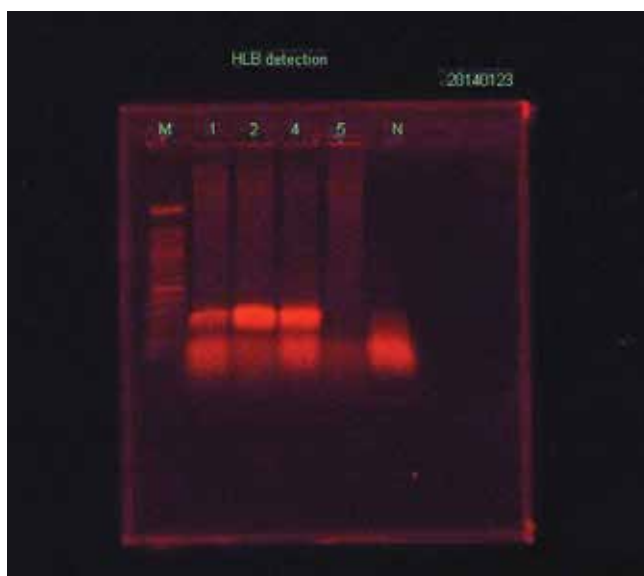


Figura 5. Detección del ADN de *Candidatus Liberibacter asiaticus* de muestras de cítricos.

TABLA 1.
RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DETECCIÓN DE ADN DE
***CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS* (LAS) DE MUESTRAS DE**
CÍTRICOS COLECCIONADOS EN GUATEMALA

| No. de muestra | Nota | Detección del HLB |
|----------------|------------------|-------------------|
| 1 | Zacapa (limón) | + ^{a)} |
| 2 | Zacapa (limón) | ++ |
| 4 | Zacapa (pomelo) | ++ |
| 5 | Zacapa (pomelo) | - |
| N | Negative control | - |

a) La señal de detección por PCR: -, negativo; +, positivo / débil; ++, positivo / fuerte.



Figura 6. Fotos de las muestras; 1 y 2: Zacapa (Limón); 4 y 5: Zacapa (Pomelo)

BIBLIOGRAFÍA

- HUNG, T. H., M. L. WU, H. J. SU. 1999. Development of a Rapid Method for the Diagnosis of Citrus Greening Disease Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Phytopathol.* 147: 599-604.
- SU, H. J., TSAI, C. H., FENG, Y. C. Y HUNG, T. H. 2010. The Development and Effective Use of Pathogen-free Seedling as the Main Component of IPM of Citrus Huanglongbing Disease. P33-61. *Proceedings of Symposium on the Occurrence of Important Diseases in Taiwan in Recent Year and Development of Disease Diagnosis, Monitoring and Control*. Special Publication of TARI No. 149.
- TING-HSUAN HUNG. 2011. Citrus huanglongbing (HLB) in Taiwan. Reunión de trabajo para la formulación del Proyecto Regional de Control de Huanglongbing y Sanidad de los Cítricos. OIRSA. El Salvador, 20-23 de septiembre del 2011.



Protocolo del manejo integrado del Huanglongbing

En acción contra el HLB

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| I. | |
| IMPACTO ECONÓMICO DEL HLB | |
| SOBRE LOS CÍTRICOS EN LA REGIÓN DEL OIRSA | |
| 93 | |
| II. | |
| TRANSMISIÓN DE LA | |
| BACTERIA ASOCIADA AL HLB | |
| 94 | |
| III. | |
| CONTROL DEL HLB SEGÚN | |
| LA INCIDENCIA DE LA INFECCIÓN | |
| 98 | |
| 3.1. Fincas con baja incidencia del HLB (hasta 10%) | 99 |
| 3.2. Fincas con mediana incidencia del HLB (hasta 30%) | 99 |
| 3.3. Fincas con alta incidencia del HLB (más del 30%) | 100 |
| 3.4. Fincas abandonadas | 101 |
| 3.5. Traspacios | 101 |
| IV. | |
| TRATAMIENTO ALTERNATIVO CON ENDOTERAPIA | |
| 103 | |
| V. | |
| BASES DE LA METODOLOGÍA MIP | |
| PARA EL CONTROL DEL HLB | |
| 105 | |
| 5.1. Características de dispersión del psílido | 105 |
| 5.2. Manejo integrado del HLB | 105 |
| 5.3. Control biológico con <i>Tamarixia radiata</i> | 108 |
| 5.4. El control químico del insecto vector | 112 |
| 5.5. El uso de la <i>Murraya paniculata</i> en el control del HLB | 115 |
| 5.6. Estudios ecológicos para la aplicación del MIP en el control del HLB | 116 |
| 5.7. Otras acciones para disminuir las enfermedades en los cítricos | 119 |
| 5.8. Conceptos epidemiológicos en el control del HLB | 119 |
| 5.9. Prevención del HLB en áreas libres | 121 |

VI.
MEDIOS DE DISEMINACIÓN DE
ALGUNAS ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS
125

VII.
PARCELAS DEMOSTRATIVAS MIP,
EXPERIENCIA EN HONDURAS
126

| | |
|--|-----|
| 7.1. Qué son las parcelas demostrativas experimentales | 126 |
| 7.2. Criterios para la selección de parcelas demostrativas | 126 |
| 7.3. Metodología de trabajo | 128 |
| 7.4. Estudio de la dinámica poblacional | 129 |

VIII.
GUÍA DE CAMPO PARA LA IDENTIFICACIÓN
DE síntomas de HLB Y OTRAS ENFERMEDADES
131

| | |
|--|-----|
| 8.1. Reconocimiento de síntomas de HLB en hojas y frutos de cítricos | 131 |
| 8.2. Reconocimiento del insecto vector del HLB, <i>Diaphorina citri</i> (Kuwayama) | 137 |
| 8.3. Reconocimiento de agentes de control biológico para <i>Diaphorina citri</i> | 139 |
| 8.4. Reconocimiento de otras enfermedades importantes en cítricos | 140 |

IX.
RECOMENDACIONES
148

BIBLIOGRAFÍA
149

I. IMPACTO ECONÓMICO DEL HLB SOBRE LOS CÍTRICOS EN LA REGIÓN DEL OIRSA

En los estados miembros del OIRSA los cítricos representan 703,900 hectáreas, equivalentes aproximadamente a 220 millones de árboles con una producción de 9 millones de toneladas. La actividad genera más de 866 millones de dólares (novena actividad agrícola más valorada de Centroamérica), con un rendimiento promedio de 14 toneladas métricas por hectárea. Un total de 129,191 productores son responsables por más de 355 mil puestos de trabajo (directos e indirectos). México es el quinto productor de cítricos a nivel mundial aportando más de 6 millones de toneladas. En Centroamérica la actividad está en manos de pequeños productores en un 71%.

El HLB se ha diseminado a ocho de nueve países de la Región del OIRSA en tres años (2008-2011). Actualmente se mantiene la misma cantidad de países infectados con HLB en la región (figura 1).

La economía de Belice depende en un 22% de los ingresos por las exportaciones de cítricos; sin embargo, en 2013 la producción cítrica decreció de US\$75 millones a US\$40 millones. A la vez, en República Dominicana se reportó para 2013 el 60% de reducción en la producción.

El estudio del impacto económico del HLB en México realizado por IICA-SAGARPA en 2012 presagia que se perderían 12.2 millones de jornales a tres años de establecido el patógeno y 19 millones a los cinco años. La materia prima para la industria se reduciría de 5.93 a 3.18 millones de toneladas de cítricos dulces (naranja, mandarina y toronja). La generación de divisas de los cítricos dulces dejaría de ingresar hasta por 106 millones de dólares y los cítricos agrios hasta por 51 millones, todos estos cálculos a 5 años de establecido el patógeno.



Figura 1. Diseminación de HLB en la Región OIRSA.

II. TRANSMISIÓN DE LA BACTERIA ASOCIADA AL HLB

Sólo existen dos formas de transmisión del HLB: a través del insecto vector y/o de yemas infectadas en el proceso del injerto (figuras 2, Jeffrey Lotz; y 3, Chrizz).

Cuando el árbol de cítrico presenta en sus hojas el moteado típico en forma generalizada es probable que la bacteria haya infectado la planta desde el vivero (transmitida por la yema infectada en el injerto). Por el contrario, si los síntomas del moteado no son generalizados en la planta, probablemente el insecto vector ha sido el transmisor de la bacteria ya estando la planta en el campo.

De igual forma, cuando en una plantación de cítricos los árboles enfermos están localizados en un sector de la plantación, es probable que la infección haya sido causada por el ingreso de los insectos vectores portadores de la bacteria. Cuando los árboles infectados están dispersos aleatoriamente en toda la plantación es muy probable que la bacteria viniera con las plantitas infectadas procedentes de un vivero.

La habilidad del insecto vector adulto para infectar una planta es de alrededor del 13%, razón por la cual se necesita una población alta de este insecto en su estado adulto para causar la infección.

En estudios realizados en Taiwán se demostró que de cada 100 psílicos adultos, solamente dos eran portadores de la bacteria *Candidatus Liberibacter* con capacidad de transmitir el HLB cuando son poblaciones que ingresan a un área. El psílido adquiere la bacteria *Candidatus Liberibacter* durante su desarrollo entre el tercero y el quinto estadio de ninfa; ésta se reproduce en su sistema digestivo, de tal manera que cuando llega a adulto es altamente portador de la bacteria.

Experimentalmente se ha demostrado que un tiempo de alimentación de 5-7 horas del psílido adulto es suficiente para adquirir y transmitir el patógeno. Así, el insecto puede transmitir la bacteria cuando se alimente



Figura 2. Adulto del insecto vector *Diaphorina citri*.



Figura 3. Injerto de yema en cítrico.

de una planta sana. En Taiwán, se tolera una población del psílido de 4 adultos por 10 plantas (ideal 1 adulto por 10 plantas).

En contraste, las ninfas del insecto vector por estar más tiempo (aproximadamente 15 días) alimentándose adheridas a los brotes de las plantas, son las más infectivas en la transmisión del HLB, principalmente en sus estados 4 y 5 (Fig. 4, David Hall).



Figura 4. Ninfas de *D. citri*. (Cortesía David Hall USDA).

Las ninfas de este vector son las que portan la mayor cantidad de bacterias, por lo que su capacidad de transmitir la infección es alta. La importancia de su control está asociada a su elevada efectividad en la transmisión de la bacteria. En las siguientes figuras se indica cómo entra la bacteria al cuerpo del insecto, por el canal alimenticio, cuando éste se alimenta de una planta infectada y señala cómo se reproduce la bacteria dentro del cuerpo del insecto (figuras 5, 6 y 7; Hung).

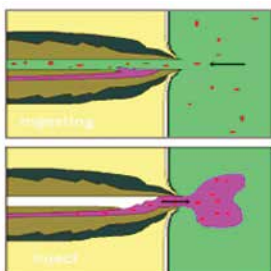


Figura 5. Alimentación y transmisión de la bacteria.

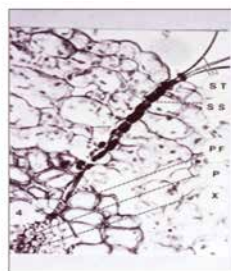


Figura 6. Reproducción de la bacteria.

En la figura 5 se muestra cómo el estilete del psílido penetra la epidermis del cítrico, alcanzando las células y los tejidos del floema. De esta manera succiona el alimento desde el floema adquiriendo las bacterias. De igual forma, cuando se alimente en otro árbol transmitirá las bacterias al floema completando el proceso de infección ya que las bacterias se encontrarán en las glándulas salivares del psílido, el que al alimentarse transmite a la planta las bacterias como lo muestran las figuras 6 y 7.

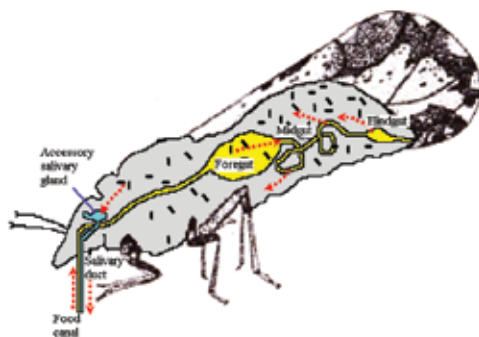
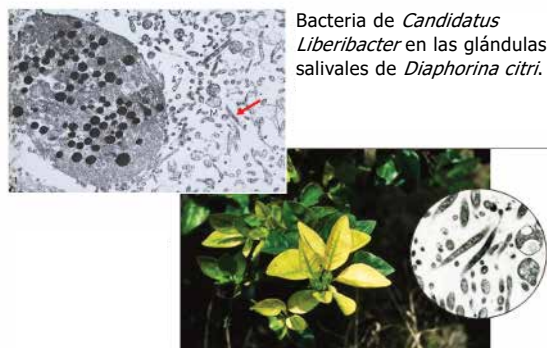


Figura 7. Mecanismo de infección de la bacteria en adultos de *D. citri*.

Las bacterias asociadas al HLB solamente se encuentran en el floema de las plantas, obstruyendo de esa manera los haces vasculares y afectando a la planta (figuras 8 [Hung] y 9 [Cmassengale]).



Bacteria de *Candidatus Liberibacter* en las glándulas salivales de *Diaphorina citri*.

Figura 8. Obstrucción de los haces vasculares por la bacteria *C. Liberibacter*.

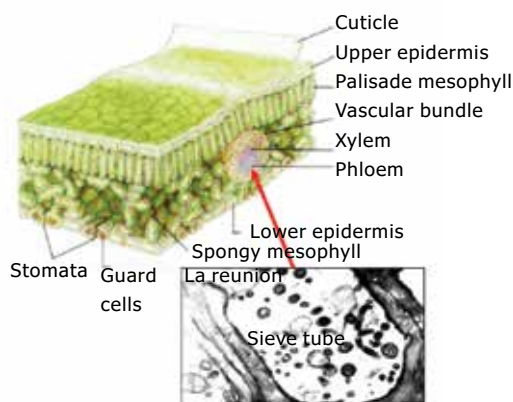


Figura 9. Bacterias de *Candidatus Liberibacter* en el floema de la hoja.

Los síntomas típicos del HLB son una clorosis en el árbol, un moteado asimétrico en las hojas y frutos deformes. La planta con HLB no produce frutos comerciales, por lo que se considera una muerte económica. Las plantas más jóvenes (2-5 años) son las más susceptibles: pueden llegar a morir y por lo tanto no llegar a producir frutos (figura 10, Hung).

En Taiwán, las plantas de cítricos se producen en viveros cubiertos (se excluye al insecto vector) y se llevan las plantas certificadas al campo previamente protegidas con un insecticida sistémico. De esta manera, si hay psílidos en el campo, estos mueren y no alcanzan a completar el ciclo para convertirse en psílidos infectivos.

Debido a la obstrucción causada por la acumulación de bacterias en los haces vasculares del floema en las plantas, el HLB también puede causar deficiencia de Zn. La deficiencia de Zn normal (sin HLB) debe darse en hojas nuevas, pero, si la deficiencia de Zn se presenta en hojas viejas, es muy probable que sea causada por el HLB; además, la deficiencia de Zn normal (sin HLB) debe ser generalizada en todo el árbol y no en forma sectorizada.



III. CONTROL DEL HLB SEGÚN LA INCIDENCIA DE LA INFECCIÓN

Para el control del HLB es fundamental realizar las tres siguientes acciones:

- 1) Eliminación de plantas enfermas cada año. En la época de la cosecha se deben identificar las plantas que muestren síntomas y eliminarlas una vez culminada la cosecha, debido a que en este período, la planta tiene su nivel de defensa más bajo y por lo tanto tiene una mayor manifestación de síntomas.
- 2) Control del psílido. Para reducir la diseminación del HLB por la dispersión del insecto vector portador de la bacteria a otras partes de la misma finca o a otras fincas, se debe controlar la población del psílido.
- 3) Producción de plantas sanas. Se debe sembrar plantas sanas provenientes de viveros certificados en ambiente protegido. Para la producción de plantas sanas en viveros cubiertos (que excluyan al insecto vector) refiérase al “Protocolo de producción de plantas sanas” de este mismo proyecto, que contiene las especificaciones de dichos viveros. Además, refiérase a la norma de certificación fitosanitaria de viveros de cítricos que ha sido armonizada por OIRSA y nacionalizada en cada país, mediante decretos o acuerdos ministeriales o presidenciales, según país.

El manejo integrado del HLB se debe implementar en fincas comerciales, traspatios y áreas abandonadas a corto plazo. A mediano plazo (aproximadamente tres años) se debe haber logrado la supresión efectiva del insecto vector (Gestión orchard) y la eliminación de las plantas infectadas, así como la siembra de nuevas plantaciones provenientes de viveros certificados. A largo plazo se establecerán áreas libres y de baja prevalencia del HLB.

La escuela de Taiwán se basa en el análisis y aplicación del control del HLB caso por caso (*case by case*), porque el manejo integrado del HLB depende de la edad de las plantas, la ubicación y topografía de la finca, la población del insecto vector, la incidencia del HLB, la dirección del viento, el manejo agronómico, la situación epidemiológica de la localidad y las condiciones agroecológicas en general. En este contexto, se ha dividido el tratamiento con base en tres escenarios básicos:

- 1) Infección del HLB es hasta 10% (baja incidencia);
- 2) Infección de hasta 30% (mediana incidencia);
- 3) Infección es mayor del 30% (alta incidencia).

Es importante también hacer el control del HLB en los árboles cítricos de traspatios, así como en fincas abandonadas.

A continuación, se presentan las recomendaciones para el control del HLB según estos tres escenarios básicos. Para determinar en cuál grado de infección se encuentra la finca utilice el protocolo de la técnica de diagnóstico preliminar yodo-almidón de este mismo proyecto, versión modificada por la Universidad de Taiwán (págs. 75-77). También puede ser utilizado el “Protocolo de diagnóstico para huanglongbing en hojas de cítricos” que forma parte de este *Compendium*.

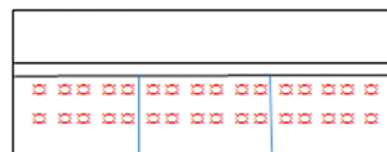
3.1. FINCAS CON BAJA INCIDENCIA DEL HLB (HASTA 10%)

- 1) Las fincas que tienen menos de 10% de plantas infectadas son categorizadas como áreas de baja incidencia. En este caso, se debe hacer un monitoreo minucioso y periódico para detectar plantas enfermas y eliminarlas rápidamente. Las plantas jóvenes que presenten síntomas de HLB, deben ser eliminadas en forma inmediata debido a su susceptibilidad.
- 2) Una vez eliminadas las plantas infectadas, se implementa un área buffer en la periferia de la finca para protegerla del ingreso de psílidos portadores de la bacteria, considerando principalmente la dirección predominante del viento. Debido a que el ciclo del insecto vector es de aproximadamente 28 días, la aplicación de insecticida debe ser mensual, tanto dentro de la finca como en el área buffer.
- 3) Podría utilizarse la técnica de endoterapia (inyección de antibiótico) en plantas adultas de alto valor económico.



3.2. FINCAS CON MEDIANA INCIDENCIA DEL HLB (HASTA 30%)

- 1) Si la incidencia del HLB en la finca es menor de 30% y el área infectada está localizada, se debe asperjar con insecticida el área infestada, para suprimir las poblaciones del psílido y de esta forma evitar la dispersión de la enfermedad a través de su vector al resto de la finca.
- 2) Utilizar al menos dos líneas de cítricos como área buffer, donde se harán aplicaciones de insecticida cada 15 días, para evitar la dispersión de los psílidos portadores de la bacteria al resto de la plantación.



- 3) En el resto de la finca se harán aplicaciones mensuales de insecticida.
- 4) La renovación de la plantación será por bloques (ver figura superior) y nunca con plantas aisladas, ya que la presión del inóculo es alta y las plantas jóvenes son más susceptibles al HLB porque tienen tejidos más jóvenes y más atractivos al insecto vector.

3.3. FINCAS CON ALTA INCIDENCIA DEL HLB (MÁS DEL 30%)

- 1) Si el HLB en la finca está ampliamente diseminado con una incidencia de más del 30% de las plantas, se recomienda la eliminación de la finca, debido a que evidentemente el 100% de las plantas están infectadas, aunque un 70% no presente síntomas, ya que se considera que por cada planta sintomática hay 3 que están infectadas, aunque sean asintomáticas. Al detectar un árbol infectado con la bacteria es probable que los 50 árboles que lo rodeen estén comprometidos o infectados con la enfermedad.
- 2) En este escenario se recomienda a los citricultores renovar toda la plantación. Esta renovación debe ser a favor del viento (no en contra) y si la renovación contempla colinas, es mejor comenzar la renovación por la parte baja de la colina y luego hacia arriba (por efecto del viento).
- 3) Mientras se elimina la plantación se recomienda liberar *Tamarixia radiata* (Waterston [1922]) para su establecimiento por inoculación.

Es importante tomar en cuenta situaciones especiales como las siguientes:

- 1) Si la finca tiene menos del 10% de infección, no se debe resembrar (para evitar tejidos jóvenes que son altamente susceptibles) y se debe aplicar insecticida mensualmente.
- 2) En forma general, si la pérdida de plantas en la finca es alta (árboles jóvenes menores de 10 años), la rentabilidad de la plantación es muy baja.
- 3) Cuando la pérdida de plantas en la finca no es muy alta (árboles mayores de 10 años), la plantación todavía es económicamente rentable y justifica su mantenimiento, pero se debe controlar al insecto vector, eliminar las plantas enfermas, y no se debe sembrar plantas nuevas.

3.4. FINCAS ABANDONADAS

Las plantaciones abandonadas son focos de infestación del psílido e inóculo de la bacteria. En Taiwán se usa *Murraya paniculata* (limonaria, mirto o jazmín) para atraer las poblaciones del vector y eliminarlas allí o la planta puede ser usada para la cría de los parasitoides (*Tamarixia radiata*).

Las fincas abandonadas ejercen un impacto negativo debido a la presencia del insecto que porta la bacteria ya que éste se está criando en plantas infectadas. En Taiwán se recomienda la utilización de una planta de *Murraya paniculata* de 6 años por ha, esta planta cuesta aproximadamente \$ 25/planta, costo que se contempla en las actividades de control. Se reporta que en un 92.5% es eficiente la *Murraya paniculata* para la reproducción del insecto benéfico.

En Taiwán, se ha comprobado que en la *Murraya paniculata* no se desarrolla la bacteria del HLB, por lo cual es utilizada como aliada en el manejo integrado del HLB.

3.5. TRASPATIOS

El programa de control del HLB debe considerar la incidencia de la enfermedad en los traspacios, porque normalmente los psílidos en traspacios no son controlados con insecticidas, y si hay plantas infectadas con el HLB estos insectos vectores pueden ser una amenaza para las plantaciones comerciales de cítricos (Fig. 11). Los cítricos de traspatio deben ser considerados para recibir liberaciones de *Tamarixia radiata* cuando el vector se encuentre en la etapa biológica de ninfa y preferiblemente la liberación debe hacerse en la *Murraya paniculata*. Por este motivo, en Taiwán se recomienda mantener o sembrar limonaria en las áreas urbanas.

Las rutas de vigilancia deben incluir traspacios tanto para el muestreo de psílidos para conocer si éstos portan la bacteria, como también para el mues-



Figura 11. Árboles de traspatio en Honduras.

treo del HLB en las plantas cítricas. Los cítricos de traspatio infectados con el HLB deben ser eliminados. Una forma correcta deberá en primer lugar hacer una aspersión con un insecticida de contacto que cubra todo el árbol; después de 5-10 minutos proceder a cortar el árbol, y por último en el tronco expuesto marcar una “X” y sobre ella aplicar un herbicida (por ej. glifosato) para prevenir futuros rebrotes (Fig. 12).



Figura 12. Eliminación de árbol infectado con HLB en traspatio. A: corte del árbol; B: aplicación de herbicida a la base del tronco para prevenir rebrote.

IV. TRATAMIENTO ALTERNATIVO CON ENDOTERAPIA

Esta tecnología, por el costo del tratamiento, se puede aplicar a árboles que fluctúan entre 5 y 7 años. La técnica consiste en la aplicación por medio de inyección de un antibiótico como la tetraciclina a los árboles infectados, cada tres meses. Antes del tratamiento de la inyección se deben podar las ramas, ramitas internas y chupones con el objetivo de dejar limpio el árbol para facilitar el crecimiento.

El momento para la inyección será después de la cosecha que es la época de brotación, luego se deben esperar 3-4 meses para aplicar la segunda inyección. Después una inyección por año es suficiente siempre aplicándola después de cada cosecha.



Figura 13. Equipo y materiales necesarios en el tratamiento con endoterapia.

Tratamiento: Utilice 1 botella plástica de 2 litros (envase de gaseosa), agregar 1 g de tetraciclina en un litro de agua, inyectar a 50 libras de presión por pulgada cuadrada. La perforación en el árbol para la inyección debe tener una profundidad de 2 a 4 cm, hecha con broca de 8 mm de diámetro. Para la evaluación de los siguientes tratamientos se considerarán las diferentes dosis y las diferentes posiciones en el árbol (los inciso 1, 2, 3 son para seleccionar el sitio más idóneo en el árbol donde se aplicará la inyección). Fig. 13 y 14.

- 1) Hacer la mezcla de 1 g de tetraciclina /1 litro de agua, luego aplicar la inyección en el tronco (50 centímetros por encima del suelo).
- 2) Hacer la mezcla de 1 g de tetraciclina /1 litro de agua, luego aplicar la inyección a la rama abajo de la bifurcación (rama principal).
- 3) Hacer la mezcla de 1 g de tetraciclina /1 litro de agua, luego aplicar la inyección a la raíz lateral principal.

- 4) Hacer la mezcla de 1 gramo de tetraciclina /1.5 litros de agua, luego aplicar la inyección en el tronco (50 centímetros por encima del suelo).
- 5) Hacer la mezcla de 1 g de tetraciclina /1.5 litros de agua, luego aplicar la inyección a la rama abajo de la bifurcación (rama principal).
- 6) Hacer la mezcla de 1 g de tetraciclina /1.5 litros de agua, luego aplicar la inyección a la raíz lateral principal con las mejores características.

Lo anterior es para comparar el efecto de la concentración del antibiótico en el sitio de inyección para referencia futura y poder así recomendar el tratamiento más efectivo. Los resultados del tratamiento con tetraciclina pueden verse en menos de 3 años. Fig. 15.



Figura 14. Diferentes posiciones en el árbol para seleccionar el sitio donde aplicar la inyección.

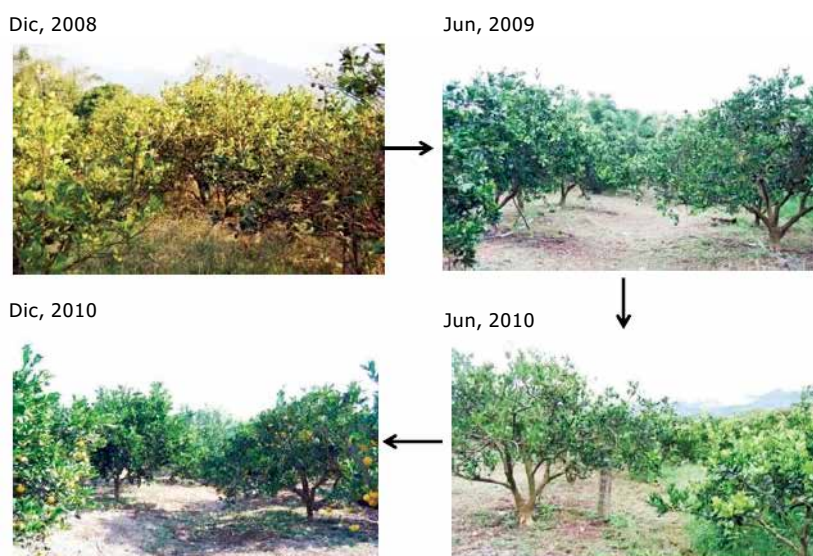


Figura 15. Resultado del tratamiento alternativo con endoterapia.

V. BASES DE LA METODOLOGÍA MIP PARA EL CONTROL DEL HLB

5.1. CARACTERÍSTICAS DE DISPERSIÓN DEL PSÍLIDO

El ciclo biológico del psílido vector es aproximadamente de 20 a 22 días (huevo a adulto) a 25°C (Fig. 16). En este ciclo biológico se basa el control mensual con insecticida, ya que si el agricultor no lleva estudios de la dinámica poblacional del insecto vector es más práctico para él y para el programa de control que lo lleve mensualmente.

La técnica se basa en que el psílido no se dispersa a mucha distancia (la dispersión es primordialmente de planta a planta) si tiene las condiciones (alimentos y brotes tiernos). El insecto vector se dispersa cuando las plantas son removidas o con la ayuda del viento; por esta razón, es muy importante considerar la dirección del viento en el control del HLB.

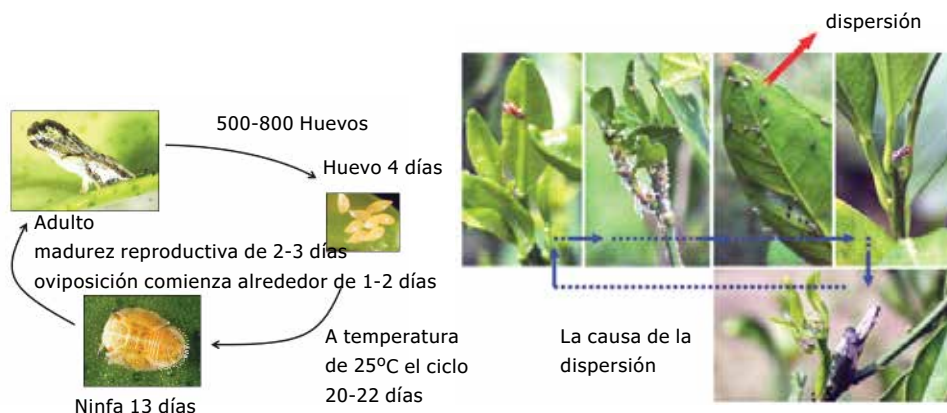


Figura 16. Ciclo biológico y dispersión del insecto vector *Diaphorina citri*.

5.2. MANEJO INTEGRADO DEL HLB

El manejo integrado del HLB incluye varias medidas fitosanitarias que buscan suprimir las poblaciones del insecto vector y reducir el inóculo de la bacteria, preservando el ambiente y utilizando el control químico del insecto vector, cuando se hace necesario; utilizando, en la medida de lo posible, insecticidas de baja toxicidad y de manera respetuosa con el ambiente.

El manejo integrado del HLB se basa en el conocimiento profundo del insecto vector *Diaphorina citri* y su muestreo. El muestreo del insecto vector

del HLB está documentado en el protocolo de monitoreo y muestreo realizado por el Dr. Cheslavo Korytkowski, dentro del proyecto FAO-OIRSA. Tómese como referencia el protocolo de monitoreo del insecto vector con la modalidad del uso de trampas amarillas pegantes, Smartphone y código QR tal como está descrito en el protocolo del sistema de monitoreo de *Diaphorina* (SIMDIA).

Otra referencia es el protocolo sobre cómo tomar una muestra (tejido vegetal de cítricos o insecto vector), su envío al laboratorio y su diagnóstico por la técnica molecular de PCR que se encuentra en el protocolo desarrollado por la Ing. Iobana Alanis por el proyecto FAO-OIRSA. Todos estos protocolos deben ser tomados en cuenta como guías para el manejo integrado del HLB y complementos de este protocolo.

El modelo del MIP para el control del HLB como se realiza en Taiwán se está implementando en parcelas demostrativas en los países de la región del OIRSA, a través de este proyecto. En estas parcelas MIP se están evaluando algunas variantes no incluidas en los protocolos de monitoreo y toma de muestras antes mencionados. Por ejemplo, la forma de colocar las trampas amarillas pegantes.

Según la escuela taiwanesa, las trampas no deben estar colocadas con la superficie amarilla engomada hacia el sol, sino con la superficie amarilla dirigida hacia el viento, porque los insectos vectores son “impulsados” por el viento. En la región del OIRSA se están evaluando ambas modalidades. También



Figura 17. Muestreo del insecto vector del HLB. A y B: colocación de trampa horizontal; C y D: colocación y georreferenciación trampa vertical.

se colocan las trampas amarillas con la superficie hacia arriba (horizontal), en un soporte de aproximadamente 1.5 metros de altura y de la forma tradicional, vertical (Fig. 17).

El MIP toma en consideración la vigilancia o inspección, la eliminación del inóculo de la bacteria a través de la eliminación de las plantas enfermas, el control químico del insecto vector y la siembra de plantas sanas certificadas provenientes de un vivero cubierto.

En el MIP es fundamental implementar un programa de certificación de viveros de cítricos. En la región del OIRSA se ha hecho un esfuerzo para armonizar y consensuar un programa de certificación fitosanitaria de los viveros de cítricos, mismo que ha sido nacionalizado en los países. Aplicando estas normativas se debe disminuir drásticamente el uso de yemas infectadas del campo y se debe incrementar el uso de plantas certificadas producidas en un ambiente protegido y que permitan plantas sanas libres del HLB y de otras enfermedades transmisibles por injertos (ejemplo: leprosis, tristeza, cachesia, exocortis, psorosis, entre otras).

La certificación de viveros de cítricos será la base de un cambio determinante en la citricultura de la región del OIRSA y en la implementación del manejo integrado del HLB.



Figura 18. Método para controlar el HLB en la región del OIRSA; A y B: Inspección; C: Eliminación de plantas con síntomas; D y E: Control del vector; F y G: Siembra de plantas sanas; H e I: Participación de todos los involucrados.

5.3. CONTROL BIOLÓGICO CON *TAMARIXIA RADIATA*

El psílido de los cítricos para reproducirse necesita brotes nuevos y a mayor cantidad de brotes nuevos, mayor reproducción de psílicos. El control biológico del psílido en Taiwán es realizado con el uso de *Tamarixia radiata*, micro himenóptero específico para esta especie.

Tamarixia radiata es un parasitoide específico de *Diaphorina citri*, cuando la población del psílido se incrementa, la cantidad de parasitoides también aumenta. *Tamarixia radiata* no puede controlar totalmente la población de psílicos por sí misma, por lo tanto, es un complemento del control y se debe aplicar control químico para suprimir la población de los insectos vectores. *Tamarixia radiata* se libera como complemento al con-



Figura 19. Establecimiento de pie de cría *T. radiata* en Taiwán

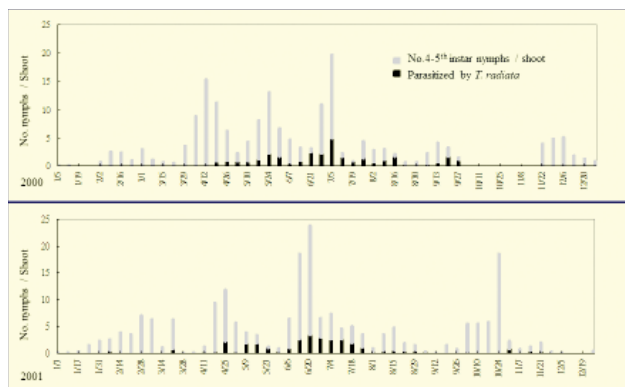


Figura 20. Taiwán: sitios de liberaciones por inoculación de *Tamarixia radiata*.

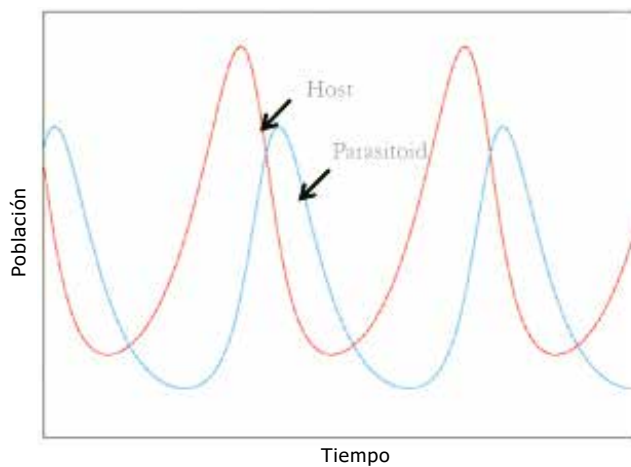
trol químico del insecto vector preferiblemente en *Murraya paniculata*, en fincas abandonadas y árboles de traspatio. Este insecto benéfico se establece naturalmente como controlador biológico.

En Taiwán, hace muchísimos años, se estableció un pequeño laboratorio de cría de *Tamarixia radiata* que implementó la liberación por inoculación (Fig. 19). Como se puede apreciar en las fotografías, el primer año la producción de 20,000 parasitoides resultó suficiente para el establecimiento de la especie en toda la zona cítrica de Taiwán. En los años posteriores esta inversión fue menor, al contar ya con la infraestructura para dicha actividad.

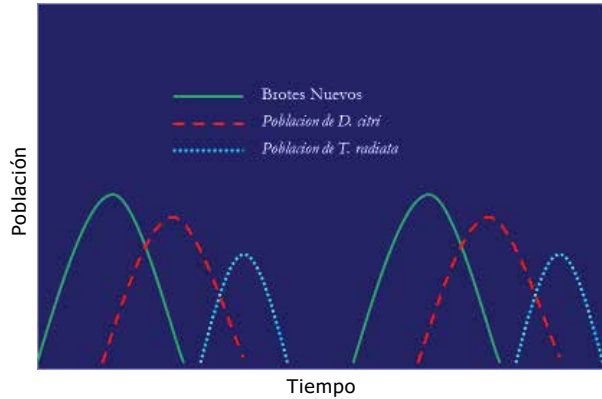
Los puntos del mapa de Taiwán de la fig. 20 señalan los sitios en que se hicieron las liberaciones, la inoculación fue de 10-20 *Tamarixia radiata* por km² y se realizó hace muchísimos años y este insecto benéfico se estableció. Ya no son necesarias las liberaciones porque *Diaphorina citri*



Gráfica 1. Fluctuación semanal de *D. citri* y parasitoidismo causado por *Tamarixia radiata* en relación con brotes en 50 árboles de cítricos en Taiwán (Hung).



Gráfica 2. Relación directa entre *Diaphorina citri* y *Tamarixia radiata* en Taiwán (Hung).



Gráfica 3. Relación directa entre *Diaphorina citri* y *Tamarixia radiata* con respecto a los brotes nuevos en la fenología de los cítricos en Taiwán (Hung).

se ha establecido permanentemente en todo el país. Taiwán tiene una extensión de 36,000 km².

Tamarixia radiata tiene ciclo de vida corta (varios ciclos al año) y su vida de adulto es más larga que su estado inmaduro. El ciclo biológico de *Tamarixia radiata* es de 11 días de huevo a adulto y de 21 días como adulto. *Tamarixia radiata* no tiene hiperparásito (organismo que la controle a ella) en Taiwán. El costo de mano de obra para la implementación del control biológico con *Tamarixia radiata* es bajo y es compatible con el control MIP.

Es importante recordar que las liberaciones de este controlador biológico deben hacerse cuando existan en el campo ninfas del psílido vector ya que esa es la etapa biológica que es atacada por el insecto benéfico. De no hacerlo así, como es un parasitoide específico no sobrevive. En la fig. 21 (Gandarilla, 2012) se pueden observar los orificios perfectamente redondos que deja *Tamarixia radiata* cuando emerge el adulto (ver círculo rojo superior). El color oscuro en el extremo del abdomen de la ninfa del insecto vector *Diaphorina citri* es un signo de que el psílido ha sido parasitado (ver círculo rojo inferior).

El control biológico en Taiwán se hizo en forma inoculativa hace muchísimos años. El control biológico por inoculación ocurre cuando se liberan pocas cantidades de parejas del insecto benéfico y éste se establece con el tiempo. Es así como el control biológico de la plaga se logra con las generaciones que surgen de esos insectos benéficos liberados.

Es importante recordar que la bacteria asociada al HLB es transmitida por el insecto vector (*Diaphorina citri*); por lo tanto, el control biológico no debe ser la estrategia principal en zonas con presencia de HLB, dado que su efectividad no es muy alta; existiendo una posibilidad real de que insectos vectores escapen de este control biológico y, al ser portadores de la bacteria, diseminan la enfermedad. El control biológico normalmente alcanza el 30% de la

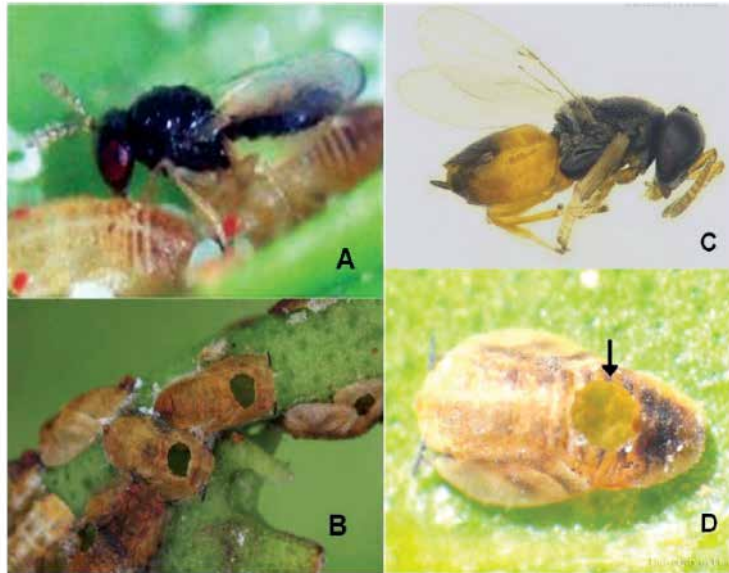


Figura 21. Parasitoidismo de *Tamarixia radiata*. A: Adulto de *T. radiata*; B: Agujeros de emergencia de adultos de *T. radiata* a partir de ninfas momificadas de *D. citri* (tomado: <http://www.forestryimages.org>); C: *Diaphorencyrtus aligarhensis*; D: Ninfa de *D. Citri* momificada con un agujero de emergencia en la región abdominal característico de *D. aligarhensis* (tomado: < [http:// entnemdept.ufl.edu](http://entnemdept.ufl.edu)>).

población del insecto vector; es decir que el 70% restante, de portar la bacteria, propaga la enfermedad. Por ello, debe comprenderse que en el programa MIP el control biológico para el HLB se utiliza como un complemento del control químico del vector.

El control biológico tiene su aplicabilidad en los trapatios, donde normalmente no se aplican insecticidas y no es factible en centros urbanos, así como en fincas citrícolas abandonadas. En las áreas comerciales citrícolas esta medida de control se dificulta debido al uso de insecticidas. El control biológico con *Tamarixia radiata*, en áreas comerciales, se deberá complementar con el control químico, con liberaciones controladas que no tienen posibilidad de establecerse por el uso de insecticidas. Por consiguiente, se recomienda el uso de control biológico en las zonas periféricas urbanas o semiurbanas alrededor de las fincas comerciales de cítricos y en esta actividad es muy importante la participación y cooperación activa de las empresas citrícolas comerciales privadas.

Un método que es más compatible con el control del HLB en las áreas comerciales citrícolas es el uso de hongos entomopatógenos, ya que es muy escaso el uso de fungicidas en plantaciones comerciales de cítricos (fig. 22, *Guía de síntomas*, OIRSA, ver páginas ??-?? de este *Compendio*).

Los géneros de hongos entomopatógenos más efectivos son *Isaria* y *Metarrhizium*, de los cuales estarán siendo probadas cuatro cepas en la región del



Figura 22. Hongos en el control biológico.



Figura 23. Hongos en el control biológico.

OIRSA, en articulación con entidades de investigación y empresas privadas citrícolas, gracias a la colaboración del gobierno de México a través de Senasica/Sagarpa (fig. 23, *Guía de síntomas*, OIRSA).

5.4. EL CONTROL QUÍMICO DEL INSECTO VECTOR

El uso de insecticidas para controlar el psílido vector ha sido un componente importante de las estrategias de manejo del HLB. Al bajar la incidencia de las poblaciones de psílicos mediante la aplicación de insecticidas, se reduce la diseminación de la enfermedad, por lo que es de importancia considerar la rotación de las diferentes moléculas de insecticida sin resistencia cruzada entre ellas, para evitar que se desarrolle resistencia a estos productos.

Control con insecticidas en árboles jóvenes

- 1) Los árboles jóvenes son más susceptibles al HLB ya que producen múltiples brotes durante todo el año y por eso están en mayor riesgo de infección

- de HLB que los árboles adultos, debido a la atracción de los psílicos por el nuevo brote.
- 2) Los árboles jóvenes deben llegar protegidos al campo con un insecticida sistémico y deben seguir siendo protegidos durante aproximadamente cuatro años.
 - 3) Es preferible usar insecticidas sistémicos debido a que tienen menor impacto sobre insectos benéficos y tienen control sobre las ninfas.
 - 4) Hay tres ingredientes activos de insecticidas recomendados (imidacloprid, tiametoxam y clotianidina) y disponibles para el control de psílicos en los árboles jóvenes. La rotación entre ellos no debe ser una estrategia para evitar el desarrollo de resistencia, ya que pertenecen a la misma familia de los neonicotinoides.

En el caso de Honduras, en la actualidad se están evaluando seis fincas e igual número de tratamientos, considerando el tiempo entre una aplicación y otra, para determinar en un año la cantidad de aplicaciones más efectivas y económicas en el control de *Diaphorina citri*.

Se están contabilizando las poblaciones de *Diaphorina citri* un día antes de cada aplicación de insecticida, para lo cual se han seleccionado y georreferenciado 20 árboles con una edad aproximada de 1 año, por cada finca (se consideran cinco árboles por cada punto cardinal).

Tratamientos que se están evaluando:

- 1) Aplicaciones de insecticidas con base en las poblaciones de *D. citri* capturadas al año (enero a diciembre).
- 2) Ocho aplicaciones de insecticida de manera mensual (febrero a septiembre), se eligen estos meses porque enero, octubre, noviembre y diciembre son lluviosos.
- 3) Seis aplicaciones de insecticida al año (enero, marzo, mayo, julio, septiembre y noviembre).
- 4) Cuatro aplicaciones de insecticida al año (marzo, mayo, julio y septiembre).
- 5) Dos aplicaciones de insecticida al año (febrero y julio).
- 6) Dos aplicaciones de insecticida al año (marzo y agosto).

Control con insecticida en plantas que poseen la bacteria

- 1) Las aspersiones de insecticidas foliares son más eficaces cuando se utilizan para el control de psílicos adultos.
- 2) Insecticidas (clorpirifos, dimethoato, tiametoxam, imidacloprid) se consideran eficaces para el control de los psílicos. Aspersión coordinada por la comisión técnica en fincas comerciales.



Figura 24. Aspersión de insecticida a fincas de citricultores medianos.



Figura 25. Aspersión de insecticida a fincas de citricultores pequeños.

Estrategias de control en psílicos

Se recomienda a los pequeños citricultores calendarizar las aplicaciones mensualmente. Los grandes citricultores deben utilizar principios bioecológicos y aplicar cuando las poblaciones del insecto vector alcancen una población mayor de 1 adulto por cada 10 plantas.

1) Pequeños citricultores.

- Debido a la falta de conocimiento de los pequeños productores en cuanto a los psílicos, las aplicaciones de insecticidas se utilizan como métodos de prevención y son mensuales ya que el ciclo de vida de *Diaphorina citri* es al menos de 20 a 22 días, por lo cual, se debe asperjar una vez al mes para evitar la diseminación del HLB en la finca.
- El control del insecto vector debe realizarse en el momento de las principales brotaciones del cultivo y se recomienda, que debido al ciclo biológico del insecto, se contemplen al menos ocho aspersiones al año. Para obtener mejores resultados, este control debe incluir la eliminación de las plantas infectadas. Es importante señalar, que se debe llevar a cabo una vigilancia constante de otras plagas de importancia económica y aprovechar estas aplicaciones para su control.
- El psílido puede ser controlado fácilmente con cualquier insecticida ya que es muy susceptible a los mismos. Sin embargo, se recomienda la rotación para evitar el desarrollo de resistencia.

2) Grandes citricultores.

- Los métodos de control de HLB deben implementarse conociendo la biología y comportamiento del HLB y su vector, asignando personal técnico especializado para analizar e implementar programas fitosanitarios.

- Se deben considerar los períodos de infección de HLB, la dinámica poblacional del psílido de los cítricos y las épocas de migración de psílicos portadores de la bacteria.
- El conocimiento de las épocas de migración de psílicos portadores de la bacteria lleva consigo la disminución de las aplicaciones de insecticida para su control (2 a 3 veces menos).



Figura 26. Finca de limón persa en el municipio de San Esteban, Olancho, Honduras.

5.5.

EL USO DE LA *MURRAYA PANICULATA* EN EL CONTROL DEL HLB

En Taiwán se ha investigado que en la *Murraya paniculata* (mirto, jazmín o limonaria, fig. 27), no prospera la bacteria aunque es altamente atractiva para el insecto vector *Diaphorina citri*. En el MIP del HLB se recomienda la promoción de la cría de *Tamarixia radiata* en *Murraya paniculata*, porque esta planta es capaz de cargar altas poblaciones del vector y por ello ser efectiva para este propósito (puede producir de 4 a 7 *Tamarixia radiata* por cada 10 cm de la planta).



Figura 27. *Murraya paniculata*.

La limonaria no es atacada por ningún otro insecto por lo que el psílido en ella no tiene competencia (recurso alimenticio y sustrato para la reproducción), tampoco se usan insecticidas en esta planta. Por otro lado, la planta tiene brotaciones durante todo el año, lo que agrega un elemento más de utilidad de la limonaria como una planta ideal para la cría de *Tamarixia radiata* en *Diaphorina citri*. De esta manera la limonaria puede actuar como una planta trampa (para controlar con insecticidas al insecto vector) y como una planta que actúa como “laboratorio de cría natural” para la reproducción del controlador biológico *Tamarixia radiata*.

En Taiwán la limonaria se utiliza para recibir las liberaciones de *Tamarixia radiata* en áreas urbanas. En fincas abandonadas, se siembra una planta de *Murraya paniculata* de aproximadamente un metro de altura, por cada hectárea para promover la cría del insecto benéfico. También se utiliza como planta trampa para eliminar el psílido cuando las poblaciones alcanzan niveles de riesgo.

La *Murraya paniculata* se utiliza como “planta de cría” del insecto benéfico en Taiwán, ya que en dicha planta convergen los dos insectos *Diaphorina citri* y *Tamarixia radiata*, insecto vector del HLB y controlador biológico de este, respectivamente. La tecnología taiwanesa recomienda no podar mucho a la *Murraya paniculata*, para que no se produzca más cantidad de *Diaphorina citri* de la que puede controlar la *Tamarixia radiata*.

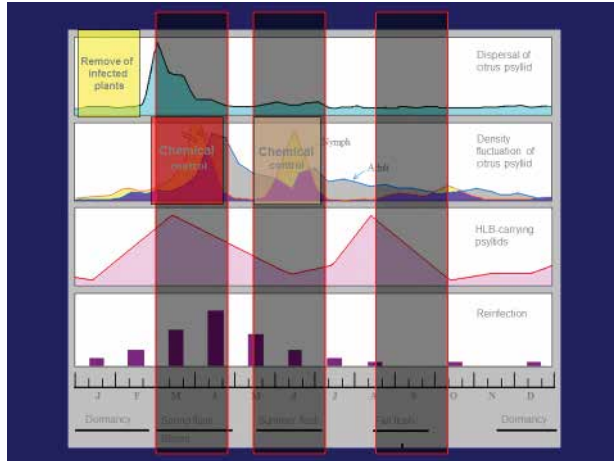
5.6. ESTUDIOS ECOLÓGICOS PARA LA APLICACIÓN DEL MIP EN EL CONTROL DEL HLB

El período de brotes de yemas nuevas en el cultivo de cítricos ayuda a la diseminación de la bacteria asociada al HLB. El insecto vector está vinculado al tejido meristemático joven en crecimiento de los brotes tiernos de la planta, debido a que es en los brotes donde se alimenta y cría *Diaphorina citri*. La estrategia de control del HLB depende en gran manera de los siguientes estudios epidemiológicos, básicos que deben hacerse bajo las condiciones de la Región del OIRSA.

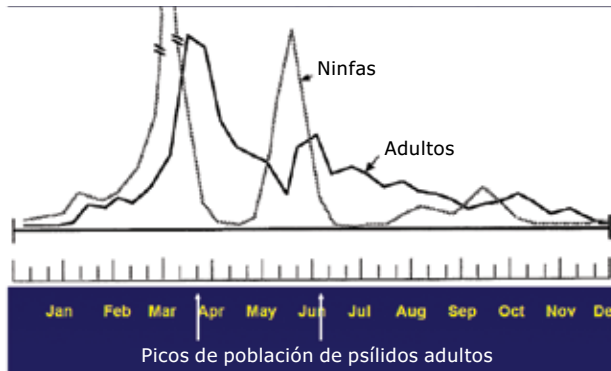
- 1) Dinámica poblacional del psílido;
- 2) Época de dispersión y migración de los psílicos;
- 3) Época en que los psílicos portan la bacteria.

En Taiwán, estos estudios determinan el momento preciso y asertivo para el control del HLB, tal como se puede apreciar en la gráfica 4 (Hung).

La gráfica 4 señala la época del año en que los insectos vectores se dispersan. La gráfica 5 muestra la fluctuación de la densidad poblacional



Gráfica 4. Estudios epidemiológicos llevados a cabo por la Universidad de Taiwán son la base para el control exitoso del HLB en Taiwán.



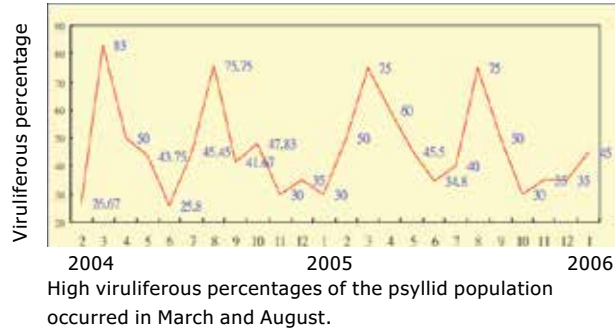
Gráfica 5. Dinámica estacional de la población del psílido de los cítricos (2006).

de los insectos vectores en sus etapas biológicas de ninfas y adultos, así como el momento en que se realiza la aplicación de insecticida para su control.

La gráfica 6 muestra las épocas en que los insectos vectores están portando la bacteria.

En el MIP es básico identificar la dinámica poblacional del insecto vector del HLB durante todo el año, porque esa información permite al productor controlar las ninfas para bajar la cantidad de adultos o suprimir los adultos cuando las poblaciones alcanzan cantidades de alto riesgo. Es asertivo el control de la población de psílicos con base en la dinámica poblacional del insecto vector.

Es importante determinar en qué épocas del año los psílicos son más portadores de bacterias porque entonces serían más efectivos para transmitir la bacteria asociada al HLB y hay que controlarlos con insecticida. Para



Gráfica 6. Dinámica estacional y porcentaje de población de psílicos virulentos (portadores de la bacteria, Hung).

ello hay que monitorear el insecto vector. Por ejemplo, la gráfica 6 (Hung) muestra que en Taiwán hay épocas en que el porcentaje de la población del psílido llevando consigo la bacteria (portador) alcanza 83% y la mínima 25.8%

En Taiwán, después de las temperaturas bajas y cuando inician las temperaturas altas, las concentraciones de la bacteria *Candidatus Liberibacter* se incrementan dentro del árbol, situación que se aprovecha para la detección de la enfermedad en el campo ya que los síntomas se hacen más evidentes, porque inicia un periodo masivo de brotación.

Estos estudios existen en Taiwán y deben ser llevados a cabo localmente bajo las condiciones de la citricultura de los países de la región del OIRSA. Para ello, se debe involucrar a institutos de investigación y estudiantes de universidades locales en los países, quienes tomarán parte en las actividades a realizarse en las parcelas demostrativas del MIP de este proyecto, ya que es la base fundamental del manejo integrado del HLB. Por medio de las parcelas demostrativas que por medio de este proyecto se están implementando, en los países se pueden ir obteniendo los datos que expresan las tres gráficas taiwanesas en los párrafos precedentes.

Estos datos permitirán ser asertivos en los momentos oportunos en que se deben hacer los controles del HLB lo cual implica la optimización de los recursos técnicos y económicos garantizando el éxito del manejo integrado del HLB, bajo las condiciones de la región del OIRSA.

Por el momento, y mientras no se tengan estos datos, la supresión del insecto vector debe hacerse mensualmente, con base en la biología del insecto vector, dato que sí se conoce en los países de la región del OIRSA.

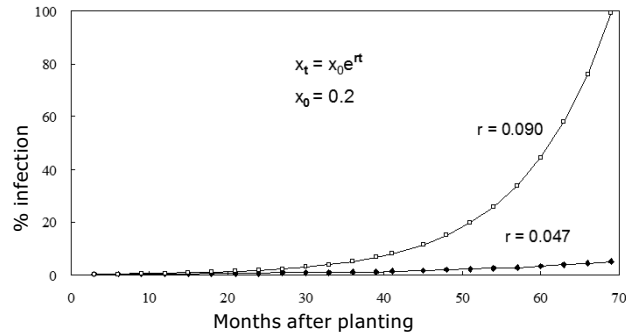
5.7. OTRAS ACCIONES PARA DISMINUIR LAS ENFERMEDADES EN LOS CÍTRICOS

- 1) **Evitar la entrada de plagas en general:**
 - Elección del lugar de una plantación en un área local.
 - Siembra de plantas sanas.
 - Modificación de las prácticas culturales.
- 2) **Exclusión de plagas en general:**
 - Inspección y certificación.
 - Exclusión o restricción fitosanitaria.
 - Eliminación de insectos y ácaros vectores.
- 3) **Erradicación de patógenos:**
 - Eliminación y destrucción de plantas susceptibles o partes enfermas de las plantas:
 - El descarte o eliminación de hospedantes alternativos.
 - Saneamiento (limpieza de finca abandonada).
 - Los tratamientos térmicos y químicos aplicados a material de plantación.
- 4) **Protección de la planta:**
 - Proteger las variedades y yemas a utilizar.
 - El control de los insectos y ácaros vectores de patógenos.
 - Modificación del entorno.
 - Modificación de la nutrición.
- 5) **Mejorar la resistencia de la planta:**
 - Mejoramiento a través de una adecuada fertilización y control del pH del suelo.

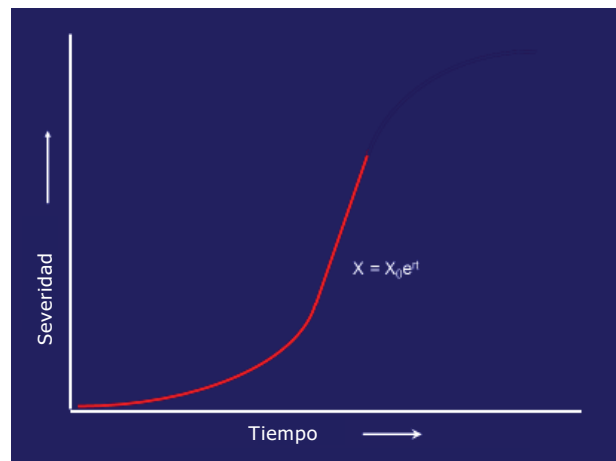
5.8. CONCEPTOS EPIDEMIOLÓGICOS EN EL CONTROL DEL HLB

Es sumamente necesario romper el ciclo de asociación entre la bacteria y el insecto vector del HLB.

Las gráficas 7 y 8 muestran las curvas del porcentaje de infección en la zona asperjada con insecticida y en la zona sin asperjar, mostrando la severidad de la enfermedad a través del tiempo. Los efectos de la tasa de infección (r) entre ambas son notables: en la zona asperjada es de 0.047, mientras en la no asperjada es de 0.090 (Hung). Cuando el psílido tiene poblaciones altas y tenemos plantas con bacterias, las tasas de infección se incrementan sustancialmente.



Gráfica 7. Tasa de infección de la enfermedad HLB.

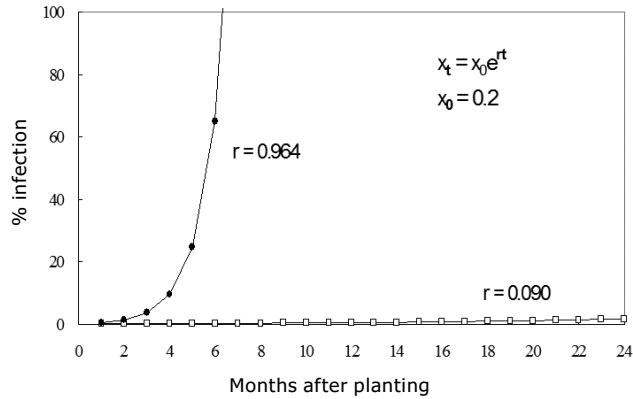


Gráfica 8. Evolución en el tiempo de la situación epidemiológica de HLB.

La planta de cítrico debe ser tratada con un insecticida sistémico antes de salir del vivero cubierto. La gráfica muestra que ésta debe seguir protegida en los próximos años ya que las plantas jóvenes son más susceptibles a la infección del HLB.

La enfermedad va progresando en forma exponencial en plantas jóvenes, a medida que transcurre el tiempo (gráfica 9).

El progreso de la enfermedad HLB en áreas infectadas es intenso en plantas muy jóvenes y en áreas de siembras nuevas, porque se encuentran en un periodo de crecimiento vegetativo y brotación frecuentes que son las condiciones ideales para el establecimiento de la *Diaphorina citri*. Si las mismas se encuentran cerca de plantaciones adultas con incidencia de HLB, debe realizarse un manejo químico con mayor frecuencia. Si estas plantaciones se han establecido en áreas donde se han eliminado árboles positivos a HLB igual debe existir un control con un herbicida sistémico no selectivo, por ejemplo uno con base en glifosato sobre la corteza del tronco para que no rebrote.



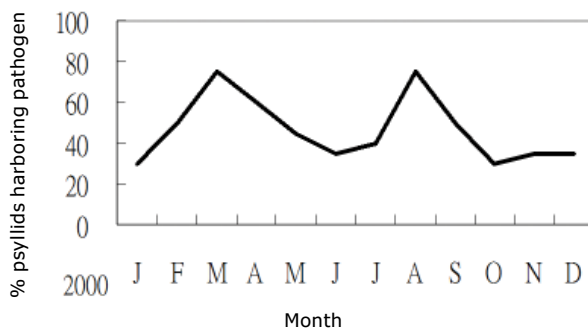
Gráfica 9. Tasa de infección de la enfermedad HLB.

5.9. PREVENCIÓN DEL HLB EN ÁREAS LIBRES

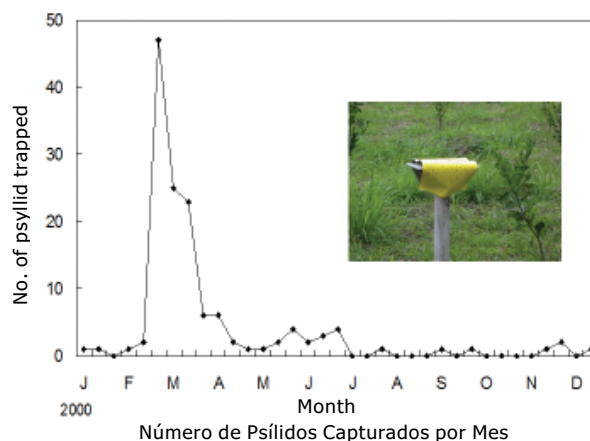
A diferencia de otras enfermedades cuyo control se puede conseguir con el uso de patrones y variedades resistentes disponibles, las plantas infectadas por el HLB no son económicamente tratables, por lo que la prevención cobra mucha importancia en las áreas libres o países libres del HLB. Los dos métodos preventivos que se deben utilizar son: la siembra de plantas sanas, y evitar la transmisión de la enfermedad por el psílido.

Eliminación de fincas cítricas abandonadas

En las fincas abandonadas el cultivo se convierte en un centro de inoculación para la bacteria y para el psílido y para otras plagas. Cuando los insectos vectores del HLB alcanzan altas poblaciones tienden a emigrar a otras fincas en busca de brotes nuevos para alimentarse y reproducirse; así, las fincas más cercanas son las más afectadas.



Gráfica 10. Época del año donde hay mayor incidencia de psílido en fincas abandonadas (Hung).



Gráfica 11. Incidencia de psílido en fincas abandonadas (Hung).

Esta figura muestra que en fincas abandonadas se deben colocar trampas pegajosas amarillas y la revisión debe efectuarse cada diez días para conocer la población existente (Hung).



Figura 28. Dispersión del psílido entre fincas, aca-reado por el viento (Hung).

La fig. 28 muestra cómo se dispersan el psílido y la bacteria, de una finca a otra, favorecidos por el viento (Hung).

La fig. 29 muestra la reducción del psílido cuando se realiza control de árboles infectados con HLB en la finca (Hung).

La fig. 30 muestra que cuando el control no es efectivo hay mayor grado de reproducción del psílido, ocasionando una infección más severa (Hung).



Figura 29. Dispersión del psílido entre fincas con aplicaciones químicas (Hung).



Figura 30. Dispersión del psílido de segunda generación entre fincas abandonadas (Hung).



Figura 31. Dispersión del psílido bajo el escenario de eliminación de fincas abandonadas (Hung).

La fig. 31 muestra que cuando hay control eficiente del HLB en fincas, no existen riesgos de contaminación (Hung).

Importancia de la eliminación de plantas infectadas en la finca

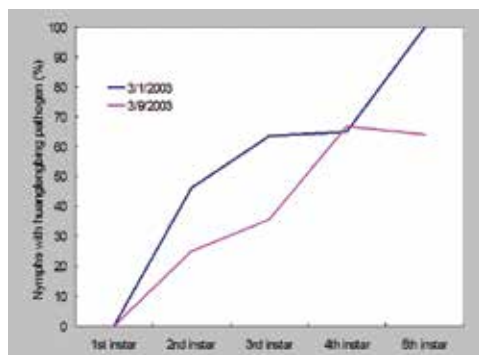
Tenemos que evitar que los psílidos se críen y alimenten en plantas infectadas con el HLB, porque si lo hacen será muy alta la proporción de psílidos portadores de la bacteria. Eliminar las plantas infectadas es romper con el ciclo que hay entre la bacteria y el insecto vector, bajando el inóculo de infección.

Otras razones para eliminar las plantas infectadas con el HLB

- 1) Los psílidos adultos es poco probable que puedan transmitir la bacteria.
- 2) En la etapa de ninfa estadio 3-4 es cuando más pueden adquirir la bacteria.
- 3) Las plantas enfermas con HLB contienen la bacteria y el psílido la transmite a las plantas más próximas cuando se alimenta.

Primera y segunda diseminación de psílidos

La primera diseminación del HLB se da cuando el psílido llega a las fincas; la segunda diseminación del HLB se da cuando el psílido se cría en la finca. La infección dentro de una finca por psílidos es muy probable que se deba al viento, injertos contaminados, etcétera.



Gráfica 12. Relación entre el estadio de ninfa y el porcentaje de ninfas con HLB (Hung).



Figura 32. Vista satelital de una finca de Sao Paulo, Brasil, donde se observa el avance de la enfermedad (Hung).

VI. MEDIOS DE DISEMINACIÓN DE ALGUNAS ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS

| Enfermedad | Forma de transmisión | Solución |
|-------------------|-----------------------------|---|
| HLB | Yema, psílicos | No existe |
| Tristeza | Yema, pulgones | Patrón resistente, variedad |
| Gomosis | Yema, tijeras, maquinaria | Variedades de portainjertos resistentes |

VII. PARCELAS DEMOSTRATIVAS MIP, EXPERIENCIA EN HONDURAS

7.1. QUÉ SON LAS PARCELAS DEMOSTRATIVAS EXPERIMENTALES

Las parcelas demostrativas experimentales son áreas definidas, establecidas con el objetivo de servir como modelo para la transferencia a técnicos y productores de la experiencia de Taiwán en el control del HLB y su vector. Estas áreas serán aprovechadas para estudiar la dinámica poblacional de *Diaphorina citri* y conocer diferentes resultados dependiendo del objetivo de la investigación (niveles de población de *Diaphorina citri* en diferentes épocas del año, cantidad de bacteria *Candidatus Liberibacter* en psílididos, número de brotes nuevos, floración, frutos, ninfas).

Durante la permanencia del Proyecto OIRSA-ICDF se continuará utilizando las parcelas demostrativas, lo que permitirá que los sistemas de mayor éxito puedan ser adoptados por los productores de cítricos, asegurando las bases de una citricultura moderna y exitosa.

7.2. CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE PARCELAS DEMOSTRATIVAS

- 1) **Edad de la plantación (de 1 mes a 5 años)**. Las fincas jóvenes son prioritarias por ser el futuro de la citricultura, ya que si se infectan con la bacteria *Candidatus Liberibacter* mueren antes de la etapa productiva de



Figura 33. Identificación de parcela demostrativa en Colón, Honduras.

frutos y no llegan a ser comercialmente rentables. Por su naturaleza, los árboles jóvenes permanecen en constante brotación, lo que incrementa la posibilidad de una mayor población de psílicos. El Proyecto OIRSA-ICDF considera urgente el manejo de estas fincas, ya que en el caso de Honduras el 99% fueron plantadas con árboles procedentes de viveros artesanales.

- 2) **Ubicación geográfica.** En Honduras se montaron diferentes parcelas en el área citrícola que está distribuida en diferentes municipios y departamentos con diferentes condiciones agroecológicas óptimas para el desarrollo de cítricos, que sea de fácil acceso, para obtener datos representativos de toda la zona citrícola.
- 3) **Fincas contaminadas con la bacteria *Candidatus Liberibacter* (índices de incidencia menores del 10%).** Según la experiencia de Taiwán, con este porcentaje de árboles infectados en la finca es posible lograr la total recuperación al poder identificar, ya sea con síntomas visibles o científicamente en el laboratorio, los árboles infectados en todo el lote, los cuales deberán ser eliminados y sustituidos por árboles provenientes de viveros certificados. Para tener éxito dentro de este esquema es necesario tener personal capacitado en la detección temprana de la enfermedad.
- 4) **Renovación de fincas con plantas certificadas.** Estas fincas son áreas producto de la concienciación que se ha llevado a cabo con algunos productores con áreas altamente infectadas, que califican para renovación con material de vivero certificado. En Honduras estos árboles están siendo producidos actualmente por la empresa privada Cofrutco, cada uno tiene un costo de \$1.70 y están siendo subsidiados por dicha empresa para ser pagados en 2 años.

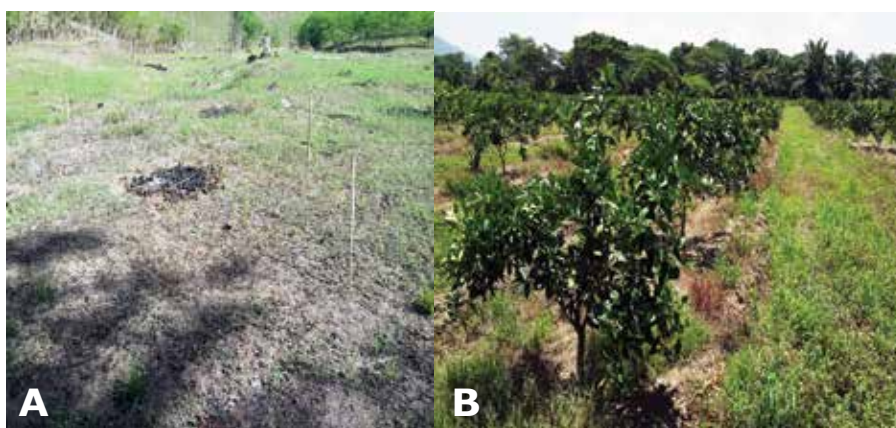


Figura 34. Adopción de tecnologías innovadoras. A: Eliminación de plantas con sintomatología y B: renovación con plantas sanas certificadas.

- 5) **Productores comprometidos con la adopción de tecnologías innovadoras.** Para tener éxito en este proyecto es necesaria la participación de

productores dispuestos a adoptar nuevas tecnologías (patrones, nuevas densidades de siembra, control de otras enfermedades y variedades de cítricos que nos den mejor calidad de fruto). De lo contrario, difícilmente se podrá lograr las metas trazadas. Es importante la capacitación y hacer la selección correcta de productores para tener el efecto multiplicador deseado.

7.3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

- 1) Como primer paso se ha capacitado a productores dueños de fincas demostrativas para que conozcan los objetivos que busca el proyecto OIRSA-ICDF. A continuación se les brinda una jornada completa de capacitación sobre las diferentes plagas que actualmente atacan la citricultura hondureña y especialmente sobre el HLB y su vector. Posteriormente, esa capacitación se afianza con la demostración en el campo para que el productor pueda identificar los síntomas presentes en el árbol infectado con HLB y el insecto vector y que esa finca sirva para realizar días de campo para seguir impartiendo conocimientos a otros productores.



Figura 35. Capacitación teórica a productores.



Figura 36. Capacitación en campo a productores.

7.4. ESTUDIO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL

En 13 fincas seleccionadas se realizaron las siguientes actividades: identificación y georreferenciación al azar de cinco árboles preferiblemente sanos, a los cuales se les colocó una cinta anaranjada y una marca de pintura del mismo color en la rama para poder identificarlos y están distribuidos en los cuatro puntos cardinales de cada árbol. Se cuentan brotes nuevos con una longitud de 1cm hasta 10 cm, número de flores, frutos, ninfas y psílidos, de cada planta seleccionada cada 15 días por un año. Esto va acompañado de todas las prácticas culturales, tales como poda, control de malezas, fertilización foliar y granular y manejo de otras plagas (pulgones, ácaros, áfidos, escama nieve, mancha grasienta, gomosis, botritis).

En fincas menores de 1 año se tomará en cuenta el siguiente criterio: se identifican y georreferencian 20 árboles en los cuatro puntos cardinales preferiblemente sanos (cinco árboles por cada punto cardinal) se coloca una cinta anaranjada y una marca de pintura del mismo color en la rama en cada árbol



Figura 37. Adopción de tecnologías innovadoras. A: Capacitación a productores sobre poda de cítricos; y B: Marcado de ramas.

para poder identificarlos, se cuenta los brotes nuevos con una longitud de 1cm hasta 10 cm, número de flores, frutos, ninfas y psílidos de cada planta seleccionada, el conteo se hace un día antes de la aplicación de insecticida en cada finca. Esto va acompañado de todas las prácticas culturales; tales como poda,



Figura 38. Toma de muestras para envío a laboratorio.



Figura 39. Prueba de yodo almidón. Izquierda, café oscuro, positivo hlb; derecha, café - amarillento claro, negativo hlb.

control de malezas, fertilización foliar y granular, comaleo y manejo de otras plagas (pulgones, ácaros, áfidos, escama nieve, mancha grasienta, gomosis, botritis). Se están realizando pruebas de yodo-almidón en el campo en árboles sospechosos de HLB (con síntomas), se recolecta y envía el material vegetativo y psílicos al laboratorio de referencia del ente oficial en el país.

En caso de salir las muestras positivas se procede a la eliminación de dichos árboles, los cuales están siendo reemplazados con plantas procedentes del vivero certificado de una empresa privada en vista de que el Proyecto OIRSA-ICDF todavía no cuenta con producción de plantas certificadas.

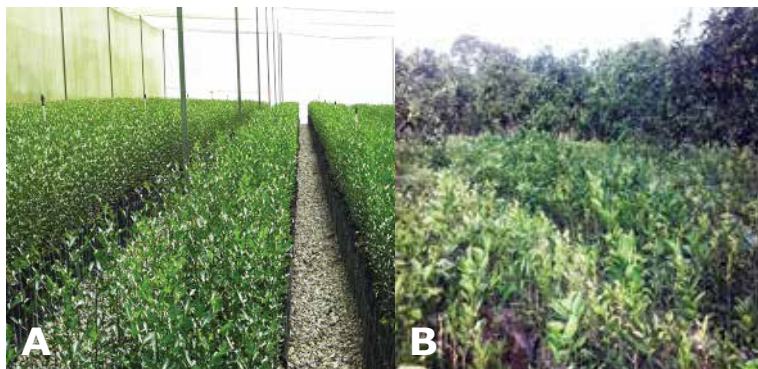


Figura 40. Adopción de tecnologías innovadoras. A: Vivero de planta sana bajo ambiente protegido; y B: Vivero artesanal a cielo abierto.

Todas las actividades de investigación que se están realizando tienen como objetivo generar datos sobre brotación, floración y dinámica poblacional de *Diaphorina citri*. En Honduras, no existen antecedentes de estadísticas y los datos con que se cuenta de otros países no aplican en Honduras porque las condiciones climáticas son totalmente diferentes, lo que genera que en el país se tengan brotaciones casi todo el año, lo que complica el manejo del vector.

VIII. GUÍA DE CAMPO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SÍNTOMAS DE HLB Y OTRAS ENFERMEDADES

A continuación, se presenta una guía de campo para la identificación de:

- 1) Reconocimiento de síntomas de HLB en hojas y frutos de cítricos.
- 2) Reconocimiento del insecto vector del HLB *Diaphorina citri*.
- 3) Reconocimiento de agentes de control biológico para *Diaphorina citri*.
- 4) Reconocimiento de otras enfermedades importantes en cítricos.

8.1. RECONOCIMIENTO DE SÍNTOMAS DE HLB EN HOJAS Y FRUTOS DE CÍTRICOS

1.1. Evolución de síntomas y daños en árboles afectados



Figura 41. Retoños o brotes amarillos (foto derecha: H. Gómez, APHIS-USDA).



Figura 42. Caída excesiva de hojas.

Figura 43. Muerte productiva de la planta.



Figura 44. Caída excesiva de frutos.

1.2. Sintomatología en hojas



Figura 45. Amarillamiento o moteado difuso "Blotchy Mottle".



Figura 46. Amarillamiento o moteado difuso "Blotchy Mottle".



Figura 47. Islas verdes, nervaduras gruesas y corchosas.



Figura 48. Islas verdes (fotos: H. Gómez, APHIS-USDA).



Figura 49. Nervaduras amarillas.



Figura 50. Engrosamiento de nervadura central, venas acorchadas.



Figura 51. Hojas pequeñas y efecto de "orejas de conejo".

1.3. Síntomas externos en frutos



Figura 52. Inversión de color (enverdecimiento o *greening*).



Figura 53. En frutos sanos la inserción de color naranja que se observa siempre debe ser verde (foto: H. Gómez, APHIS-USDA).



Figura 54. Inversión de color (enverdecimiento o *greening*). (Foto de la derecha: CNRF-Senasica).



Figura 55. Inversión de color.



Figura 56. Frutos pequeños deformes.

1.4. Síntomas internos en frutos



Figura 57. Frutos deformes.



Figura 58. Semillas atrofiadas y frutos deformes.



Figura 59. Fruto ladeado.

8.2. RECONOCIMIENTO DEL INSECTO VECTOR DEL HLB, *DIAPHORINA CITRI* (KUWAYAMA)

2.1. Reconocimiento del adulto de *Diaphorina citri*



Figura 60. Adultos de color marrón moteado, miden 2-3 mm de largo.

2.2. Reconocimiento de etapas de *Diaphorina citri*

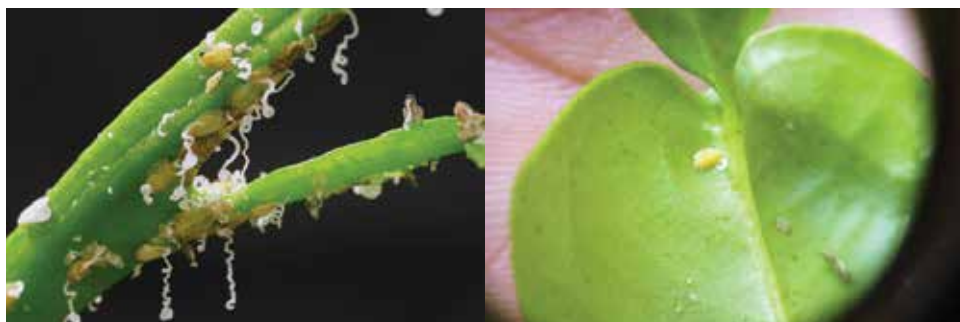


Figura 61. Ninfas alimentándose de la savia de las plantas (excretan secreciones cerosas).



Figura 62. Las ninfas son planas, de color marrón amarillento, sin manchas abdominales, con filamentos a lo largo del abdomen.

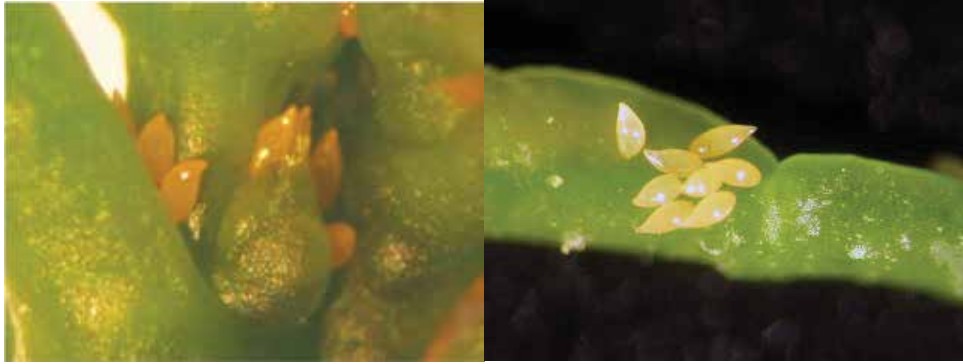


Figura 63. Los huevos, de color amarillo-anaranjado, son colocados en los brotes tiernos.

2.3. Reconocimiento de daños



Figura 64. Infestación del psílido (adulto) en hojas.



Figura 65. Deformación de las hojas y secreciones por la alimentación del psílido.

8.3. RECONOCIMIENTO DE AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO PARA *DIAPHORINA CITRI*

3.1. *Tamarixia radiata*, parasitoide específico de ninfas de *D. citri*



Figura 66. El orificio circular en ninfas de *D. citri* es la evidencia del éxito del control biológico con *Tamarixia radiata*.

3.1. Hongos entomopatógenos



Figura 67. Infestación del psílido. Izquierda: adulto de *Diaphorina* infectado por *Hirsutella* sp; derecha: ninfas de *Diaphorina* infectadas por hongo (fotos: Senasica).

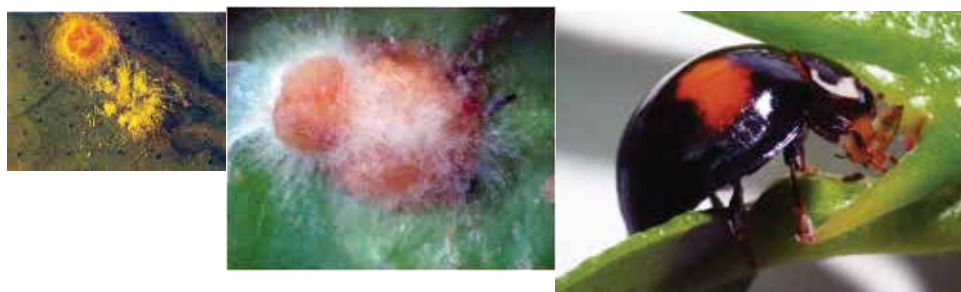


Figura 68. Hongos entomopatógenos e insecto depredador. Izquierda a derecha: *Aschersonia aleyrodis*, *Metarhizium anisopliae*, *Olla v nigrum*, depredador de ninfas de *Diaphorina citri* (foto: Senasica).

8.4. RECONOCIMIENTO DE OTRAS ENFERMEDADES IMPORTANTES EN CÍTRICOS

4.1. *Leprosis de los cítricos (CiLV)*



Figura 69. La leprosis de los cítricos es una enfermedad viral que se transmite por el ácaro *Brevipalpus phoenicis*.



Figura 70. La leprosis de los cítricos también se disemina por el uso de plantas no certificadas.

4.2. *La mancha negra de los cítricos*

La mancha negra de los cítricos (*Citrus Black Spot* [CBS]) es provocada por el hongo *Guignardia citricarpa*.



Figura 71. "Falsa melanosis" en naranjo. Los principales medios de dispersión son árboles de vivero que presentan infecciones latentes, las yemas vegetativas y varetas también son fuente de inóculo.



Figura 72. Mancha agrietada.



Figura 73. Mancha negra en hoja de naranjo.



Figura 74. Mancha dura en naranjo.



Figura 75. Mancha peca en naranjo.

4.3. Clorosis variegada de los cítricos (*Xylella fastidiosa*)



Figura 76. La clorosis variegada de los cítricos es causada por una bacteria y se disemina por medio de insectos vectores de la familia Cicadellidae (chicharritas). (Fotos: de izquierda a derecha: S. Halbert, DPI-FL-USA, Fundecitrus, S. Halbert, DPI-FL-USA).



Figura 77. Los síntomas de la clorosis variegada suelen empezar por una clorosis similar a una deficiencia nutricional por zinc y usualmente ocurre en las ramas terminales; el tamaño de los frutos se reduce considerablemente y la cáscara se endurece (fotos: S. Halbert, DPI-FL-USA).

4.4. Cancro de los cítricos (*Xanthomonas citri* pv. *citri*)



Figura 78. El cancro de los cítricos es una enfermedad bacteriana que se desarrolla por efecto de vientos, humedad y altas temperatura, causa destrucción de las hojas y daños en los frutos. (Fotos: Dr. Rui Leite, Brasil).



Figura 79. Los frutos afectados por el cancro de los cítricos son inservibles para comercialización debido al daño estético y restricciones cuarentenarias en mercados internacionales. (Fotos: H. Gomez, APHIS-USDA).



Figura 80. Las pérdidas económicas a causa del cancro de los cítricos se deben principalmente a la defoliación, abscisión prematura y manchado de frutos. (Fotos: H. Gomez, APHIS-USDA).



Figura 81. El minador de la hoja de los cítricos *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) puede incrementar significativamente la incidencia y severidad de la enfermedad. En las galerías causadas por las larvas, la bacteria prospera favorablemente abarcando casi toda la lesión. (Foto de la derecha: H. Gomez, APHIS-USDA).



Figura 82. En los tallos los síntomas del cancro de los cítricos se manifiestan como lesiones elevadas, corchosas, con bordes húmedos. (Fotos: H. Gomez, APHIS-USDA).

4.5. Gomosis (*Phytophthora sp.*)



Figura 83. La gomosis es una enfermedad causada por un hongo, provoca podredumbre de cuello y raíz.

4.6. Tristeza de los cítricos (*CiTV*)



Figura 84. La tristeza de los cítricos es una enfermedad viral que se transmite por áfidos (*Toxoptera citricida*, *T. aurantii* y *Aphis gossypii*). También se disemina por el uso de plantas y yemas no certificadas.

4.7. Mosca prieta (negra) de los cítricos
Aleurocanthus woglumi (Hemiptera: Aleyrodidae)



Figura 85. La mosca prieta daña al floema al succionar la savia bruta que sintetiza la planta de cítrico, debilitándola hasta provocar su muerte.

4.8. Reconocimiento de deficiencias nutricionales y otros daños

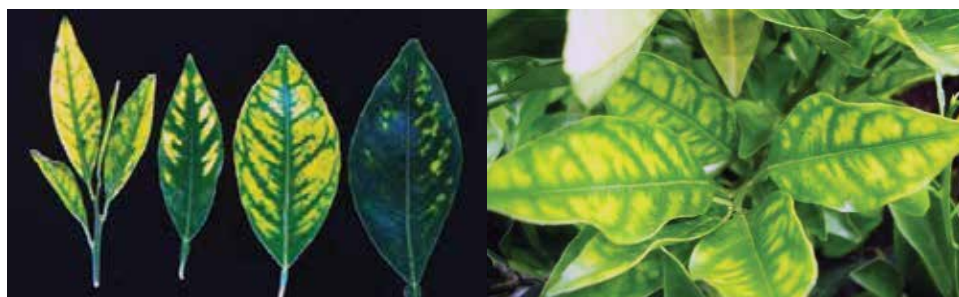


Figura 86. Deficiencia de zinc.



Figura 87. Deficiencia de magnesio.



Figura 88. Deficiencia de hierro.



Figura 89. Deficiencia de manganeso.



Figura 90. Daño causado por herbicidas.

IX. RECOMENDACIONES

- 1) Eliminar las plantas enfermas.
- 2) Calendarizar las aplicaciones de insecticidas para fincas de pequeños productores.
- 3) Realizar aplicaciones basadas en la dinámica poblacional del insecto vector para grandes citricultores.
- 4) Sembrar plantas sanas procedentes de viveros certificados.
- 5) Hacer uso del manejo integrado de plagas: trampeo, endoterapia, prueba de yodo - almidón, aspersión, envío de muestras al laboratorio.
- 6) Realizar el programa de capacitación y día de campo para la identificación y el reconocimiento de los síntomas de la enfermedad y del insecto vector.
- 7) Realizar campaña de divulgación del HLB y su vector.

BIBLIOGRAFÍA

- CHIEN, C. C., CHIU, S. C., KU, S. C. 1988. Biological control of citrus psylla, *Diaphorina citri*. 1. The introduction, augmentation and release of *Tamarixia radiata*. Jour. Agri. Res. China. 37(4): 430 - 439.
- CHIH-PIN LIN. Senior Specialist, Strengthen the Control of Huanglongbing (HLB) and the Implementation of Integrated Pest Management (IPM) in Citrus Project.
- GANDARILLA, F. L. 2012. Evaluación de aislados nativos de hongos entomopatógenos de zonas citrícolas sobre *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Doctor en ciencias con especialidad en biotecnología.
- Guía de Síntomas: Reconocimiento de síntomas del HLB de los cítricos y reconocimiento de signos por *Diaphorina citri*. OIRSA
- HUNG, S. C. 2006. Ecology and vectorship of the citrus psyllid in relation to the prevalence of Citrus Huanglongbing. Doctoral Dissertation.

A woman with dark hair tied back, wearing a light blue protective suit, is focused on inspecting a citrus tree. She is using a yellow probe-like tool to examine the leaves. The background is a dense field of similar citrus trees under natural light.

Protocolo para el monitoreo de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera)

Cheslavo A. Korytkowski, Sci. Dr.

En acción contra el HLB

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| I. | |
| OBJETIVOS | |
| 155 | |
| II. | |
| ANTECEDENTES Y RESUMEN DE LA INFORMACIÓN | |
| 155 | |
| III. | |
| MATERIALES Y METODOLOGÍA | |
| 156 | |
| 3.1. Materiales de muestreo | 156 |
| 3.2. Unidad muestral para detección y monitoreo | 156 |
| 3.3. Detección de la presencia de <i>Diaphorina citri</i> | 156 |
| 3.4. Muestreo de adultos para determinar las poblaciones infectadas con la bacteria | 159 |
| 3.5. Muestreo para determinar la dinámica poblacional | 159 |
| 4.6. Delimitación de brotes de infestación | 160 |
| BIBLIOGRAFÍA | |
| 161 | |

I. OBJETIVOS

- 1) Detectar la presencia de *Diaphorina citri*.
- 2) Detectar poblaciones infectadas con la bacteria.
- 3) Determinar la dinámica poblacional en el transcurso del año.
- 4) Detectar brotes de infestación en huertas comerciales.

II. ANTECEDENTES Y RESUMEN DE LA INFORMACIÓN

La información existente es abundante y minuciosa, y permite definir elementos necesarios en el protocolo regional para el monitoreo de poblaciones de adultos, presencia del patógeno en el insecto y las características demográficas de las poblaciones de *Diaphorina citri*.

Algunos de los elementos importantes para los procedimientos orientados a cumplir con los objetivos señalados son:

- 1) Se ha demostrado científicamente que los adultos se encuentran distribuidos en “grupos al azar”.
- 2) Las plantas de contorno son las primeras en ser colonizadas.
- 3) La presencia de brotes tiernos es determinante para la incursión de los adultos de *Diaphorina citri*.
- 4) Las hembras requieren alimentarse en los brotes de cinco días hasta por dos semanas para cumplir con su desarrollo sexual.
- 5) El número de brotes por planta x ha, es un indicador importante para conocer los períodos más apropiados para la incursión de *Diaphorina citri* en los campos de cítricos.
- 6) Es más importante estimar la densidad y características de la población, con base en el número de brotes por planta, antes que el número de plantas.
- 7) Hay dos principales métodos para el monitoreo de adultos, que serán explicados para cada objetivo.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. MATERIALES DE MUESTREO

Para detectar la presencia o estimar densidades de adultos de *Diaphorina citri*, en huertas comerciales, se debe contar con personal entrenado y contar con materiales y equipos necesarios para lograr los objetivos del muestreo.

El insecto adulto es muy pequeño, por ello el personal de campo debe contar con lupa de bolsillo de 10x, contómetro manual, bolsas plásticas de sellado rápido, hojas de registro y tablero de campo con grapa sujetadora, palillo de madera o plástico de ¼” x 30 cm de largo, aspirador, lápiz, mochila o bolso de rápido acceso y trampas pegantes.

3.2. UNIDAD MUESTRAL PARA DETECCIÓN Y MONITOREO

La unidad muestral es una unidad de superficie (usualmente la hectárea, o fracción), con un promedio, para cítricos, de 300 plantas. La unidad muestral debe ser identificada, codificada y geo-referenciada, especie de planta (o especies en caso de siembras intercaladas o mezcladas), variedad, edad de la plantación, tamaño promedio de planta, estado fenológico, labores que se desarrollan en el período previo al muestreo, en especial tratamientos para el control de plagas o fertilización; condiciones del tiempo (sol, nublado, lluvia, flujo de aire, etc.), al momento de inicio de las operaciones de muestreo.

3.3. DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE *DIAPHORINA CITRI*

El muestreo de detección pretende determinar la presencia o ausencia de adultos de *Diaphorina citri* en la unidad muestral, planta o localidad.

Dos métodos pueden ser implementadas con la finalidad de detectar la presencia del Liviidae en una finca o plantas aisladas:

- 1) Colecta directa o método de golpeteo.
- 2) Trampeo mediante trampa pegante.

Muestreo en plantas de cítricos. Para este muestreo se debe procurar buscar plantas de cítricos, preferentemente de limón en pleno crecimiento, no buscar plantas de más de cuatro años o más viejas. Es necesario conocer que los adultos del psílido se ubican primariamente en brotes tiernos de plantas (figura 1) en los contornos en fincas de cítricos. Por ello, se recomienda seleccionar cinco plantas ubicadas en el contorno de la unidad muestral (figura 2).



Figura 1. Brote de naranjo con adultos de *Diaphorina citri*.

Consiste en colocar debajo del brote una



Figura 2. Unidad muestral, delimitando el área marginal de tres líneas y la ubicación de cinco plantas a muestrear (cuadros verdes).

lámina lisa de color blanco y con el palillo de madera sacudir el brote firmemente para que los adultos caigan sobre la lámina, tal como se indica en la figura 3. Una vez que los psílidos se encuentran en la lámina, pueden ser fácilmente colectados con un aspirador manual como el que se muestra en la figura 4. Los adultos se colocan en frascos para ser conducidos hacia el laboratorio. Para ello se introducen en un frasco conteniendo alcohol al 70%. El frasco debe rotularse con los datos de la muestra: finca, código de la finca, fecha y número de adultos del psílido.

El método de trampeo consiste en colocar una trampa pegante, de doble cara engomada (figura 1), por unidad muestral o cada 200 m (aprox. 50 árboles). La trampa debe ser localizada en el borde de la unidad muestral a una altura aproximada de uno a dos metros del suelo (dependiendo del tamaño de la planta), directamente sobre un brote de la planta seleccionada.

Se debe registrar toda la información relacionada con el monitoreo de detección: fecha de instalación y recuperación de la trampa; variedad de cítrico; estado vegetativo de la planta; localidad; nombre del propietario; superficie real de la finca; edad de la planta; ubicación geodésica (latitud y longitud); número de adultos de *Diaphorina citri* encontrados. La superficie engomada de la trampa debe quedar libremente expuesta e instalada directamente sobre la superficie externa del dosel por períodos de una o dos semanas. La trampa tiene las dos superficies engomadas, debe liberarse una de ellas y en el siguiente muestreo la superficie usada debe cubrirse, liberando la superficie alterna que debe quedar siempre al exterior de la copa del árbol.



Figura 3. Colecta y captura de adultos mediante golpeteo.



Figura 4. Aspirador manual para colecta de adultos de *Diaphorina citri*.

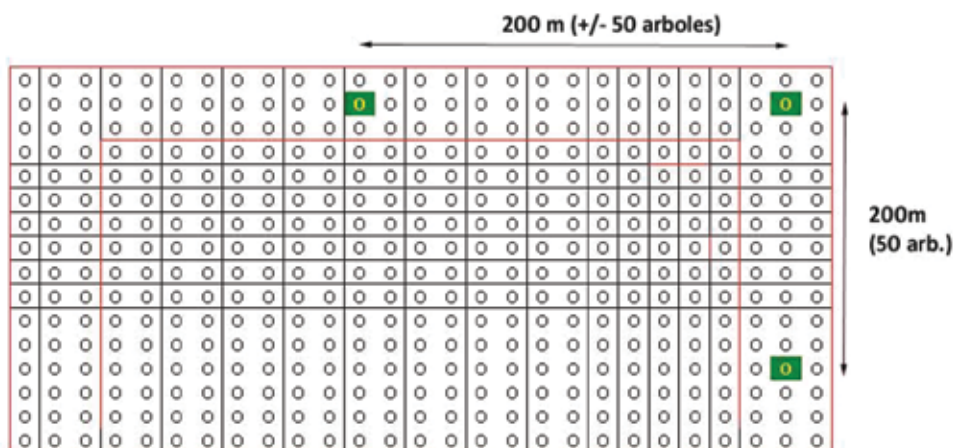


Figura 5. Distribución de las trampas en fincas de cuatro hectáreas o más.

3.4.

MUESTREO DE ADULTOS PARA DETERMINAR LAS POBLACIONES INFECTADAS CON LA BACTERIA

Los adultos de *Diaphorina citri* están, principalmente, en los brotes tiernos de cítricos, particularmente de limón. Es necesario colectarlos, y para ello se puede usar el método del golpeteo o directamente colectar los adultos de la planta con el aspirador y luego, en ambos casos, colocar los adultos colectados en envases limpios y sellados, acondicionados con alcohol etílico al 70% o, mejor aún, al 95%. Incluir en una etiqueta la información indicada para las trampas.

El método de golpeteo debe realizarse sobre un brote por árbol (de la segunda fila del contorno del campo), para 10 árboles por unidad muestral. Éste es un método de recuento directo y puede ser expresado en relación con la cantidad de brotes por unidad muestral, así como en relación con la población “real de adultos” por brote, lo cual resulta más exacto y es su principal ventaja. Es conveniente hacer colectas abundantes, si es posible hasta de 100 adultos por cada unidad muestral o por hectárea., según sea el caso. Tome una muestra, en lo posible cada tres meses.

3.5.

MUESTREO PARA DETERMINAR LA DINÁMICA POBLACIONAL

Periodo de muestreo. Los muestreos para establecer las características de la variabilidad de la densidad de la población requieren de un periodo mínimo de 12 meses. El número y características de las unidades muestrales debe ser determinado de acuerdo con la capacidad instalada, número de personas involucradas en el proceso de monitoreo, amplitud de la “zona” (distrito, provincia, etc., de acuerdo con la división política de cada país).

Muestreo de adultos. Los adultos se encuentran en mayores proporciones en brotes tiernos y en el exterior de la copa. Seleccionar 10 árboles (cinco en uno de los contornos de la unidad muestral y cinco en una diagonal proyectada hacia el área central de la unidad muestral. Es necesario intercalar plantas para cada muestreo por cada visita al campo, no usar secuencialmente la misma planta (figura 6: en verde plantas muestreadas, en celeste las plantas intercaladas por muestreo; amarillo: ubicación de trampa pegante). Contar todos los brotes nuevos en cada árbol, seleccionando 10 brotes (aproximadamente de 15 cm, con solo una hoja abierta en la base; figura 3) a 1 metro del suelo para plantas jóvenes y 1.5-2 metros en plantas adultas.

Se recomienda instalar una trampa por unidad muestral, en o cerca del borde de la parcela, a 1-2 metros del suelo, sobre la superficie externa del dosel por una o dos semanas.

El método de golpeteo se realiza sobre un brote por árbol para los 10 árboles de la unidad muestral, este método se puede transpolar a la densidad de brotes por unidad muestral, y a la población “real de adultos” por brote.

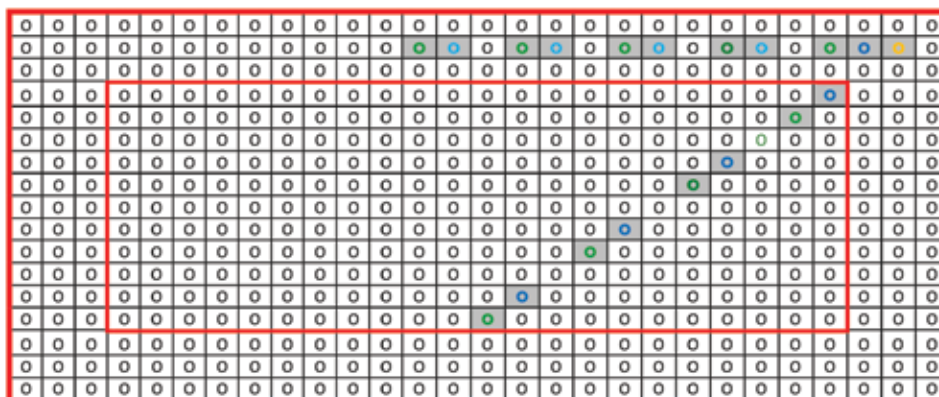


Figura 6. Unidad muestral, delimitando el área marginal de tres líneas y la ubicación de plantas a muestrear, cinco marginales (L1....L5) y 5 en diagonal (D1....D5), hacia el centro de la unidad muestral. En verde y azul las plantas a muestrear secuencialmente, en amarillo la ubicación de la trampa pegante.

4.6. DELIMITACIÓN DE BROTES DE INFESTACIÓN

Con base en la información de campo para todas las áreas de muestreo, se determinará las áreas que presentan los promedios súbitamente elevados de la densidad poblacional de adultos de psílidos, así como aquellas áreas donde se detecte la presencia del HLB.

Colecta de la información de campo

La hoja de monitoreo debe ser escueta, con espacio suficiente para incorporar la información de campo, condiciones de éste: labores efectuadas antes de la evaluación, tratamientos, productos empleados, clima durante la tarea de evaluación, situaciones anómalas ocurridas en el proceso, toma de muestras y anomalías observadas, pérdida o deterioro de la trampa pegante, material biológico adicional colectado, observaciones sobre la o las plantas seleccionadas en la unidad muestral, etc. Las evaluaciones de laboratorio permiten verificar los informes de campo, una muestra es pequeña, pero sirve de parámetro de la calidad del muestreo de campo.

HOJA DE CAMPO PARA LA UNIDAD MUESTRAL

Finca:..... Parcela: Fecha:/...../.....
 GeoreferenciaciónCultivo: Variedad:.....
 Área: Edad del cultivo: Estado fenológico:
 Condiciones del clima: Hora de inicio: Hora de culminación:
 Nombre del evaluador:

| Planta | Brotos | Positivos | Adultos trampa | Adultos golpeteo | Observaciones |
|--------|--------|-----------|----------------|------------------|---------------|
| L1 | | | | | |
| L2 | | | | | |
| L3 | | | | | |
| L4 | | | | | |
| L5 | | | | | |
| D1 | | | | | |
| D2 | | | | | |
| D3 | | | | | |
| D4 | | | | | |
| D5 | | | | | |
| Total | | | | | |

Observaciones: Número de muestras (brotos) colectados, planta de donde fue obtenida, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- AREVALO, H.A., QURESHI, J.A. & P.A. STANSLY. 2011. Sampling for Asian citrus psyllid (ACP) in Florida citrus Groves. University of Florida, IAS Extension. ENY-857. 7 pp.
- AUBERT, B. & XIA YU HUA 1990. Monitoring Flight Activity of *Diaphorina citri* on Citrus and Murraya Canopies. *Proc. 4th. Internac. Asia-Pacific Conf. Citrus Rehabil.* 181-187
- 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. 2008. Biology, History and World Status of *Diaphorina citri*. Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora. México 2008. 11 pp.

- HALL, D. 2009. An assessment of yellow sticky card traps as indicators of the abundance of adult *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Citrus. *Journal of Economic Entomology* 102(1): 446-452.
- HALL, D.G., & HENTZ, M.G. 2010. Sticky trap and stem-tap sampling protocols for the Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology* 103 (2): 541-549.
- HALL, D.G., HENTZ, M.G., & CIOMPERLIK, M.A. 2007. A comparison of traps and stem tap sampling for monitoring adult Asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *Florida Entomologist* 90 (2): 327-334.
- HALL, D.G., HENTZ, M.G., & ADAIR, R.C. J.R. 2008. Population Ecology and Phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Two Florida Citrus Groves. *Environ. Entomol.* 37(4): 914-924
- HALL, D.G., MAMOUDOU S. & MIZELL, R.F. 2010. A comparison of sticky traps for monitoring Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). *Crop Protection*. 29: 1341-1346
- LIU, Y.H., & TSAI, J.H. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Annals of Applied Biology* 137 (3): 201-206.
- MAMOUDOU S., FLORES D., FENCH, J.V. & D.G. HALL. 2008. Dispersion Patterns and Sampling Plants for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Citrus. *J. Econ. Entomol.* 101 (4): 1478-1487
- MORENO P., M., POZO V., E., VALDÉS H.R. CÁRDENAS, MORALES, M. 2008. Distribución espacial de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) sobre Lima Persa (*Citrus Latifolia* Tanaka). *Fitosanidad*, 12 (1): 33-37
- MURARAO, RP. 2009. Summary of 2008 - 2009 Citrus Budget for the Southwest Florida Sampling for Asian citrus psyllid (ACP) in Florida citrus groves 5 Production Region. University of Florida, IFAS, CREC, Lake Alfred, FL [<http://www.crec.ifas.ufl.edu/extension/economics/pdf/>].
- QURESHI, J.A., & STANSLY, P.A. 2010. Dormant season foliar sprays of broad-spectrum insecticides: An effective component of integrated management for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus orchards. *Crop Protection*. 29 (8): 860-868.
- ROBLES, P. 2012. "Monitoreo y Muestreo de *Diaphorina*". Curso Taller para la estructuración de la campaña de control del Huanglongbing HLB de los cítricos. Senasica-OIRSA-FAO. PP presentación. San José, Costa Rica.
- SOSA-ARMENTA, J.M., LÓPEZ-MARTÍNEZ, M., ALIA-TEJACAL, I., HERNÁNDEZ-FUENTES, A., & JIMÉNEZ-GARCÍA, D. 2011. Fluctuación poblacional del psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), en tres huertas de cítricos en el Estado de Morelos.

2º Simposio Nacional de Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. México. 141-146.

STANSLY, P.A., AREVALO, H.A., & QURESHI, J. 2010. Monitoring methods for Asian citrus psyllid. *Citrus Industry Magazine*. 91(4): 20-22.

STEPHEN LEONG CHAN TECK, ABANG F., ANDREW B., ROLAND KUEH JUI HENG & WONG SING KING (2011). Seasonal Population Dynamics of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama in Sarawak. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6 (4): 527-535, 2011.

REPRESENTACIONES OIRSA

MÉXICO

oirsa.mx@oirsa.org
Calle Comte No. 44, Colonia Anzures,
Municipio Miguel Hidalgo, Distrito
Federal
C. P. 11590, México.
Tel.: + (525) 55-64-69-05 y
+ (525) 52-64-74-61

BELIZE

fblanco@oirsa.org
Agricultural Showgrounds,
City of Belmopan,
Cayo District Belize. P.O. Box 426
Tel.: + (501) 822-0521/0658

GUATEMALA

oirsa.gt@oirsa.org
21 Avenida 3-12, Zona 15,
Vista Hermosa 1
Guatemala, Guatemala.
Tel.: + (502) 2294-0404

EL SALVADOR

oirsa.sv@oirsa.org
Final 1ª. Av. Norte y 13 Calle Oriente,
Av. Manuel Gallardo, Santa Tecla, La
Libertad.
PBX: + (503) 2510-3500 / + (503)
2228-7841

HONDURAS

oirsa.hn@oirsa.org
Colonia Lomas del Guijarro,
Calle Alfonso XIII #3735.
Tegucigalpa, Honduras.
Tel.: + (504) 2239-0316 / 9315 / 7073 /
6443 / 0644 / 5995 / 7232 /

NICARAGUA

oirsa.ni@oirsa.org
Residencial Las Colinas, Casa No. 318,
2da. entrada
Av. Paseo del Club frente a entrada
principal Estación de Bomberos,
Managua, Nicaragua.
Tel.: + (505) 2276-0649 / 2276-2653 /
2276-0090

COSTA RICA


gzuniga@oirsa.org
Rohrmoser, Pavas, de Plaza Mayor, 100
mts. Este y 100 mts. Norte Casa Verde,
San José, Costa Rica.
Tel.: + (506) 2232-9943 + (506) 2296-
8280

PANAMÁ

oirsa.pa@oirsa.org
Área Social de Clayton, Calle Hocker,
Casa 1012 A-B, Ciudad de Panamá,
Panamá.
Tel.: + (507) 317-0900 / 01 / 02

REPÚBLICA DOMINICANA

oirsa.do@oirsa.org
Urbanización Fernández, Calle 13,
Esquina Calle
Espiral, Casa 4A,
Santo Domingo, República
Dominicana. Tel.: + (001-809) 533-7900



A partir del año 2008, el área citrícola de los países del OIRSA es afectada por la introducción del huanglongbing de los cítricos (HLB), una de las más devastadoras plagas de los cítricos, que en la actualidad está presente en la mayoría de los países de la región.

El manejo integrado del HLB implica reducir el daño que esta enfermedad causa a los cítricos. Es un proceso para tomar decisiones con diferentes estrategias y tener soluciones a corto, mediano y largo plazo. El manejo integrado del HLB utiliza una combinación de métodos biológicos, culturales, legales, genéticos y químicos, de forma compatible para obtener una producción sostenible que tenga resultados económicos favorables con el mínimo impacto ambiental posible. En la región OIRSA las estrategias fitosanitarias para el manejo integrado del HLB incluyen:

- Diagnóstico patológico confiable.
- Eliminación de los árboles infectados.
- Confinar, vigilar y reducir su diseminación.
- Control del insecto vector (*Diaphorina citri*).
- Contar con un programa de producción de planta sana certificada de cítricos.
- Normativa regional para el manejo del HLB y otras plagas de interés cuarentenario

Este *Compendium* está basado en la experiencia de Taiwán en la región OIRSA en el manejo integrado del HLB y se espera que sirva como guía a productores y técnicos para una producción acorde con la demanda. Este documento se ajustará a las condiciones agroecológicas locales de los países y sus capacidades de reacción de esta plaga en los diferentes cultivares citrícolas.