

Métodos de detección de Huanglongbing en cítricos

Alejandro Soto-Plancarte¹
Ricardo Santillán-Mendoza²
Gerardo Rodríguez-Alvarado³
Sylvia Patricia Fernández-Pavía^{3,5}
Bárbara Hernández-Macías⁴
E. Iobana Alanis-Martínez⁴

1 Laboratorio de Agroecología-Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad-Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Morelia, Michoacán. CP. 58190. Tel. 443 3552196. (alexstoppv@gmail.com).

2 Campo Experimental Ixtacuaco-INIFAP. Carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan km 4.5, Congregación Rojo Gómez, Tlapacoyan, Veracruz. CP. 93650. Tel. 443 2236675. (santillan.ricardo@inifap.gob.mx).

3 Laboratorio de Patología Vegetal-Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapecuaro km 9.5, Tarímbaro, Michoacán. CP. 58880. Tel. 443 3223500, ext. 5227. (gerardo.rodriguez@umich.mx).

4 Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-DGSV. Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, Av. Centenario de la Educación, Col. Santa Ana, Tecámac, Estado de México. CP. Tel. 55 22135172. (barbara.hernandez@senasica.gob.mx; iobanaa@yahoo.com.mx).

Autora para correspondencia: fernandezpavia@hotmail.com.

Resumen

En México, la citricultura representa una de las actividades económicas más importantes para la fruticultura nacional, con una producción de 8.8 millones de toneladas y una derrama económica de más de 47 mil millones de pesos al año. Sin embargo, la producción se ve afectada por plagas y enfermedades, destacando el Huanglongbing (HLB), 'dragón amarillo' o enverdecimiento de los cítricos, como la enfermedad más devastadora a nivel mundial, ocasionada por una proteobacteria del género *Candidatus Liberibacter* (Ca. L.). Debido a que no existe un método efectivo para controlar esta enfermedad la correcta y oportuna detección puede reducir significativamente su diseminación. El propósito de la presente revisión es recopilar métodos que se emplean para la detección de la presencia de Ca. L. en plantas de cítricos, cubriendo aspectos generales sobre la sintomatología de la enfermedad, métodos moleculares para una precisa y rápida detección al realizar el muestreo tanto en plantas como en el vector. Asimismo, se mencionan diferentes protocolos que analizan algunos compuestos producidos durante la infección con Ca. L. e imágenes en cítricos con HLB.

Palabras clave:

diagnóstico, espectrometría, imágenes, muestreo, PCR, síntomas.

Introducción

En México, la citricultura representa una de las actividades económicas más importantes para la fruticultura nacional, con una producción de 8.8 millones de toneladas y una derrama económica de 47 mil 499 millones de pesos al año (SIAP, 2022). Sin embargo, la producción se ve afectada por plagas y enfermedades, destacando el Huanglongbing (HLB), 'dragón amarillo' o enverdecimiento de los cítricos).

Tres especies de alfa protobacterias Gram negativas han sido reportadas como agentes causales, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. africanus* (CLaf) y *Ca. L. americanus* (CLam) (SENASICA, 2019). El patógeno invade el sistema vascular de la planta a través de los tubos cribosos del floema, impidiendo el transporte eficiente de nutrientes, ocasionando una serie de síntomas en hojas y en frutos así como la muerte eventual del árbol enfermo (Bové, 2006).

Las especies CLas y CLam tienen como vector al psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*, mientras que CLaf es transmitida por *Trioza eritreae*. Ésta enfermedad afecta todas las especies cultivadas de cítricos y sus híbridos. La especie de CLas está presente en México y se encuentra sujeta a control oficial. La bacteria se detectó por primera vez en *D. citri* en el municipio de Tizimín, Yucatán en el 2009. Diez años después de su detección inicial, la dispersión de la enfermedad comprende 342 municipios distribuidos en 25 estados de la República Mexicana (SENASICA, 2019).

El HLB es considerada una enfermedad destructiva en cítricos a nivel mundial debido al efecto negativo en la producción de fruto y en México no es la excepción. Debido al impacto de la enfermedad, su manejo requiere de diversas acciones tales como la detección y eliminación oportuna de árboles enfermos, el control de la población del insecto vector y el uso de planta sana producida en viveros certificados, con el propósito de mitigar los efectos dañinos de la enfermedad (SENASICA, 2012). En ese sentido, el diagnóstico oportuno de árboles infectados con CLas en México requiere de métodos de muestreo eficientes, la toma oportuna de muestras y su adecuado envío a los sitios especializados encargados de su detección (SENASICA, 2012).

El propósito de ésta revisión es presentar los avances logrados en las investigaciones que se han realizado sobre el HLB, en México y en el ámbito mundial en los últimos años. Debido a la naturaleza devastadora que el HLB ocasiona en la producción de cítricos en el país, consideramos que es indispensable actualizar la información que se ha desarrollado recientemente, principalmente en lo relacionado con líneas de investigación sobre la detección de esta enfermedad.

Detección por síntomas, muestreo

Sintomatología

Los síntomas varían dependiendo de la especie, variedad y edad de la planta afectada. En las hojas se observa amarillamiento seguido de un moteado con manchas angulares asimétricas en ambos lados de la nervadura principal. En algunos casos se observó el engrosamiento y aclaramiento de



las nervaduras, las cuales presentan un aspecto corchoso. Las hojas de las ramas terminales son pequeñas, verticales y muestran una variedad de patrones cloróticos.

Ocasionalmente, los síntomas de las hojas pueden confundirse con deficiencias nutricionales de zinc, cobre o manganeso; sin embargo, éstas deficiencias minerales presentan un patrón simétrico en ambos lados de la nervadura principal en las hojas afectadas. A medida que la decoloración se aleja de las nervaduras, las hojas se vuelven de amarillo pálido a amarillo claro con áreas de color verde oscuro distribuidas de manera desigual (EPPO, 2014).

Los síntomas en el árbol comienzan con la aparición de brotes amarillos o cloróticos, observándose posteriormente un amarillamiento sectorial de la copa del árbol, que se relaciona con la zona en donde se encuentra alimentándose el vector (Bové, 2014). En estados avanzados de la enfermedad, ocurre una defoliación intensa de las ramas afectadas las cuales pueden llegar a presentar muerte en la región apical. Durante la infección es común que los frutos que se forman presenten caída prematura, pero aquellos que logran permanecer en el árbol se desarrollan de forma asimétrica.

La inversión de color de amarillo/anaranjado a verde en los frutos es un síntoma característico del HLB, por ello la enfermedad también es conocida como enverdecimiento de los cítricos. Otros daños que presenta el fruto son el engrosamiento y deformación de la columnela media. Los pedúnculos de los frutos presentan también la inversión de color ya que el extremo se torna de amarillo a naranja mientras que el extremo estilar continua verde. Los haces vasculares dentro del eje del fruto en el extremo peduncular tienen una mancha parduzca (Bové, 2006).

En ocasiones el albedo se engrosa en el extremo peduncular y no así en el extremo estilar. Las semillas de los frutos afectados son pequeñas, atrofiadas, oscuras de color marrón a negro y abortadas (EPPO, 2014). Es importante considerar que los síntomas asociados a HLB (moteado asimétrico, amarillamiento y engrosamiento de nervadura) son producto de la interferencia que ocasiona el patógeno sobre el movimiento de nutrientes a través de los tejidos del floema, propiciando así el desarrollo de la enfermedad en las partes de la planta que presentan deficiencias nutricionales (Paredes-Tomás *et al.*, 2015).

Esta interferencia no es exclusiva de *Ca. Liberibacter* ya que existen reportes de la presencia de dos fitoplasmas asociados a síntomas similares a los que ocasiona HLB: Pigeon pea witches'-broom phytoplasma reportado en Brasil y México (Teixeira *et al.*, 2008; Alanís-Martínez *et al.*, 2013) y *Candidatus* Phytoplasma asteri reportado en China, donde cerca de 50% de las muestras analizadas resultaron positivas tanto para el fitoplasma como para *Ca. Liberibacter* (Chen *et al.*, 2009). Las inspecciones periódicas en plantaciones cítricas encaminadas a la búsqueda de plantas con síntomas característicos de HLB, así como toma de muestras de material vegetal para su posterior análisis son actividades que permiten la detección temprana de árboles infectados y mitigar así la dispersión de la enfermedad (SENASICA, 2012).

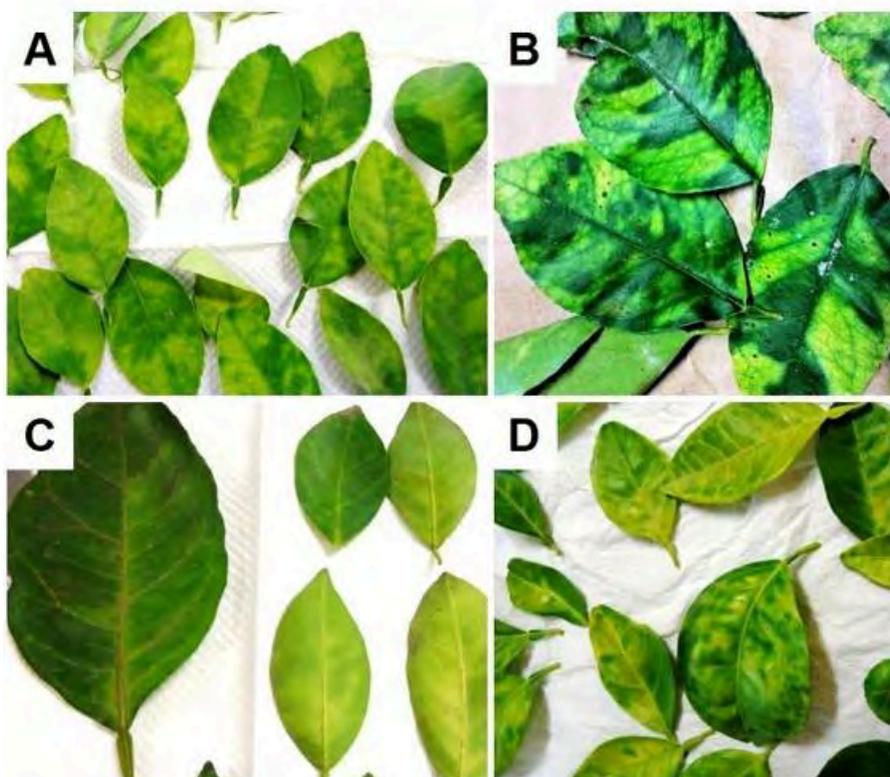
Muestreo

Los métodos de muestreo son críticos para la detección, identificación y cuantificación de las especies de *Ca. Liberibacter*, ya que su distribución en plantas hospedantes puede ser irregular. Los árboles infectados con CLas pueden presentar hojas sintomáticas sólo en algunas ramas del árbol y otras pueden mantenerse libres de la infección o presentar una baja titulación bacteriana, debido a una distribución irregular en el árbol (Teixeira *et al.*, 2008). Además de las diferencias en la distribución de CLas en los árboles, existen diferencias en la expresión de los síntomas característicos asociados a la enfermedad.

En México, se ha observado que la intensidad del moteado asimétrico se manifiesta en forma diferente dependiendo de la especie. En cítricos ácidos como el limón persa o limón mexicano, las manchas son más angulares y de color más contrastante en comparación con el moteado que presentan los cítricos dulces (Figura 1). Adicionalmente, al inicio de la infección los síntomas pueden estar presentes o ausentes, por lo que no se deben descartar plantas asintomáticas. En

árboles asintomáticos sospechosos, se colectan de 1 a 4 ramas de un año de edad con 5 a 10 hojas, tomadas de cuatro puntos de la parte superior del árbol.

Figura 1. Síntomas de HLB en hojas de cítricos. A) limón mexicano: amarillamiento seguido de un moteado con manchas angulares asimétricas en ambos lados de la nervadura principal; B) limón persa: engrosamiento de la nervadura central ocasionando un aspecto corchoso, presencia de islas verdes y distorsión foliar; C) mandarina: moteado difuso, aclaramiento y engrosamiento de las nervaduras; y D) naranja dulce: acorchado y aclaramiento de las nervaduras, distorsión foliar, presencia de islas verdes. Fotografías: Alanis-Martínez.



En el caso de árboles pequeños de vivero, se colectan de 4 a 6 hojas maduras de cada árbol o planta. En árboles con síntomas, se colectan muestras de 1 a 4 ramas con hojas sintomáticas. Para la detección de la bacteria, el tejido óptimo es la nervadura central y el peciolo de las hojas (NAPPO, 2012)

Cuando no se disponga de hojas, o se quiera analizar frutos, es recomendable tomar el tejido de la extremidad del pedúnculo o de la corteza de éste (Li *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2017). Por otro lado, el análisis del insecto vector es una estrategia adicional para detectar a CLas cuando aún no se observan plantas sintomáticas, o bien para delimitar la incidencia de la enfermedad en una región determinada.

El resultado positivo de un análisis de muestras de psílidos es útil para llevar a cabo acciones de manejo. Debido a que las ninfas del psílido adquieren la bacteria mediante su alimentación, una muestra de ninfas positiva, indicaría que la planta de donde se colectaron está infectada, mientras que un adulto positivo a CLas puede indicar la presencia de árboles infectados en la zona (Manjunath *et al.*, 2008).

Aún cuando esta estrategia es costosa porque implica analizar un gran número de muestras de psílidos, derivado de la presencia de altas poblaciones de *D. citri* en algunas regiones citrícolas,

la colecta y análisis del vector es una estrategia útil debido a que funciona como guía hacia las plantas enfermas visualmente sanas y que son la fuente de inóculo.

En México se realizan muestreos periódicos en huertas comerciales, viveros, zonas urbanas y rurales para determinar si los psílicos son portadores de la bacteria. En las huertas, los psílicos se colectan de diferentes árboles a fin de cubrir el total de la superficie. Estos se deben conservar en alcohol etílico al 70% en frascos viales debidamente sellados hasta su análisis (SENASICA, 2012).

Aislamiento en medios de cultivo y la problemática

En las dos últimas décadas se han hecho grandes esfuerzos por aislar (cultivar) la bacteria CLas en cultivo puro; sin embargo, solamente ha sido posible cultivarla transitoriamente. Davis *et al.* (2008) hicieron un intento por aislar CLas usando formulaciones de medio basal babaco (BBM), en respuesta al crecimiento de otra bacteria que parece estar relacionada a *Ca. Liberibacter* basada en las identidades del gen 16S ARNr.

La otra bacteria que se encontraba en los cultivos fue una actinobacteria emparentada a *Propionibacterium acnes* identificada con el gen 16S ARNr, lo que sugiere que las bacterias podrían estar beneficiándose mutuamente en el cultivo y no sobrevivir de manera independiente.

Sechler *et al.* (2009) desarrollaron un medio de cultivo denominado 'Liber A', compuesto por extracto de nervaduras de cítricos, de un factor de crecimiento (NADP) y de un inhibidor de la síntesis de proteínas eucariotas (cicloheximida). *Ca. Liberibacter asiaticus* y *Ca. L. americanus* crecieron inicialmente en este medio; sin embargo, después de cuatro a cinco transferencias declinó la viabilidad de los cultivos. Posteriormente, Parker *et al.* (2014) mostraron que los medios suplementados con jugo comercial de cítricos prolongaban la viabilidad de CLas hasta por 18 días; sugiriendo que las condiciones como el pH, azúcares, abundancia de elementos minerales específicos y amino ácidos, podrían contribuir a la viabilidad de la bacteria.

Por otro lado, Fujikawa *et al.* (2018) mostraron que la supervivencia de CLas depende de la interacción de este patógeno con un subconjunto específico de microbiota. Recientemente, se reportó el establecimiento y mantenimiento de cultivos de CLas por períodos prolongados en biopelículas derivadas de tejidos de cítricos infectados con el patógeno (Ha *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que CLas es capaz de sobrevivir independientemente de insectos o plantas hospederas. Sin embargo, se necesita la reproducibilidad de estos hallazgos por otros grupos de investigación.

Detección molecular

Una gran variedad de métodos cualitativos han sido desarrollados para la detección e identificación de las tres especies de *Ca. Liberibacter*. Estos métodos incluyen la identificación de síntomas visuales, el indexado biológico, microscopía, quimio-fluorescencia y enzimo-inmunoanálisis de adsorción prueba de ELISA. Sin embargo, dichos ensayos requieren equipos costosos, personal capacitado en la preparación de las muestras y períodos prolongados para su realización (Lafleche y Bové, 1970; Roistacher, 1991; Garnier y Bové, 1993).

A partir de la segunda mitad de la década de los 90 y con el avance que tuvieron las técnicas de biología molecular, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por sus siglas en inglés, se comenzó a utilizar esta técnica para detectar *Ca. Liberibacter* empleando secuencias del ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), genes de proteínas ribosomales del operon # y otras regiones del genoma bacteriano como lo son el grupo de genes *tufB*, *secE*, *nusG*, *rplKAJL* y *rpoB* (Jagoueix *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Arredondo-Valdés *et al.*, 2016).

Los métodos de diagnóstico molecular basados en la PCR, son rápidos, sensibles, específicos y fiables y se han utilizado ampliamente para el diagnóstico clínico de *Ca. Liberibacter* asociados con el HLB en plantas y en los insectos vectores (Lin *et al.*, 2010). Actualmente, existen muchos ensayos de detección molecular basados en PCR, incluidos PCR convencional, PCR anidada SSR, LAMP, PCR de captura inmune, PCR digital en gotas y qPCR, las cuales se han utilizado para

detectar a las bacterias asociadas a HLB (Jagoueix *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; EPPO, 2014; Arredondo-Valdés *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2018).

La PCR convencional para la detección de HLB en cítricos, es una técnica rápida además, es eficiente para el diagnóstico preciso de HLB. Los primers empleados amplifican 226 pb. Aunque la técnica detecta casi todas las cepas de la bacteria CLas presenta limitaciones en su utilización. Otros ensayos de PCR convencional o de punto final utilizan primers específicos que amplifican secuencias del ADNr 16S.

Los primers OI1/O2c amplifican 1160pb, mientras que 606/LSS amplifican 500 pb y detectan a las tres especies de *Ca. Liberibacter*. Los primers GB1/GB3 son específicos para CLam y amplifican un fragmento de 1 027 pb (Jagoueix *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 2005; Fujikawa y Iwanami, 2012). Algunos ensayos de PCR convencional generan amplicones grandes (> 1 000 pb), dando como resultado menor sensibilidad y reproducibilidad en las detecciones (Lin *et al.*, 2010).

En ocasiones no es posible detectar a la bacteria (o su detección es inconsistente) debido a la distribución irregular en las plantas o a la baja concentración bacteriana. Por tales razones, los protocolos de PCR han mejorado la sensibilidad en la detección de *Ca. Liberibacter*. Las reacciones de PCR anidadas incrementan significativamente la sensibilidad al emplear un segundo par de primers en una segunda reacción (Hong *et al.*, 2019).

Un ensayo de PCR anidada para la detección *Ca. Liberibacter* utiliza los primers fDI y rD1 en la primera reacción de amplificación, cuyo producto amplificado sirve como ADN molde en la segunda amplificación empleando los primers OI1 y OI2c (Ding *et al.*, 2004). Ambos pares de primers fueron reportados para la identificación de CLas y CLaf (Jagoueix *et al.*, 1996). Esta técnica permite la detección de la bacteria aún en concentraciones bajas y se ha utilizado para mejorar la detección de las especies de *Ca. Liberibacter* asociadas con HLB en árboles clínicamente asintomáticos, especialmente en plantas de vivero así como en ensayos para analizar la posible transmisión por semilla (Deng *et al.*, 2007).

Otra variante de PCR utilizada en la actualidad y aceptada para el diagnóstico del HLB por las organizaciones regionales y nacionales de protección fitosanitaria de diversas partes del mundo North American Plant Protection Organization (NAPPO), Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), es la técnica PCR cuantitativa (qPCR) por sus siglas en inglés quantitative PCR la cual amplifica y cuantifica al mismo tiempo los productos conforme se van generando en tiempo real.

La técnica qPCR es aceptada por las entidades regulatorias como método de diagnóstico para determinar la presencia de la bacteria tanto en muestras de cítricos como en el vector debido a que la sensibilidad de detección de *Ca. Liberibacter* es hasta 10 veces más en relación con PCR anidada y de 100 a 1 000 veces más respecto a PCR convencional (Morgan *et al.*, 2012). Uno de los ensayos de qPCR que comúnmente se utiliza para la detección de HLB emplea los iniciadores y sonda desarrollados por Li *et al.* (2009), que están dirigidos a la secuencia de la región 16S del ADNr.

Este procedimiento permite la detección e identificación de las diferentes especies de *Ca. Liberibacter* utilizando el gen mitocondrial citocromo oxidasa (COX) como control endógeno de reacción. Otra técnica que se ha empleado para la detección de *Ca. Liberibacter* es la PCR digital en gotas (ddPCR), por sus siglas en inglés, la cual se basa en la utilización de gotas de emulsión de agua y aceite, en donde cada muestra se fracciona en 20 000 gotas y la amplificación PCR de las moléculas de ADN molde se realiza en cada gota de forma individual, permitiendo la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos en una muestra, sin la necesidad de una curva estándar (Hindson *et al.*, 2011).

En estudios comparativos de las técnicas de ddPCR y qPCR para la detección de *Ca. Liberibacter*, se ha reportado que ddPCR fue superior para detectar y cuantificar a CLas en concentraciones bajas. Como ejemplo, la detección de CLas en 40 muestras de campo mostró que seis de 13 muestras asintomáticas con un valor alto de C_T (>35) fueron detectadas como positivas al emplear

ddPCR, por lo que esta metodología tiene un gran potencial para el diagnóstico temprano de la infección causada por CLas (Zhong *et al.*, 2018).

En México, el protocolo oficial para la detección de *Ca. Liberibacter* utiliza la técnica de qPCR con los primers y sonda propuestos por Li *et al.* (2009). Es importante destacar que el protocolo señalado demostró ser el mejor método para la detección de CLas y CLaf en una evaluación internacional de tres métodos de diagnóstico de PCR en tiempo real recomendados por la EPPO y la FAO, en la que participaron ocho laboratorios.

Dicha evaluación consideró parámetros de especificidad, sensibilidad analítica, repetibilidad y reproducibilidad. Los métodos recomendados para la detección de HLB son el método de Li *et al.* (2009) y la PCR convencional dúplex (Teixeira *et al.*, 2005). La combinación de estos métodos puede minimizar el riesgo de liberar material infectado, aspecto de suma importancia para los programas de certificación de material propagativo de cítricos, ya que estos métodos producen muy pocos resultados falsos positivos.

Aún cuando la PCR y la qPCR son métodos importantes para el diagnóstico de enfermedades de las plantas, otros factores como el método de muestreo, tamaño y tipo de muestra, así como la calidad y cantidad de ADN empleado tienen impacto en la eficiencia para la detección del HLB. Los procedimientos de extracción de ADN deben elegirse de acuerdo a los criterios de calidad e integridad para evitar la inhibición parcial o total de la PCR (Yang *et al.*, 2021).

Los tejidos de las plantas contienen sustancias como polisacáridos, polifenoles, pectina y xilano, que pueden extraerse conjuntamente con el ADN. Estas sustancias repercuten en la eficiencia de las reacciones de PCR afectando la sensibilidad de la técnica (Demeke y Jenkins, 2010). La pureza y cantidad de ADN son factores que influyen en la detección de CLas.

La elección del método de extracción depende en cierta medida de los costos y del tiempo disponible para esta actividad. El método CTAB (Doyle y Doyle, 1987) comúnmente utilizado para la extracción de ADN de muestras vegetales para la detección de HLB, ha sido modificado con el objetivo de determinar parámetros como concentración y pureza del ADN obtenido y su efecto en la detección de las especies asociados a HLB (Nauman *et al.*, 2021).

En la actualidad se dispone de varios kits comerciales para el aislamiento rápido y eficaz del ADN genómico. Estos kits utilizan detergente para romper la pared celular como paso inicial para extraer ADN del material vegetal y algunos utilizan matrices basadas en sílice o perlas magnéticas que permiten la unión del ADN. El éxito de la extracción de ADN depende del tipo de muestra. Un kit que puede resultar adecuado para la extracción de ADN de un tipo de matriz puede no serlo para otra (Demeke y Jenkins, 2010).

En ese sentido, a estas metodologías también se les realizan modificaciones para mejorar el rendimiento del ADN, o bien para reducir el tiempo de ejecución (Oppert *et al.*, 2019). De manera general, los kits de extracción de ADN comerciales simplifican el procedimiento y reducen el riesgo de contaminación cruzada.

Otros métodos de detección

Existen otros métodos para la detección de HLB, algunos de estos se acercan a un 100% de precisión en la detección de la enfermedad cercana a la exactitud de la PCR. La detección por espectrometría es una opción viable y rápida para detectar HLB hoy en día. Existen varios métodos de detección de análisis y reconocimiento de patrones de la enfermedad en imágenes por medio de cámaras, y otros que adquieren información espectroscópica a través de diferentes dispositivos (Ranulfi *et al.*, 2016).

Las imágenes espectroscópicas permiten identificar moléculas desconocidas empleando la visión por computadora para detectar HLB. Esto se puede hacer utilizando una combinación de imágenes del espectro electromagnético con cámaras especiales. Otra opción es mediante la adquisición de imágenes en el espacio de color visible; es decir, imágenes a color (Ranulfi *et al.*, 2016).

Espectrometría

Los volátiles liberados por las plantas están estrechamente relacionados con el metabolismo de las plantas y pueden servir como indicador de la salud de las plantas. El análisis químico de estos compuestos liberados que emanan de los árboles infectados han sido estudiados para la detección del HLB. Aksenov *et al.* (2014), emplearon métodos analíticos como cromatografía de gases/espectrometría de masas y cromatografía de gases/espectrometría de movilidad diferencial para detectar compuestos volátiles orgánicos que liberan las plantas de cítricos infectadas con HLB.

El estudio de los compuestos orgánicos volátiles producidos por plantas de cítricos se realizó *in situ* e *in vitro*. Este método de detección tiene una alta precisión de 90% durante todo el año, cercano al 100% en condiciones de pruebas óptimas, aun en etapas muy tempranas de infección. Xue *et al.* (2022), emplearon un método de espectrometría de masas con ionización por electropulverización extractiva (EMIEE) para analizar los metabolitos en hojas no infectadas e infectadas de HLB, de naranja Newhall navel.

Los resultados de este estudio mostraron que las hojas no infectadas se podían distinguir de las infectadas con HLB fácilmente con EMIEE combinándolo con un análisis multivariable. Encontraron nueve compuestos fenólicos involucrados en la ruta de los fenilpropanoides, principalmente ácido p-cumárico, naringina y apigenina, siendo estos los componentes principales para distinguir las hojas no infectadas de las infectadas de naranja Newhall navel. Verificaron los resultados del análisis de EMIEE empleando qPCR para determinar el contenido bacteriano de las hojas de naranjo.

El estudio proporciona una nueva estrategia para la detección temprana de HLB. Con este estudio los autores sugieren el mecanismo de la regulación de la ruta de fenilpropanoides en la respuesta de los cítricos a *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Wetterich *et al.* (2017), detectaron HLB mediante la combinación de una técnica de espectrometría de imágenes de fluorescencia y dos métodos de aprendizaje automático, discriminando HLB del estrés por deficiencias de zinc en muestras de Florida, EUA. Los métodos de clasificación fueron: 1) máquina de vectores de soporte (MVS); y 2) la red neuronal artificial (RNeA). Según los resultados de clasificación presentaron una precisión de 92.8% con el método MVS y 92.2% con RNeA, lo que en conjunto indica que se puede diferenciar la detección de HLB de las deficiencias de zinc.

El diagnóstico de cítricos asintomáticos con HLB utilizando migración y transformación de elementos mediante espectroscopía de descomposición inducida por láser (EDIL), es otro método empleado para detectar HLB. La EDIL es una técnica de espectrometría atómica para el análisis de componentes de materiales. A través del análisis de la absorción el progreso infectivo sobre la naranja navel se puede monitorear de manera efectiva en tiempo real, ya que detecta el efecto inhibitorio del patógeno sobre la absorción de la naranja navel.

En un estudio realizado con esta técnica, se utilizaron naranjas navel sanas y asintomáticas con HLB colectadas en campo para mejorar la eficiencia de detección, empleando EDIL acoplado con algoritmos MVS para distinguir entre naranjas navel sanas de naranjas navel asintomáticas con HLB. De acuerdo con los resultados obtenidos, la técnica tiene una precisión de clasificación de 100%.

La EDIL combinada con métodos quimiométricos parece ser una herramienta prometedora para distinguir rápidamente muestras sanas y asintomáticas al HLB a pesar de tener composiciones elementales similares. La ventaja y lo novedoso de esta técnica es que es significativamente mejor que la PCR diagnosticando frutos de cítricos asintomáticos con HLB (Yang *et al.*, 2022).

Por otra parte, en un estudio realizado por Ponce *et al.* (2018), se demostró la discriminación rápida y eficiente entre cítricos sanos e infectados con Ca. L mediante espectroscopía de descomposición inducida por láser combinada con análisis quimiométrico.

El método radica en la toma de 'huella (fingerprint)' de plantas sanas y enfermas en función de sus constituyentes orgánicos e inorgánicos, y el uso de un láser multipulso acoplado a un

microscopio para tomar espectros del floema de la planta. Los árboles sanos y enfermos con HLB se diferenciaron con un alto grado de precisión. El método toma solo unos minutos, es económico, no requiere productos químicos ni preparación de muestras y no genera desechos.

Imágenes satelitales

Yzquierdo-Alvarez *et al.* (2022), desarrollaron una metodología práctica, rápida y de bajo costo para detectar plantas con síntomas de HLB usando imágenes del satélite Sentinel-2. Las imágenes de Sentinel-2 se utilizaron para realizar una clasificación supervisada para discriminar árboles de limón persa sanos y árboles con HLB, los cuales fueron verificados por qPCR. Con base en las firmas espectrales obtenidas de la imagen satelital a través de la clasificación supervisada, se generaron 11 clases para el estudio.

Los resultados obtenidos mostraron que en las regiones de la onda verde (560 nm), roja (665 nm) e infrarroja cercana (705 nm), la respuesta espectral de los árboles con HLB fue mayor que la de los árboles sanos con una precisión de 0.84%, por lo que el uso de imágenes de satélite Sentinel-2 puede ser útil para detectar oportunamente plantas con síntomas de HLB.

Redes neuronales

He *et al.* (2022), utilizaron una combinación de imágenes de fluorescencia multicolor con imágenes de reflectancia multiespectral sincrónicamente, para la detección rápida de HLB basada en la red neuronal convolucional ligera (RNCL) MobileNetV3, utilizando un dispositivo portátil. La RNCL se aplicó para la detección de síntomas de HLB capacitada en el conjunto de datos de naranja navel. Se evaluó el desempeño discriminante de los modelos (MobileNetV3) establecidos en imágenes de fluorescencia multicolor, imágenes de reflectancia multiespectral y sus combinaciones respectivamente.

Como resultados obtuvieron que la RNCL utilizada puede lograr una precisión de 92.1% con una tasa de falsos negativos del 12.1% (número de veces= 33) al combinar fluorescencia multicolor con imágenes de reflectancia multiespectral como entrada del modelo MobileNetV3 utilizando datos de naranja navel. Mientras que el método de transferencia de aprendizaje del modelo de ajuste fino obtuvo una capacidad de transferencia superior a la del modelo de reutilización con una precisión de 96.5% para Ponkan.

En un estudio realizado por Syed-Ab-Rahman *et al.* (2022), detectaron y clasificaron enfermedades de cítricos empleando un modelo de aprendizaje profundo basado en anclaje de extremo a extremo. El modelo basado en redes neuronales convolucionadas, una clase de redes neuronales profundas emplea dos etapas principales: 1) propone las posibles áreas enfermas objetivo, utilizando una red de propuestas regionales; y 2) clasifica el área objetivo más probable a la clase de enfermedad correspondiente usando un clasificador. El modelo propuesto puede detectar y clasificar HLB con una precisión del 94.6%.

Gómez-Flores *et al.* (2019), diseñaron un método para detectar HLB basado en el análisis de textura de intensidad invariable de imágenes en el espectro visible. Emplearon la transformación de ranklet para convertir la imagen de entrada en una representación de intensidad invariable de las que extrajeron las características de textura comunes.

Utilizaron un clasificador de bosque aleatorio para distinguir entre distintas clases de hojas de cítricos, incluidas las sanas, las deficientes de nutrientes y las de HLB. Lograron una precisión de alrededor del 95% para distinguir entre las clases HLB negativas y las positivas, y una precisión de alrededor del 81% para identificar entre seis clases de hojas de cítricos. Una ventaja que tiene este método es su posible uso dentro de una aplicación móvil que se pueda utilizar en el campo para detectar plantas de cítricos sintomáticas con HLB.



Análisis de imágenes de concentración de almidón

En un estudio usando un sistema de visión por computadora casero con dos modos de imagen, evaluaron la contribución de dos síntomas, basándose en la acumulación de almidón foliar inducida por HLB, para la detección de esta enfermedad (Xu *et al.*, 2022). Se utilizó una fuente de luz de 660 nm y se midió la absorción de diferentes longitudes de onda por clorofila y luteína. La transmisión de imágenes se diseñó para detectar una acumulación anormal de almidón dentro de la hoja.

Se tomó una imagen con luz polarizada de 590 nm penetrando la hoja, luego se calculó el ángulo de polarización lineal mediante el vector de Stokes. Después se evaluaron los clasificadores de perceptrón multicapa, bosque aleatorio y regresión logística. El clasificador de bosque aleatorio en el experimento de reflexión mostró una precisión de clasificación del 96.67%. Mientras que el experimento de transmisión con el clasificador de regresión logística tuvo una tasa de reconocimiento de 83.33% (Xu *et al.*, 2022).

Drones

Recientemente se han realizado grandes avances en agricultura de precisión, utilizando tecnologías que emplean vehículos aéreos no tripulados, como los drones, con la finalidad de identificar y monitorear de forma autónoma las enfermedades en plantas. La importancia de la agricultura de precisión radica en que el diagnóstico de enfermedades en cultivos de interés agronómico es una de las principales tareas para aumentar la producción de alimentos con ello reduciendo el tiempo y las jornadas de trabajo (Neupane y Baysal-Gurel, 2021).

En lo que respecta a la detección de HLB, varios estudios se han realizado mediante la utilización de drones. Garcia-Ruiz *et al.* (2013) capturaron imágenes aéreas de alta resolución y junto con un sensor de imágenes multibanda, encontraron valores de precisión en el rango de 67 a 85% y falsos negativos entre 7% y 32%, y aunque, la detección aérea mostró resultados alentadores para la detección de árboles infectados, los valores fueron bajos con respecto a otras técnicas de detección.

Actualmente, la empresa VetorGEO ha desarrollado un sistema basado en la utilización de drones que emplean sensores multispectrales de alta resolución de Agrowing Ltd., los cuales capturan un gran número de imágenes que permiten el aprendizaje mediante la inteligencia artificial de los algoritmos, con lo cual se calibra la firma espectral de la sintomatología del HLB en distintas variedades de naranja sin importar el desarrollo fenológico de los árboles, tiempo desde que ocurrió la infección, utilización de sistemas de riego, tipo de manejo dado a las huertas, etc. (Ira Dvir [Agrowing] y Neto Salvador [VetorGeo], com. per.).

La tecnología desarrollada ha permitido la evaluación de grandes superficies cultivadas con cítricos en Brasil. Los resultados arrojados por esta herramienta de diagnóstico son comparables a los que se obtienen mediante PCR punto final, (Ira Dvir [Agrowing] y Neto Salvador [VetorGeo], com. per.) por lo que se espera que en un futuro cercano se pueda utilizar a gran escala.

Conclusiones

Los protocolos para la detección de HLB se han ido perfeccionado a través del tiempo. El cultivo en medios artificiales de *Candidatus Liberibacter* spp. ha tenido avances; sin embargo, continua siendo un reto, por lo que se requieren estudios innovadores sobre la interacción de la bacteria con la microbiota presente en el floema de plantas infectadas. Se han ido perfeccionando, las técnicas moleculares, se han desarrollado diversos métodos que involucran la determinación de diferentes compuestos producidos durante la infección y el procesamiento de imágenes que permiten una detección oportuna del HLB; no obstante, aún se requiere realizar más investigaciones para que estas puedan incorporarse en la agricultura de precisión.



Bibliografía

- 1 Akseonov, A. A.; Pasamontes, A.; Peirano, D. J.; Zhao, W.; Dandekar, A. M.; Fiehn, O.; Ehsani, R. and Davis, C. E. 2014. Detection of huanglongbing disease using differential mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 86(5):2481-2488. <https://doi.org/10.1021/ac403469y>.
- 2 Alanís-Martínez, E. I.; Rojas-Martínez, R. I. y Cora-Valencia, E. 2013. Detección del fitoplasma del grupo 16SrIX, estrechamente relacionado a pigeon pea witches' broom phytoplasma, en plantas de cítricos con síntomas asociados a HLB. Póster presentado al XL Congreso Nacional y XV Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Huatulco, México.
- 3 Arredondo-Valdés, R.; Delgado-Ortiz, J. C.; Beltrán-Beache, M.; Anguiano-Cabello, J.; Cerna-Chávez, E.; Rodríguez-Pagaza, Y. and Ochoa-Fuentes, Y. M. 2016. A review of techniques for detecting Huanglongbing (greening) in citrus. *Can J. Microbiol.* 62(10):803-811. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0022>.
- 4 Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88(1):7-37.
- 5 Bové, J. M. 2014. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of gondwanan origin: will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica.* 42(5):579-583. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0415-4>.
- 6 Chen, J.; Pu, X.; Deng, X.; Liu, S.; Li, H. and Civerolo, E. 2009. A phytoplasma related to '*Candidatus Phytoplasma asteris*' detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in guangdong, PR China. *Phytopathology.* 99(3):236-242. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-3-0236>.
- 7 Davis, M. J.; Mondal, S. N.; Chen, H.; Rogers, M. E. and Brlansky, R. H. 2008. Co-cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' with actinobacteria from citrus with huanglongbing. *Plant Dis.* 92(11):1547-1550. <https://doi.org/10.1094/pdis-92-11-1547>.
- 8 Demeke, T. and Jenkins, G. R. 2010. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real time PCR assay of biotechnology derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396(6):1977-1990. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3150-9>.
- 9 Deng, X.; Zhou, G.; Li, H.; Chen, J. and Civerolo, L. E. 2007. Nested PCR detection and sequence confirmation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from *Murraya paniculata* in guangdong, China. *Dis. Notes.* 91(8):1051. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1051C>.
- 10 Ding, F.; Yi, G. and Wang, G. 2004. Research on the PCR and nested PCR detection of citrus huanglongbing. *Acta Hort. Sin.* 31(6):803-806. <https://www.ahs.ac.cn/EN/Y2004/V31/I6/803>.
- 11 Ding, F.; Paul, C.; Brlansky, R. and Hartung, J. S. 2017. Immune tissue print and immunecapture PCR for diagnosis and detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Sci. Rep.* 7(1):46467. <https://doi.org/10.1038/srep46467>.
- 12 Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19(1):11-15.
- 13 EPPO. 2014. European and mediterranean plant protection organization. *Liberibacter americanus*' and '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *EPPO Bull.* 44(1):376-389. <https://doi.org/10.1111/epp.12161>.
- 14 Fujikawa, T. and Iwanami, T. 2012. Sensitive and robust detection of citrus Greening (Huanglongbing) bacterium "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" by DNA amplification with new 16S rDNA-specific primers. *Mol. Cell. Probes.* 26(5):194-197. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2012.06.001>.
- 15 Fujikawa, K.; Iwanami, T. and Fujikawa, T. 2018. Alterations of *Candidatus Liberibacter asiaticus* associated microbiota decrease survival of *Ca. L. asiaticus* in *in vitro* assays. *Front. Microbiol.* 9(1):3089. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03089>.

- 16 Garcia-Ruiz, F.; Sankaran, S.; Maja, J. M.; Lee, W. S.; Rasmussen, J. and Ehsani, R. 2013. Comparison of two aerial imaging platforms for identification of Huanglongbing infected citrus trees. *Comput. Electron. Agric.* 91(2):106-115.
- 17 Garnier, M. and Bové, J. M. 1993. Citrus greening disease. in: proceedings of the twelfth conference of the international organization of citrus virologists IOCV. american phytopathological press. Riverside, CA. 212-219 pp.
- 18 Gómez-Flores, W.; Garza-Saldaña, J. J. and Varela-Fuentes, S. E. 2019. Detection of Huanglongbing disease based on intensity-invariant texture analysis of images in the visible spectrum. *Comput. Electron. Agric.* 162(7):825-835. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.05.032>.
- 19 Ha, P. T.; He, R.; Killiny, N.; Brown, J. K.; Omsland, A.; Gang, D. R. and Beyenal, H. 2019. Host-free biofilm culture of "*Candidatus liberibacter asiaticus*" the bacterium associated with Huanglongbing. *Biofilm.* 1(1):100005. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100005>.
- 20 He, C.; Li, X.; Liu, Y.; Yang, B.; Wu, Z.; Tan, S.; Ye, D. and Weng, H. 2022. Combining multicolor fluorescence imaging with multispectral reflectance imaging for rapid citrus Huanglongbing detection based on lightweight convolutional neural network using a handheld device. *Comput. Electron. Agric.* 194(3):106808. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.106808>.
- 21 Hindson, B. J.; Ness, K. D.; Masquelier, D. A.; Belgrader, P.; Heredia, N. J.; Makarewicz, A. J.; Bright, I. J.; Lucero, M. Y.; Hiddessen, A. L. and Legler, T. C. 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 83(22):8604-8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>.
- 22 Hong, Y.; Luo, Y.; Yi, J.; He, L.; Dai, L.; and Yi, T. 2019. Screening nested-PCR primer for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing and application in Hunan, China. *Plos One.* 14(2):1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212020>.
- 23 Jagoueix, S.; Bové J. M. and Garnier, M. 1996. PCR detection of the two '*Candidatus*' Liberibacter species associated with greening disease of citrus. *Mol. Cell. Probes* 10(1):43-50. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1996.0006>.
- 24 Lafleche, D. and Bové, J. M. 1970. Mycoplasmes dans les agrumes atteints de "greening", de stubborn, on des maladies similaires. *Fruits.* 25(6):455-465. <https://agritrop.cirad.fr/421918/>.
- 25 Li, W.; Hartung, J. S. and Levy, L. 2009. Quantitative real time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *J. Microbiol. Methods.* 66(1):104-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>.
- 26 Lin, H.; Chen, C.; Doddapaneni, H.; Duan, Y.; Civerolo, E. L.; Bai, X. and Zhao, X. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *J. Microbiol. Methods.* 81(1):17-25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.014>.
- 27 Manjunath, K. L.; Halbert, S. E.; Ramadugu, C.; Webb, S. and Lee, R. F. 2008. Detection of '*CandidatusLiberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in florida. *Phytopathology* . 98(4):387-396. <https://doi.org/10.1094/phyto-98-4-0387>.
- 28 Morgan, J. K.; Zhou, L.; Li, W.; Shatters, R. G.; Keremane, M. and Duan, Y. P. 2012. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Mol. Cell. Probes* 26(2):90-98. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.12.001>.
- 29 Nauman, M.; Umar, U. U. D.; Naqvi, S. A. H.; Rehman, A. U.; Malik, M. T.; Shahid, M.; Akbar, M. and Umair, M. 2021. Impact of improved DNA extraction method from citrus leaves midrib and PCR for the detection of citrus greening (*Candidatus Liberibacter*). *Pakistan. J. Phytopatol.* 33(1):161-170. <https://doi.org/10.33866/phytopathol.033.01.0671>.

- 30 Neupane, K. and Baysal-Gurel, F. 2021. Automatic identification and monitoring of plant diseases using unmanned aerial vehicles: a review. *Remote sens.* 13(19):1-23. <https://doi.org/10.3390/rs1319384>.
- 31 NAPPO. 2012. North american plant protection organization. Secretariat of the north american plant protection organization. <https://nappo.org/application/files/6515/8322/7229/NAPPO-HLB-DP-2-2012-04-10-e.pdf>.
- 32 Oppert, B.; Stoss, S.; Monk, A. and Smith, T. 2019. Optimized extraction of insect genomic dna for long read sequencing. *Methods and Protocols.* 2(4):1-7. <https://doi.org/10.3390/mps2040089>.
- 33 Paredes-Tomás, C.; Luis-Pantoja, M.; Collazo-Cordero, C.; Peña-Bárcaga, I.; López-Hernández, D.; Batista-Le Riverend, L.; y Hernández-Rodríguez, L. 2015. Diferencias en la manifestación de síntomas asociados a la enfermedad Huanglongbing (HLB) en diferentes especies cítricas en Cuba. *CitriFrut.* 32(2):36-41.
- 34 Parker, J. K.; Wisotsky, S. R.; Johnson, E. G.; Hijaz, F. M.; Killiny, N.; Hilf, M. E. and Fuente, L. 2014. Viability of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' prolonged by addition of citrus juice to culture medium. *Phytopathology.* 104(1):15-26. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-13-0119-r>.
- 35 Ponce, L.; Etxeberria, E.; Gonzalez, P.; Ponce, A. and Flores, T. 2018. Rapid identification of huanlongbing-infected citrus plants using laser induced breakdown spectroscopy of phloem samples. *Appl. Opt.* 57(30):8841-8844. <https://doi.org/10.1364/ao.57.008841>.
- 36 Ranulfi, A. C.; Cardinali, M. C. B.; Kubota, T. M. K.; Freitas-Astúa, J.; Ferreira, E. J.; Bellele, B. S.; Silva, M. F. G. F.; Villas Boas, P. R.; Magalhães, A. B. and Milori, D. M. B. P. 2016. Laser induced fluorescence spectroscopy applied to early diagnosis of citrus huanglongbing. *biosyst. Eng.* 144(4):133-144. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.02.010>.
- 37 Roistacher, C. N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome, Italy. 193-261 pp.
- 38 Sechler, A.; Schuenzel, E. L.; Cooke, P.; Donnua, S.; Thaveechai, N.; Postnikova, E.; Stone, A. L.; Schneider, W. L.; Damsteegt, V. D. and Schaad, N. W. 2009. Cultivation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', '*Ca. L. africanus*', and '*Ca. L. americanus*' associated with Huanglongbing. *Phytopathology.* 99(5):480-486. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-5-0480>.
- 39 SENASICA. 2012. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Protocolo para establecer áreas regionales de control del huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos (ARCOs). 3, 24-27, 41-42 pp. <http://www.siafeson.com/sitios/simdia/docs/protocolos/ProtocoloparaestablecerAreasRegionalesARCOSDICIEMBRE2012.pdf>.
- 40 SENASICA. 2019. Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria. ficha técnica huanglongbing '*Candidatus Liberibacter spp.*' Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria dirección general de sanidad vegetal. 5-9 pp.
- 41 SIAP. 2022. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Anuario estadístico de la producción agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- 42 Syed-Ab-Rahman, S. F.; Hesamian, M. H. and Prasad, M. 2022. Citrus disease detection and classification using end-to-end anchor-based deep learning model. *Appl. Intell.* 52(1):927-938. <https://doi.org/10.1007/s10489-021-02452-w>.
- 43 Teixeira, D. C.; Danet, J. L.; Eveillard, S.; Martins, E. C.; Jesus-Junior, W. C.; Yamamoto, P. T.; Aparecido-Lopes, S.; Beozzo-Bassanezi, R.; Ayres, A. J.; Saillard, C. and Bové, J. M. 2005. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' *Liberibacter* species associated with the disease. *Mol. Cell. Probes.* 19(3):173-179. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.11.002>.
- 44 Teixeira, D. D. C.; Wulff, N. A.; Martins, E. C.; Kitajima, E. W.; Bassanezi, R.; Ayres, A. J.; and Bové, J. M. 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16sr ix) is associated with citrus Huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology.* 98(9):977-984.

- 45 Wetterich, C. B.; Felipe de Oliveira, N. R.; Belasque, J.; Ehsani, R. and Marcassa, L. G. 2017. Detection of huanglongbing in florida using fluorescence imaging spectroscopy and machine-learning methods. *Appl. Opt.* 56(1):15-23. <https://doi.org/10.1364/ao.56.000015>.
- 46 Xu, Q.; Cai, J.; Zhang, W.; Bai, J.; Li, Z.; Tan, B. and Sun, L. 2022. Detection of citrus Huanglongbing (HLB) based on the HLB-induced leaf starch accumulation using a home-made computer vision system. *Biosyst. Eng.* 218(6):163-174. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2022.04.018>.
- 47 Xue, A.; Liu, Y.; Li, H.; Cui, M.; Huang, X.; Wang, W.; Wu, D.; Guo, X.; Hao, Y. and Luo, L. 2022. Early detection of huanglongbing with EESI-MS indicates a role of phenylpropanoid pathway in citrus. *Anal. Biochem.* 639(4):114511. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2021.114511>.
- 48 Yang, Y.; Zhou, Q.; Zahr, K.; Harding, M. W.; Feindel, D. and Feng, J. 2021. Impact of DNA extraction efficiency on the sensitivity of PCR based plant disease diagnosis and pathogen quantification. *Eur. J. Plant Pathol.* 159(3):583-591. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02189-1>.
- 49 Yang, P.; Nie, Z. and Yao, M. 2022. Diagnosis of HLB-asymptomatic citrus fruits by element migration and transformation using laser induced breakdown spectroscopy. *Opt. Express.* 30(11):18108. <https://doi.org/10.1364/oe.454646>.
- 50 Yzquierdo-Alvarez, M. E.; Ortiz-García, C. F. and Rincón-Ramírez, J. A. 2022. Detection of huanglongbing of citruses (*Citrus* sp.) through Sentinel 2satellite images in Huimanguillo, Tabasco, México. *Agro Productividad.* 14(12) <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i12.2053>.
- 51 Zhong, X.; Liu, X. L.; Lou, B. H.; Zhou, C. Y. and Wang, X. F. 2018. Development of a sensitive and reliable droplet digital PCR assay for the detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *J. Integr. Agric.* 17(2):483-487. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61815-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61815-X).



Métodos de detección de Huanglongbing en cítricos

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 February 2024
Date accepted: 01 June 2024
Publication date: 09 July 2024
Publication date: May-Jun 2024
Volume: 15
Issue: 4
Electronic Location Identifier: e3300
DOI: 10.29312/remexca.v15i4.3300

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

diagnóstico
espectrometría
imágenes
muestreo
PCR
síntomas

Counts

Figures: 1

Tables: 0

Equations: 0

References: 51

Pages: 0