



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI



SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE CONTROL DEL HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS

Joan Candela Ferre

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA (TFG)

Tutor Académico: Dra. Maria del Carmen Portillo Guisado (carmen.portillo@urv.cat)
Departamento de Bioquímica y Biotecnología

En cooperación con: Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universitat
Politécnica de València

Supervisores: Dra. Mari Carmen Herranz Gordo (cherranz@ibmcp.upv.es)
Dr. Vicente Pallás Benet (vpallas@ibmcp.upv.es)

Tarragona, Julio 2020

Jo, Joan Candela i Ferre, amb DNI "21806813F", sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueixen cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 10 de Julio de 2020

A handwritten signature in black ink that reads "Joan Candela". The signature is written in a cursive style with a long, sweeping underline that extends to the right.

Tabla de contenidos

Datos del centro de investigación.....	4
1. Resumen	5
2. Abreviaturas	6
3. Introducción.....	7
4. Objetivo	10
5. Enfermedad de Huanglongbing	11
5.1 Historia	11
5.2 Agente causal	12
5.3 Vectores	14
5.3.1 Psílido Asiático de los Cítricos	14
5.3.2 Trióximo Africano de los Cítricos.....	15
5.4 Sintomatología	16
6. Estrategias para prevenir o tratar el HLB	18
6.1 Control del Vector	19
6.2 Identificación y eliminación de los árboles afectados	20
6.3 <i>Clean Nursery Stock</i>	21
6.4 Aproximaciones terapéuticas para acabar con <i>CLas</i>	21
6.4.1 Combinación de antibióticos.....	22
6.4.2 Nutrición	24
6.4.3 Termoterapia	25
6.5 Especies de cítricos resistentes al HLB.....	26
6.5.1 Plantas transgénicas.....	26
7. Perspectivas de futuro	29
8. Conclusión.....	33
9. Metodología	34
10. Autoevaluación.....	35
11. Bibliografía.....	36

Datos del centro de investigación

El Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado a partir de la estancia en prácticas en el grupo de Virología Molecular de Plantas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), que es un instituto mixto de investigación de titularidad compartida entre el CSIC y la Universitat Politècnica de València.

Datos

Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP)

Grupo de Virología Molecular de Plantas

C/ Ingeniero Fausto Elio, s/n

46022 – Valencia, España

1. Resumen

Huanglongbing (HLB), también conocida como *greening*, es considerada mundialmente como la enfermedad más destructiva para la citricultura. En la actualidad, afecta a más de 140 países provocando grandes pérdidas en la industria citrícola, principalmente en Asia, Estados Unidos, Sudáfrica y Brasil. Las únicas regiones citrícolas libres de esta enfermedad son la Cuenca del Mediterráneo, Australia y Nueva Zelanda. El HLB está asociado a tres especies de una Alphaproteobacteria gram negativa; *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* y *Candidatus Liberibacter americanus* y se transmite por dos psílicos, *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*. Este agente bacteriano afecta a la salud de los árboles, así como al desarrollo, maduración y en definitiva a la calidad del fruto. Hasta la fecha no existe cura ni resistencia comercialmente implementable para el HLB, y una vez infectados, los cultivos a menudo se vuelven insostenibles debido a su bajo rendimiento. El manejo recomendado del HLB implica la identificación y eliminación de árboles infectados y un control exhaustivo del psílido evitando su entrada en zonas libres de la enfermedad. Muchos productores de cítricos están intentando mantener la producción de árboles infectados mediante la aplicación de cócteles nutricionales a los fertilizantes, tratamientos térmicos y antimicrobianos que pueden reducir los daños producidos por el HLB, pese a los costes que todo ello supone. Probablemente la solución más prometedora y en la que se centran muchas investigaciones, es la utilización de árboles transgénicos que ayuden a controlar el vector o que sean resistentes al patógeno, aunque se trate de un proceso largo y costoso.

Palabras clave: Huanglongbing, cítricos, ingeniería genética, *Candidatus Liberibacter*, Psílido Asiático de los Cítricos, Triórido Africano de los Cítricos.

2. Abreviaturas

ARNi	ARN de interferencia
Ca. L.	<i>Candidatus Liberibacter</i>
CBS	Citrus Black Spot
CLaf	<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>
CLam	<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>
CLas	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>
CLBV	<i>Virus del moteado de la hoja de los cítricos</i>
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CPsV	<i>Virus de la psorosis de los cítricos</i>
CRDF	Fundación de Desarrollo e Investigación de Cítricos
CTV	<i>Virus de la tristeza de los cítricos</i>
D. citri	<i>Diaphorina citri</i>
ENP	Programas nutricionales mejorados
EE. UU.	Estados Unidos
HLB	Huanglongbing
Lcr	<i>Liberibacter crescens</i>
PAM	Péptidos antimicrobianos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SAR	Resistencia sistémica adquirida
T. erytrae	<i>Trioza erytrae</i>
UE	Unión Europea

3. Introducción

Los cítricos son apreciados a nivel mundial por sus cualidades y forman parte esencial de la dieta humana. Son conocidos por su contenido en fibra, vitamina C, vitaminas del grupo B y carbohidratos, así como por su bajo aporte en grasas, lo que les hace especialmente beneficiosos para la salud. Previenen problemas digestivos, reducen los niveles de colesterol, confieren propiedades antioxidantes y un tienen papel protector frente a distintas enfermedades crónicas (1).

Existen dos grandes mercados para los cítricos; el mercado de fruta fresca y el de los productos procesados obtenidos a partir de dicha fruta como es el caso de mermeladas, gelatinas, aceites para la piel, productos de limpieza, alimento para mascotas y fitoquímicos como flavonoides.

Los cítricos se cultivan en cantidades variables alrededor de todo el mundo, en más de 140 países con clima tropical o subtropical (2). Entre ellos, las naranjas representan aproximadamente el 70% del total de la producción. Los principales países productores son Brasil, China, India, Estados Unidos (EE. UU.), Méjico, Egipto y algunos países de la Unión Europea (UE) (**Figura 1**). Concretamente, Brasil (32%), China (15%), India (14%), UE (12%) y EE. UU. (10%). Respecto al zumo de naranja, destacan principalmente dos áreas de producción, el Estado de São Paulo en Brasil (52%) y Florida en EE. UU. (20%) (3). Por tanto, en estos países, la industria de los cítricos supone un gran impacto económico, de hecho en EE. UU., se estima que tan solo en Florida es de más de 1.000 millones de dólares anuales (4).

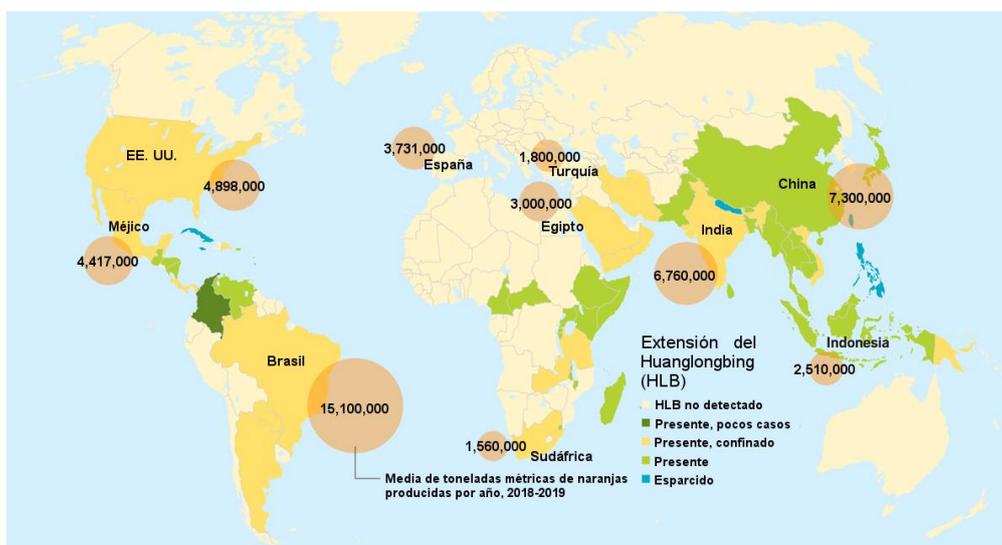


Figura 1. Producción de naranjas en toneladas métricas producidas por año (2018-2019) y extensión del Huanglongbing. Fuente: World Markets and Trade, USDA Foreign Agricultural Service 2019.

El establecimiento comercial del cultivo de cítricos es considerado como una inversión a largo plazo ya que los cítricos presentan un largo periodo juvenil y la mayoría de las especies requieren de 5 a 8 años para iniciar la floración y fructificación. Factores como la sequía, el frío, la salinidad del suelo y distintas enfermedades pueden limitar la producción y causar importantes pérdidas económicas. Desafortunadamente, este periodo de desarrollo tan prolongado en los cítricos, junto con su naturaleza sécil, favorece la acumulación y perpetuación de diferentes agentes causantes de enfermedades infecciosas en estas plantas, incluyendo las de etiología fúngica, bacteriana y viral (5).

Algunos de los ejemplos de enfermedades fúngicas que afectan a los cítricos son: la "Mancha Negra" o Citrus Black Spot (CBS) causada por el hongo *Phyllosticta citricarpa*, Gray Mold por *Botrytis cinérea* o el Mal Secco por *Phoma tracheiphila*. En lo que se refiere a las virosis, se podrían destacar entre otras, las provocadas por el *virus de la tristeza de los cítricos* (CTV), el *virus de la psorosis de los cítricos* (CPsV) y el *virus del moteado de la hoja de los cítricos* (CLBV). En general, todos estos patógenos, disminuyen el valor de los cultivos debido a su depreciación estética o la caída temprana de los frutos (6,7). Sin embargo, la mayoría de estas enfermedades son conocidas desde hace mucho tiempo y se han estudiado para combatirlas. Pese a sus limitaciones y desventajas, se han conseguido controlar de forma exitosa mediante el uso de fungicidas, insecticidas y otros métodos biológicos (5). En el caso del CTV, enfermedad vírica con el mayor impacto económico, se ha visto que el establecimiento de controles biológicos tales como la cuarentena, propagación de plantas libres de enfermedades (*clean stock*) y la protección cruzada, han sido efectivos para prevenir la introducción del virus en las áreas productoras de cítricos (6). No obstante, en los últimos años dos enfermedades de origen bacteriano han destacado por provocar grandes pérdidas en los cultivos: Citrus Canker y Huanglongbing (HLB). Aunque el HLB es la más devastadora, ambas suponen serias amenazas para la citricultura a nivel mundial, destacando Brasil y EE. UU., que, como líderes en cuanto a producción de cítricos, son los más perjudicados por estas enfermedades (8).

El impacto del HLB en Florida desde su aparición en 2005 ha causado gran preocupación, ya que en tan solo 4 años ha provocado la pérdida de alrededor del 10% de la capacidad de producción y más de 6.600 puestos de trabajo (9). Las pérdidas han ido creciendo hasta la actualidad, disminuyendo la producción de naranjas en más de un 80% con un correspondiente aumento de su precio del 90%, y la de pomelos, otro de los productos más cultivados en Florida, en más de un 75%, suponiendo un impacto de más de 4.600 millones de dólares y más de 30.000

empleos (10). Por tanto, no es de extrañar que, desde la aparición de la enfermedad en este Estado, se haya invertido en investigación para encontrar soluciones a corto, medio y largo plazo. De hecho, en 2008 se creó la Fundación de Desarrollo e Investigación de Cítricos (CRDF), organización responsable de investigar la enfermedad en Florida.

A pesar de que EE. UU. ha sido el país más afectado por el HLB, no ha sido el único (**Figura 1**). En China, donde se originó la enfermedad, la provincia de mayor producción, Jianxi, ha perdido más del 25% de sus arboledas. En Brasil, la enfermedad ha eliminado 52.6 millones de naranjos dulces, una reducción del 31% de la producción, correspondiente a una expansión aproximada de 100 mil hectáreas, desde su detección en 2004 (11).

En Europa, la situación es muy diferente, ya que la enfermedad aún no se ha detectado. En 2014 se sospechó de la aparición de un foco en el Algarve (Portugal) que posteriormente se descartó, sin embargo, llegó a producir la destrucción masiva de material vegetal de la zona afectada (12). Sin embargo, este mismo año, se detectó en Pontevedra uno de los insectos vectores de la bacteria fitopatógena, *Trioza erytreae*, y en tan solo tres años ha llegado hasta Almada (Portugal), a 400 km de distancia, una zona citrícola de este país.

Aún no se ha descrito ningún método efectivo para controlar el HLB. Hasta el momento, en las zonas donde se ha presentado, se ha intentado identificar y talar los árboles afectados, con el fin de prevenir su propagación. Además, en las zonas donde la enfermedad se ha expandido se han utilizado diferentes tratamientos como plaguicidas para controlar los vectores o antibióticos para acabar con las bacterias (13), métodos que han mostrado resultados moderadamente positivos en el alivio de la enfermedad. En cualquier caso, estos métodos de control resultan impracticables en la UE, dado que el uso tradicional de insecticidas químicos entra en conflicto con la regulación 2016/2031 de la directiva 128/2009 sobre el uso sostenible de pesticidas y las medidas prospectivas en el manejo integrado de plagas de la UE.

Teniendo en cuenta las pérdidas ocasionadas, así como, la carencia de métodos efectivos para el control del HLB, existe gran preocupación de que la enfermedad llegue a zonas productoras libres del patógeno, como Australia, Nueva Zelanda, y la Cuenca del Mediterráneo, principalmente a España, Turquía y Egipto, tres de los mayores productores de cítricos en todo el mundo (13). Por ello, es importante anticiparse a la posible aparición de la enfermedad profundizando en el estudio y buscando diferentes herramientas que ayuden en el diagnóstico precoz y su control.

4. Objetivo

El HLB es actualmente una de las mayores amenazas de la industria citrícola y, hasta el momento, no ha sido posible desarrollar tratamientos que permitan curar la enfermedad de forma efectiva. Las grandes pérdidas económicas en algunos de los países afectados, intensifica el interés por encontrar soluciones a corto, medio y, principalmente, largo plazo en las zonas afectadas. Adicionalmente, el HLB causa una gran preocupación en los lugares donde la enfermedad aún no se ha detectado, dada la facilidad que ha demostrado en expandirse. Es necesario un control estricto en estas zonas y una respuesta efectiva a la presencia de los vectores del HLB para reducir los riesgos de entrada, así como, de la dispersión de la enfermedad.

En esta revisión, se pretende presentar una visión global del HLB y exponer las diferentes aproximaciones que se han realizado para el control de la enfermedad y sus vectores, y los puntos que se deben abordar en un futuro para avanzar en la lucha contra la misma.

5. Enfermedad de Huanglongbing

5.1 Historia

El patógeno asociado al HLB es una Alphaproteobacteria gram negativa del género *Candidatus Liberibacter* (*Ca. L.*), restringida al floema y que no puede mantenerse en una colección de cultivo bacteriológico. Se han descrito tres especies como causantes de la enfermedad en cítricos, *Ca. L. asiaticus* (*CLas*), *Ca. L. africanus* (*CLaf*), y *Ca. L. americanus* (*CLam*) que han evolucionado de forma diferente dependiendo del continente que refleja su nombre. El HLB se transmite por dos psílidos: *Diaphorina citri* (*D. citri*) y *Trioza erytreae* (*T. erytreae*) (14).

La enfermedad es conocida por diferentes nombres: HLB en China, Likubin en Taiwan, Dieback en India, Leaf Mottle en Filipinas, Vein Phloem Degeneration en Indonesia, y Yellow Branch, Blotchy-Mottle o Greening en EE. UU. y Sud África, aunque se ha aceptado HLB como nombre oficial (15).

El origen del HLB no está claro. La enfermedad fue inicialmente descrita en China en 1919 por Reinking y se denominó como "yellow shoot disease". Sin embargo, más tarde, se sugirió que el HLB podría haber sido el responsable de la muerte de los cítricos en India en el siglo XVIII (16). Reinking describió los síntomas que caracterizan la enfermedad en la actualidad: árboles infectados que desarrollan clorosis moteada en las hojas, brotes amarillos y pequeños frutos verdes asimétricos que caen temprano. Además, los frutos según maduran, en vez de volverse de colores más intensos como amarillo o naranja de abajo hacia arriba, el cambio de color a menudo se da desde la parte superior donde los frutos se adhieren al tallo hacia la inferior. La bacteria que causa la enfermedad reside en el floema, tejido vascular encargado del transporte de los nutrientes. En consecuencia, los árboles infectados no crecen de igual manera que los sanos, viéndose afectado también el tamaño de sus copas (8,16) (Ver **Figura 5** en el apartado 5.4).

En 1960 se demostró que *D. citri* y *T. erytreae* son los vectores de la enfermedad y diez años después se encontraron células bacterianas en los tubos cribosos (17). Los postulados de Koch no se cumplen de momento para ningún *Liberibacter*, y ninguna de las cepas patogénicas se ha podido cultivar. Únicamente se han cultivado aislados provenientes de papaya de un miembro perteneciente a este género, *Liberibacter crescens* (*Lcr*), pero no se ha demostrado su patogenicidad (18).

5.2 Agente causal

La bacteria causante del HLB pertenece a la familia Rhizobiaceae y fue denominada *Ca. Liberibacter* spp., “*Candidatus*” por la incapacidad de ser cultivada y “*Liberibacter*” refiriéndose al floema o líber donde se encontró (14).

La primera vez que se detectaron bacterias del género *Candidatus Liberibacter* en cítricos afectados por HLB, fue utilizando el Microscopio Electrónico de Transmisión (19). Aunque la relación causal entre *Liberibacter* y HLB es tecnológicamente asociativa, hay fuertes evidencias que apoyan que *Liberibacter* es el agente causal de la enfermedad. La implementación de los métodos de diagnóstico, principalmente los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han permitido reforzar esta hipótesis. Por otro lado, la posibilidad de secuenciar los genomas y otras técnicas y herramientas moleculares, han sido de gran utilidad para estudiar las interacciones de *Liberibacter* con la planta y también con el insecto (20).

Como se ha comentado anteriormente, se han descrito tres especies como agentes causales de la enfermedad en cítricos: *CLaf*, *CLam*, y *CLas*. Las dos primeras son especies sensibles al calor, y concretamente, *CLam* sólo ha sido descrita en Brasil, mientras que *CLas* es una especie tolerante al calor, y esta capacidad, ha provocado una mayor dispersión entre las zonas típicas de producción de cítricos, cuyo clima más favorable es el tropical y subtropical (21). La distribución en 2017 de las tres especies puede observarse detalladamente en la **Figura 2**.

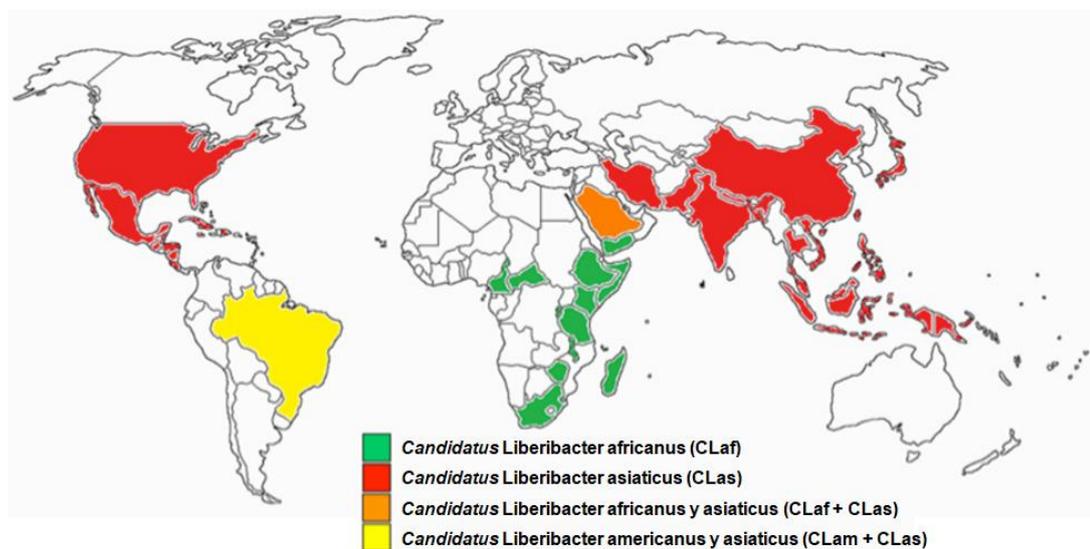


Figura 2. Distribución de las especies de *Candidatus Liberibacter* (*CLas*, *CLaf* y *CLam*) causantes del HLB en todo el mundo (Adaptado de Michael J. Melzer et al, 2017).

Desde el punto de vista taxonómico, dentro de la familia Rhizobiaceae, el género *Candidatus Liberibacter* forma un cluster con las Alphaproteobacterias más estrechamente relacionadas. Una de las características de dicho grupo es que poseen un genoma muy reducido en comparación con otros miembros que tienen una forma de vida más independiente, como pueden ser *Rhizobium* o *Agrobacterium*. Según refleja la **Figura 3**, hubo una evolución gradual a partir de un ancestro común y *Lcr* se separó antes del resto. Tras la divergencia, parece ser que se produjo una extensa pérdida de genes por parte de *Candidatus Liberibacter*, por lo que estos miembros presentan genomas más reducidos que *Lcr*. Esto podría significar la pérdida de genes clave en este tipo de bacterias, que por un lado las hace más dependientes de sus hospedadores y por otro dificulta la obtención de un cultivo axénico (22).

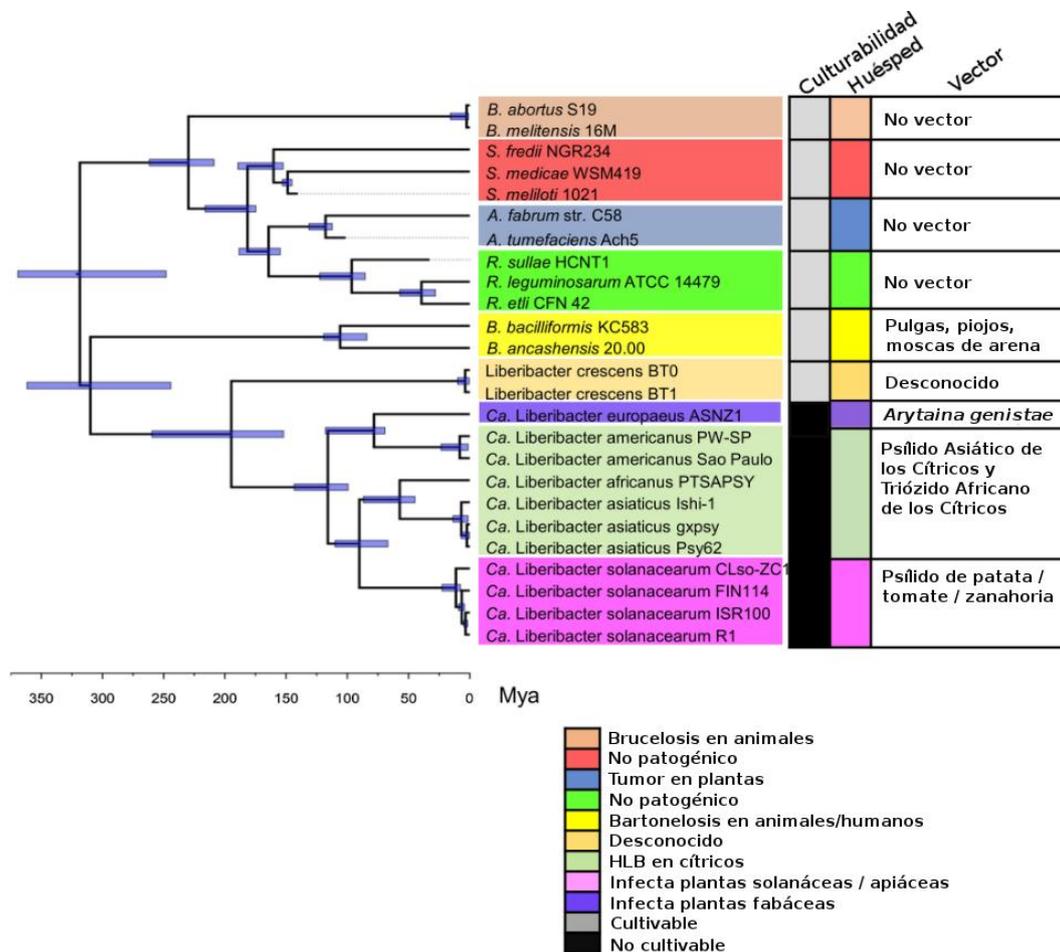


Figura 3. Tiempo estimado de divergencia de las distintas especies de '*Ca. Liberibacter*' y otros Rhizobiales representativos. El intervalo de credibilidad de la edad de cada nodo corresponde a las barras horizontales azules. Dichas barras muestran la densidad posterior más alta (HPD por sus siglas en inglés; 95%), de la probabilidad posterior en la edad de los nodos. En la parte inferior se muestra una escala de tiempo. Mya (hace millones de años). El panel de la derecha del árbol, muestra la culturabilidad, el huésped y el vector de las diferentes especies. Adaptado de: 10.1111/mpp.12925.

5.3 Vectores

La principal forma de dispersión de la bacteria causante del HLB son dos vectores: *CLas* y *CLam* por el Psílido Asiático de los Cítricos, *D. citri*, y *CLaf* por el Triózido Africano de los Cítricos, *T. erytrae*. Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente, que ambos vectores son capaces de transmitir las tres especies de bacterias (12).

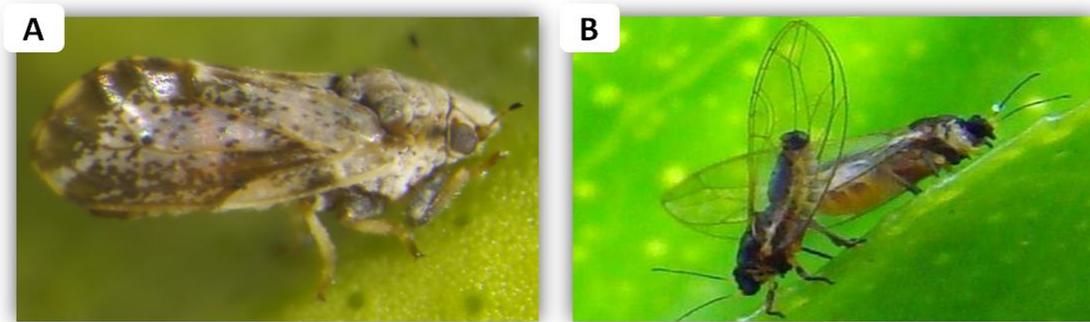


Figura 4. A) Adulto del Psílido Asiático de los Cítricos, *Diaphorina citri*. B) Adulto del Psílido Africano de los Cítricos, *Trioza erytrae*.

5.3.1 Psílido Asiático de los Cítricos

El Psílido Asiático de los Cítricos, originalmente de India y otras partes de Asia, fue confirmado por primera vez, en el hemisferio occidental, en Brasil en 1942, pero no fue hasta 1998 cuando se describió en otras regiones como el archipiélago de Guadalupe, la cuenca Caribeña, y el sur de Florida (23). No obstante, al no haberse descrito el HLB y como la presencia de *D. citri* por sí misma no suponía una plaga de impacto económico importante, no se tomaron ningún tipo de medidas para controlar al psílido. Por ello, las poblaciones aumentaron y se diseminaron rápidamente. De hecho, en el año 2002 la plaga se había extendido a Méjico, Puerto Rico, Jamaica, República Dominicana, Islas Caimán, Bahamas y Venezuela, por tanto, la erradicación de la plaga resultó imposible (24). Sin embargo, no fue hasta 2004 que *CLas* se confirmó en el Estado de São Paulo en Brasil y en 2005 la primera confirmación del mismo en Florida, se observó mediante muestras de un pomelo que presentaba síntomas de la enfermedad. En la actualidad se ha reportado la presencia de *D. citri*, en 46 países diferentes, en 5 continentes (Asia, África, América del Norte, América del Sur y Oceanía) (25).

CLas depende del psílido para moverse entre las plantas y contribuye a su supervivencia a largo plazo, ya que la bacteria se replica en el insecto. Existe cierta

evidencia de que *CLas* evolucionó primero como patógeno o simbiote de insectos y posteriormente, se convirtió en un patógeno de plantas (26). Los simbioses bacterianos de los insectos chupadores funcionan para compensar las carencias nutricionales del floema, proporcionando ciertos aminoácidos que no pueden sintetizarse. *CLas* es ingerido por el insecto y se desplaza a tejidos intestinales donde puede quedar latente durante ciertos días. Posteriormente, las bacterias pueden replicarse, e infectar sistemáticamente al insecto, finalmente se traslada a tejidos salivales donde puede ser expulsada con las secreciones, y por tanto, infectar a otras plantas al alimentarse de estas (27).

El vector no está presente en Europa, no obstante, se han de seguir una serie de recomendaciones para evitar que pueda introducirse, ya que supondría, una amenaza en la industria citrícola. Por ello, es importante respetar las condiciones legales para la introducción de material vegetal sensible a la bacteria y plantas huéspedes del insecto vector.

5.3.2 Trióximo Africano de los Cítricos

El principal vector de *CLaf* es *T. erythrae*, éste se alimenta de rutáceas. Cuando el psílido adulto ingiere la bacteria esta penetra en el intestino durante un periodo de latencia de 21 días aproximadamente y posteriormente, la bacteria prolifera en la hemolinfa del insecto. El patógeno será inyectado con la saliva en la siguiente planta durante la alimentación del insecto. Los patógenos también se pueden transmitir de madres infectadas a crías no infectadas a través del óvulo o por transmisión venérea donde la transmisión se da entre machos y hembras durante el apareamiento (7).

T. erythrae es originaria del África subsahariana, aunque actualmente se encuentra ampliamente distribuida en África y de forma restringida en Oriente Medio y en Europa. La primera vez que se describió la presencia, en Europa, de *T. erythrae* fue en 1994, en la isla de Madeira, probablemente, debido al desplazamiento de material contaminado por transporte marítimo desde puertos africanos (12). En la actualidad está distribuida por todas las islas del archipiélago, y también, en el norte de Portugal Continental. Posteriormente, en España se detectaron brotes de *T. erythrae* en las Islas Canarias, concretamente en Tenerife, La Palma y La Gomera. Actualmente, está presente en todas las islas a excepción de Fuerteventura también en Galicia, principalmente en Pontevedra y La Coruña y algunas zonas de Lugo y Orense (12). Recientemente, se ha detectado también en

Cantabria (28). Para evitar la propagación, se han tomado medidas y se realizan controles fitosanitarios de cítricos y otras rutáceas hospedantes, para verificar que se encuentran libres de *T. erythrae* antes de su circulación por la UE (25).

En general, se ha observado que el desplazamiento y la dispersión de los psílicos infectados entre zonas productoras limítrofes, suele conllevar a la propagación del HLB. El mayor movimiento de los adultos es dentro de la planta hospedante o a plantas cercanas. No obstante, los psílicos son capaces de volar distancias considerables en busca de hospedadores adecuados, siendo las corrientes de viento un factor importante para su movimiento. Sin embargo, su dispersión a largas distancias suele producirse debido al desplazamiento de material vegetal contaminado movilizado por el ser humano (25).

La experiencia en otras regiones indica que una vez el vector del HLB está presente, cuando se produce la entrada de la bacteria, la propagación de la enfermedad es imparable. Así pues, existe la urgencia de tomar medidas para por una parte, controlar el vector, y por otra, evitar la introducción de la enfermedad en Europa y en el caso de que suceda, poder detectarla y erradicarla, especialmente en las principales áreas cítricas.

5.4 Sintomatología

Se han detallado numerosos síntomas, y muy poco uniformes, especialmente al inicio de las primeras etapas de la enfermedad, provocando que sea difícil hacer un diagnóstico de la misma (26). Además, muchos de los síntomas son comunes en otras enfermedades y pueden variar según la época del año aumentando las complicaciones. Concretamente, se ha detallado que la sintomatología es más severa durante las estaciones más frías respecto a los meses más cálidos (8).

El HLB se caracteriza por la aparición de “brotes amarillos” completamente cloróticos (29). Con el tiempo, se ha observado que estos brotes pueden crecer en las ramas, y en etapas tardías el dosel puede presentar clorosis severa (**Figura 5A**). Uno de los síntomas más característicos de HLB es un patrón irregular de clorosis de las hojas denominado moteado “manchado” (26,30) (**Figura 5C**). Las deficiencias de zinc, manganeso o magnesio también producen patrones moteados de clorosis en las hojas pero simétricos, lo cual difiere en el caso del HLB (31). Según avanza la enfermedad, las ramas afectadas se atrofian y se observa un mayor efecto sobre el desarrollo de las hojas permaneciendo más pequeñas y erectas, debido a la forma que adquieren se

conocen como “orejas de conejo” (8). Además, la lámina de la hoja puede volverse uniformemente amarilla. Estos síntomas se han apreciado principalmente en las hojas de la naranja dulce, el pomelo y la pampelmusa. En algunos casos también se observan hojas engrosadas y venas tipo corcho. Según avanza la enfermedad, aumenta la caída de las hojas, la defoliación y la muerte de las ramas (**Figura 5F**). En los árboles más gravemente afectados por el HLB, la defoliación es considerable con copas escasas y “abiertas” (26) (**Figura 5B**).

El avance de la enfermedad afecta también a los frutos, que presentan coloración anaranjada de los haces vasculares del extremo peduncular (**Figura 5D**) frente al verde pálido de los sanos (**Figura 5E**). En general, son más pequeños, y pueden contener semillas abortadas y se produce deformación y necrosis de los haces vasculares (32) (**Figura 5G**). En la fruta afectada por el HLB, la pérdida de la clorofila empieza por el extremo del tallo, y en general, el color no se desarrolla completamente (**Figura 5H**). La enfermedad afecta también a las características sensoriales y fisicoquímicas del jugo de la fruta. Este, en general, es similar en calidad al de la fruta inmadura, con sólidos reducidos y alto contenido de ácidos (33). Concretamente, se observa una disminución de la sacarosa, azúcares totales y ácido málico mientras que los niveles de ácido cítrico, limonoides amargos y flavonoides, entre otros, están aumentados (34). Por tanto, afecta a la dulzura y a la acidez, disminuyendo el valor del mismo.

Se ha visto que se produce una acumulación excesiva de almidón en el tallo y hojas, debido a una regulación ascendente del transporte de glucosa-fosfato (35). El almidón permanece indefinidamente en estas partes, afectando de forma negativa al transporte de nutrientes repercutiendo tanto en los frutos como en el árbol. Cuando el almidón no es degradado correctamente, provoca inanición en las raíces y la salud del árbol se deteriora hasta su muerte. Por ello, con el transcurso de los años los árboles sintomáticos pueden volverse tan improductivos que ya no son económicamente viables e incluso pueden acabar muriendo.

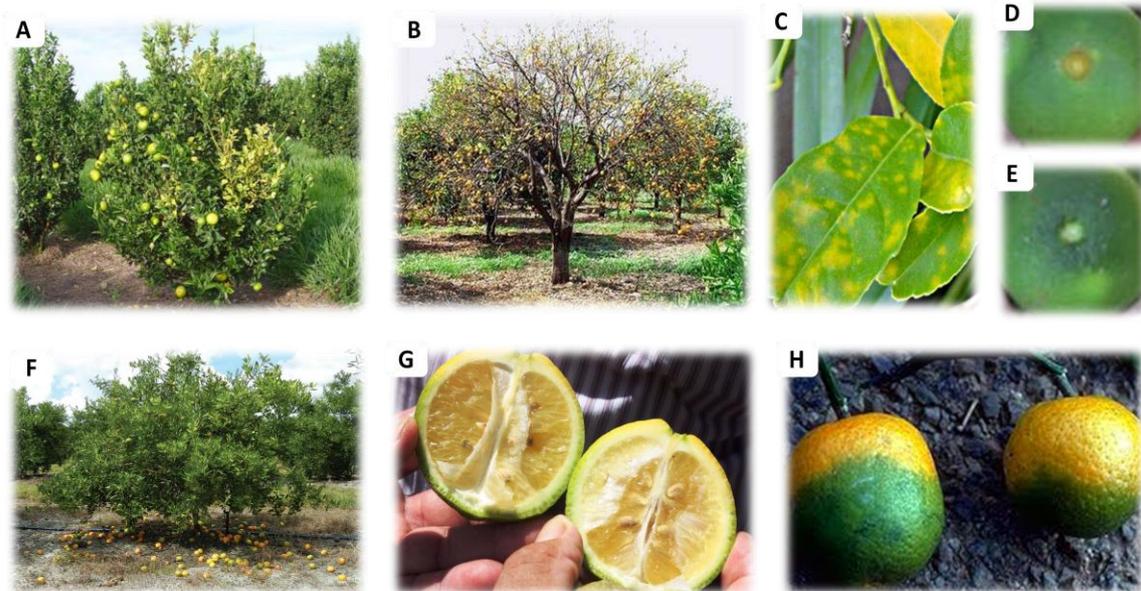


Figura 5. Sintomatología característica de la infección por HLB. (A) Inicialmente los árboles sintomáticos se caracterizan por presentar uno o diversos brotes amarillos sobre la copa. (B) Defoliación característica del HLB. (C) Clorosis asimétrica en las hojas. (D) Coloración anaranjada en los haces vasculares del extremo peduncular de frutos afectados por HLB. (E) Coloración verde pálida en los haces vasculares del extremo peduncular de frutos sanos. (F) Caída de los frutos característica de la enfermedad. (G) Corte transversal que muestra una división asimétrica y curvada, además se pueden observar las semillas abortadas típicas de los frutos afectados por HLB. (H) Inversión de color que presentan los frutos al madurar. Las frutas pierden valor, son pequeñas, asimétricas, generalmente verdes en la parte inferior y de sabor ácido.

6. Estrategias para prevenir o tratar el HLB

Un factor clave para plantear las estrategias que se pueden llevar a cabo, es tener en cuenta si el vector y el HLB están presentes de forma simultánea o no (36). En Europa, hace más de una década de la presencia del vector, pero la enfermedad sigue sin reportarse hasta el momento. Sin embargo, el HLB podría llegar a aparecer y, por tanto, es importante tener en cuenta todas las estrategias que podrían llevarse a cabo en el caso de que esto sucediese.

El control de las poblaciones de vectores con insecticida y la reducción de los síntomas de la enfermedad con antibióticos son algunas de las opciones que podrían utilizarse para tratar esta enfermedad, pero tal y como se ha comentado anteriormente, estas estrategias no parecen adecuadas en la UE. El interés y la financiación para la investigación sobre el HLB y sobre las diferentes opciones para controlar tanto el vector como la bacteria han dado como resultado una gran cantidad de literatura relevante. A continuación, se realiza una revisión de los métodos más interesantes para tratar el HLB tanto a nivel preventivo como en el caso de que la enfermedad ya esté presente.

6.1 Control del Vector

Tan pronto como el vector es localizado, es muy importante iniciar y mantener un control riguroso para su contención. En Florida se empezó a utilizar insecticida cuando apareció la enfermedad, siete años después de que se detectase por primera vez la presencia del vector. En este momento, la población del psílido ya se había extendido por todo el Estado, dificultando su control y erradicación enormemente. Sin embargo, se comprobó que la vía más efectiva para la restricción del vector fue el uso de diferentes insecticidas aplicándolos de forma coordinada en grandes áreas (8). Uno de los problemas relacionados con los insecticidas es, que pese a que contribuyen a reducir las poblaciones del vector e incluso a disminuir la dispersión de la enfermedad cuando está presente, no sirven para curar los árboles infectados (37). En estudios recientes en Brasil y en Florida, se ha visto que los insecticidas contribuyen eficientemente al control de la enfermedad y reducen la posibilidad de nuevos contagios. Por tanto, actuar sobre el vector es fundamental, y más aún, en aquellas zonas donde la enfermedad no está presente, ya que la reducción de la población del mismo es de gran utilidad como medida preventiva (26).

Esta medida es una estrategia básica e importante para evitar la propagación del HLB. Sin embargo, tiene sus inconvenientes, ya que es pernicioso e insostenible, observando varios efectos secundarios negativos, como residuos químicos, resistencia y resurgimiento de plagas (38). Recientemente se ha aprovechado la existencia de diferentes enemigos naturales de *D. citri* y *T. erytrae* para tratar de controlar las plagas, incluyendo parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos (39). Esta es una alternativa de interés ya que no presenta los inconvenientes asociados al uso de productos químicos. Entre los parasitoides, se han utilizado *Tamarixia radiata* (Waterston) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Shafee, Alam y Argarwal) para controlar la población de los vectores en la República de Mauricio, la Isla Reunión y los EE. UU.. Los enemigos naturales depredadores investigados incluyen mariquitas, ácaros depredadores, crisopas, arañas, hormigas y mantis depredadoras (revisado en 34). La utilización de hongos entomopatógenos ofrece una gran oportunidad de desarrollo debido a su importante potencial epidémico y a la conveniencia de la producción. Sin embargo, hasta la actualidad, La Isla Reunión y la República de Mauricio son las únicas regiones en las que la lucha biológica contra *T. erytrae* y *D. citri* ha sido eficaz. En otros lugares esta alternativa también ha sido probada mediante la introducción de parásitos, pero con un éxito muy limitado, por ejemplo en Taiwán (15,36). En el verano de 2019 se utilizó *Tamarixia dryi* para reducir las poblaciones de *Trioza erytrae* en Canarias y en octubre de ese mismo año se liberó también en Galicia (40,41). Se ha

visto que, en general, el control biológico es difícil de aplicar en áreas donde el principal problema es el HLB. Sin embargo, más estudios podrían ayudar a lograr un mayor entendimiento y comprobar si realmente el uso de enemigos naturales para el control de los vectores puede ser una alternativa exitosa.

En Sudáfrica se han tomado medidas para el control del vector aplicando ciertas condiciones desfavorables para éste. Por ejemplo, el crecimiento de las especies de cítricos en áreas con elevada temperatura y baja humedad, afecta de forma negativa al vector (42). Sin embargo, estas condiciones también pueden afectar al cultivo y, por tanto, solo son aplicables a aquellas especies de cítricos que puedan desarrollarse de forma favorable bajo estos parámetros. Una reciente estrategia ha consistido en la utilización del jazmín naranja (*Murraya paniculata*) como un cultivo trampa en los márgenes de los huertos de cítricos para el asentamiento y dispersión de los psílidos (43).

La eliminación de cítricos abandonados o improductivos que puedan servir de refugio, también es realmente aconsejable con el objetivo de desfavorecer la dispersión del vector (36).

En aquellas zonas libres de psílidos, la primera línea de defensa y la actuación más efectiva consiste en aplicar medidas de cuarentena. Las poblaciones de *T. erythrae* y *D. citri* no tienen capacidad de expandirse rápidamente en grandes áreas. Por ello, la dispersión de estos ha ocurrido principalmente debido a la actividad humana, y concretamente, al movimiento descuidado de material contaminado. Así pues, es necesario que las autoridades fitosanitarias interfieran rápidamente en áreas donde el vector se ha introducido de forma reciente, así como en aquellas donde todavía está ausente. Es importante además, implementar la vigilancia y los controles de monitorización preventiva para reducir la introducción accidental y localizar, tan pronto como sea posible, cualquier brote de infestación. Países como España o Portugal, por ejemplo, ya han adoptado estas medidas (36).

6.2 Identificación y eliminación de los árboles afectados

Explorar los huertos y los cultivos para identificar los árboles con síntomas de HLB y eliminarlos es otra de las estrategias que se han utilizado en Florida o Brasil (30). La identificación sistemática y eliminación de los árboles infectados es el método más eficaz y recomendado para manejar la enfermedad. Cuando la tasa de infección alcanza el 28%, es altamente recomendable la eliminación del huerto entero. Por ello, tan solo en Brasil se han arrancado más de 10 millones de naranjos (44).

Pese a la efectividad de la estrategia, presenta diversas desventajas. La principal es que la eliminación efectiva de los árboles infectados depende de un diagnóstico preciso de la enfermedad, y esto es realmente difícil debido a diferentes factores. Cuando aparecen los síntomas, las bacterias ya han alcanzado poblaciones demasiado elevadas y el árbol puede haber servido de inóculo durante meses o en algunos casos incluso años (45). Al comienzo de la epidemia, el caso de árboles asintomáticos es muy superior al de aquellos que presentan síntomas y, por tanto, el diagnóstico de la enfermedad se vuelve muy complicado. Igualmente, la falta de síntomas específicos que ayuden a identificar el HLB complica aún más esta tarea. Otro hecho a tener en cuenta es que se trata de una estrategia muy poco rentable para los productores de cítricos, y en algunos casos económicamente insostenible ya que supone una pérdida del 100% del rendimiento del árbol sin olvidar el coste de las inspecciones y operaciones de remoción consecuentes (8). Por otra parte, el tiempo de recuperación es muy elevado y el desarrollo de los árboles es un proceso largo, además, en muchas especies la obtención de los primeros frutos puede tardar más de cinco años (46). Recientemente se ha aprovechado la capacidad olfativa canina para detectar la presencia de la bacteria mucho antes de la aparición de los primeros síntomas (tan solo a las dos semanas posinfección) con una exactitud mayor del 99% (47), aunque este procedimiento todavía no ha dado el salto a la práctica.

6.3 Clean Nursery Stock

Cada año aumentan las alertas sobre nuevos patógenos debido a la facilidad de transportar material vegetal y con él nuevos virus, hongos, bacterias etc., hacia países donde no existían y donde no se sabe cómo combatirlos. Ante esta problemática, existen normativas de seguimiento y certificación de plantas donde, a través de una serie de controles periódicos, se garantiza por parte de las administraciones una trazabilidad de la variedad y sanidad del vivero.

En el caso de la producción de cítricos, es esencial obtener árboles de viveros libres de *CLas*, *CLaf*, *CLam* y de otros patógenos transmisibles por injerto. En Florida, los viveros certificados, cumplen con estrictas regulaciones que se impusieron cuando se detectó la bacteria causante del HLB. Estos viveros de cítricos deben estar bajo continua inspección y tratarse con insecticidas durante la producción y antes del envío.

6.4 Aproximaciones terapéuticas para acabar con CLas

La mayoría de estudios se han centrado en cómo acabar con *CLas* ya que, de las tres especies bacterianas causantes del HLB es la que mayor impacto ha tenido.

Como se ha comentado anteriormente, esto es debido, principalmente, a la tolerancia al calor característica de esta especie, que favorece su dispersión en los climas tropicales y subtropicales.

Cuando se produce la infección por CLas y empiezan a aparecer los primeros síntomas, es importante decidir cómo abordar el problema. Normalmente, y pese a las complicaciones comentadas, se tiene que decidir entre talar y eliminar los árboles que presentan síntomas y aquellos que puedan estar infectados, o mantener los cultivos hasta que ya no sean rentables. Teniendo en cuenta que la eliminación de los árboles supone pérdidas de producción del 100%, en muchas ocasiones los agricultores se ven forzados a mantener el cultivo incluso con la infección presente. Para controlar la enfermedad y pese al coste que esto supone, se utilizan diferentes estrategias como el uso de antibióticos, la mejora de la nutrición o la terapia térmica.

6.4.1 Combinación de antibióticos

Hasta el momento el uso combinado de antibióticos no se ha adaptado como tratamiento por diversas razones como; los obstáculos reglamentarios, la dificultad en cuanto a los métodos de aplicación y la eficiencia de los mismos (8). En los últimos años, el interés por el uso de antibióticos ha aumentado considerablemente, debido a las escasas alternativas para tratar la enfermedad a corto plazo y las grandes pérdidas que esta conlleva. Hasta el momento, los estudios parecen indicar que los tratamientos son más efectivos cuando se combinan dos o más antibióticos (p. ej. estreptomina y penicilina o ampicilina sódica y rifampicina) (48,49). No obstante, pese a suponer una alternativa realmente interesante, no se ha conseguido la eliminación total de las bacterias, aunque se ha logrado disminuir las poblaciones y que esto suponga un impacto muy positivo sobre los cultivos (2).

La estreptomina, la oxitetraciclina y la kasugamicina son antibióticos que ya han sido aprobados para su aplicación en cultivos en EE. UU. (50). Se utilizan para controlar una enfermedad conocida como “fuego bacteriano” causada por *Erwinia amylovora*, y también se permite el uso de estreptomina para controlar la enfermedad del Citrus Canker en Florida (51). El caso del HLB, es algo más complejo que las anteriores ya que se trata de una enfermedad causada por una bacteria limitada al floema y, por lo tanto, la vía de administración de antibióticos es más complicada. Los compuestos antimicrobianos utilizados para el tratamiento y control del HLB deben estar activos dentro de la planta, ser fácilmente depositados en el floema, no mostrar fitotoxicidad, tolerar temperaturas severas y no limitar la resistencia a los patógenos (50). Se han realizado estudios para determinar tanto la eficacia

contra *CLas* como la fitotoxicidad que puede provocar el uso de diferentes antibióticos. En concreto, en un estudio llevado a cabo por Zhang et al. en 2014, se seleccionaron 31 antibióticos y comprobaron sus efectos. Entre ellos, la ampicilina, carbanicilina, penicilina, cafelaxina, rifampicina y sulfadimetoxina fueron efectivos en reducir la infección significativamente y mostraron una fitotoxicidad limitada (52).

Con el objetivo de determinar la eficacia de diferentes antibióticos contra el HLB, se están realizando diferentes ensayos. Las inyecciones de antibióticos en el tronco han mostrado resultados positivos, no obstante, esto puede llegar a no ser rentable desde la perspectiva económica y logística (53). Por esta razón, sería conveniente realizar más estudios con el objetivo de superar esta limitación. Pese a esto, en Florida, la CDRF, trata de favorecer que se permita el uso de dos formulaciones de oxitetraciclina y una de estreptomina que podrían proporcionar una terapia efectiva para los árboles afectados por el HLB (8).

Recientemente, se han realizado más estudios combinando diferentes antibióticos con el objetivo de obtener una estrategia más efectiva y por tanto más rentable. Concretamente, se ha comprobado que la aplicación de ampicilina sódica y rifampicina, puede resultar realmente interesante (2). Estos antibióticos son capaces de reducir significativamente la población de *CLas* y, en consecuencia, disminuir los síntomas causados por el HLB. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que, en los árboles infectados por *CLas* y posteriormente tratados con esta combinación de antibióticos, aumenta la producción de fruta y disminuye la caída de ésta. Asimismo, los frutos que se obtienen son de mayor calidad. Adicionalmente, otro estudio ha demostrado que la combinación de estreptomina y penicilina también podría ser eficaz controlando *CLas* (48).

El modo de acción de cada antibiótico es distinto, y por tanto los resultados de utilizar unos u otros en árboles afectados por el HLB varía. Adicionalmente, diferentes estudios han demostrado que el uso de antibióticos mejora cuando se utilizan de forma combinada. Sin embargo, diversos problemas relacionados con la fitotoxicidad, la resistencia a los antibióticos y la dificultad de su aplicación, son aspectos a tener en cuenta. Por todo esto, se requieren más estudios que ayuden a contestar muchas de las preguntas aún por resolver respecto al uso de antibióticos en esta enfermedad, hacerlo podría ayudar al entendimiento de la misma, y hacer frente de forma efectiva a esta.

6.4.2 Nutrición

La aplicación de cócteles nutricionales en los fertilizantes con el objetivo de controlar los efectos nocivos provocados por el HLB, ha sido un tema de discusión y debate debido a la controversia en los resultados obtenidos en diferentes estudios. Sin embargo, la mayoría de los informes son anecdóticos y no tienen suficiente validez estadística (8).

Por una parte, esta aplicación nutricional ha sido una práctica común en China, con el objetivo de prolongar la vida productiva de los árboles infectados (54). Sin embargo, más de 60 años de revisión y experiencia en el campo en este país, no ha evidenciado que el uso de estas aproximaciones pueda mantener la productividad de los árboles afectados por el HLB o ralentizar el progreso de la enfermedad (55). Se ha comparado el uso de diferentes “programas nutricionales mejorados” (ENP de *Enhanced Nutritional Programs*), y los resultados demostraron que no había diferencias significativas en el rendimiento o calidad en comparación con los controles (56).

Por otra parte, se realizaron encuestas y entrevistas con trabajadores y científicos e indicaron que los árboles sintomáticos, si son manejados adecuadamente pueden seguir siendo productivos durante años, siendo la nutrición, el riego y el control de la plaga, aspectos claves que contribuyen a la productividad (57). Además, poco después de confirmar el HLB en Florida, se publicó un informe anecdótico de Maury Boyd, un productor de cítricos de este Estado que indicó que aplicaciones foliares de varios productos nutricionales aumentaban el vigor y la productividad (58). Boyd desarrolló un cóctel conocido como “cóctel Boyd” que fue adoptado junto a otras variantes similares por muchos productores de cítricos en Florida que creían que estos ENP podrían retrasar o incluso detener el avance del HLB, extendiendo la vida productiva de los árboles. De hecho, en 2012 se estimó que más del 90% de productores de cítricos en Florida utilizaban los ENP y el manejo del vector, como medidas para mantener los árboles afectados por el HLB (59). En la actualidad, el uso de estos ENP, hace que este sea el mayor coste en la producción de cítricos (60).

En el Hemisferio Occidental, no ha habido resultados consistentes que corroboren los efectos beneficiosos de los ENP (55,60), aunque la publicidad emitida por las campañas de las industrias agrícolas sugiere lo contrario (56,61). A pesar de los efectos inconsistentes de los ENP en la salud y productividad de los cítricos, los datos han demostrado que los tratamientos nutricionales no tienen ningún efecto en las poblaciones de *CLAs* en un árbol infectado o en la tasa de propagación del patógeno en los árboles o huertos (56,62,63). En un estudio realizado, se observó que no

existieron diferencias en la incidencia de infección entre ninguno de los tratamientos comparados que incluyeron ENP, aplicación de insecticida, combinación de ENP e insecticida y controles no tratados (63). En este estudio, todos los árboles evaluados fueron HLB positivos, a pesar de que las poblaciones de *D. citri* fueron consistentemente más bajas en los árboles tratados con insecticida que en los árboles no tratados. Estos resultados sugieren que las aplicaciones de insecticidas y de ENP podrían no tener efecto en retrasar la propagación del HLB una vez que los árboles han sido infectados por *CLas* (64). Tomados en conjunto, estos resultados ponen en duda el valor de la aplicación continua de insecticidas después de un alto nivel de infección por *CLas*, así como el uso de ENP. Dada la controversia observada, sería realmente interesante aumentar los esfuerzos por demostrar si realmente tienen algún efecto positivo o no, y evaluar la relación entre el coste y los beneficios en caso de presentarlos.

6.4.3 Termoterapia

La terapia termal o termoterapia es un tratamiento alternativo a la nutrición o los antibióticos que ha sido utilizado para eliminar o prevenir ciertas enfermedades en plantas. Principalmente se ha utilizado el calor seco y el tratamiento con agua caliente (65). Se ha reportado que la termoterapia ha sido efectiva en el caso de enfermedades virales cloróticas, del amarillamiento del melocotón, para prevenir el rápido declive de los cítricos y la inactivación del CTV en yemas (50). En el caso del HLB, se ha demostrado que en invernaderos y cámaras de cultivo es una estrategia efectiva reduciendo a niveles ínfimos la población de *CLas*, aumentando el vigor de los cítricos y promoviendo el crecimiento y desarrollo de la raíz (66). Se ha demostrado incluso que las plantas infectadas con HLB pueden llegar a recuperarse y *CLas* puede llegar a ser erradicado (67). Se han utilizado temperaturas superiores a los 40°C para tratar los árboles afectados por HLB, ya que la bacteria causante de la enfermedad es tolerante al calor y es capaz de soportar temperaturas de hasta 35°C. Los valores de *CLas* en los árboles tratados se analizaron mediante PCR cuantitativa. En el estudio se vio que trascurridos 90 días de calor se produjo una reducción de los títulos a niveles mínimos y tras 180 días de tratamiento térmico la eliminación de las bacterias fue completa. Se sabe que *CLas* se desplaza sistémicamente hacia las raíces. Para un remedio a largo plazo, la eliminación completa del patógeno en las raíces es fundamental (68). Sin embargo, actualmente no es posible elevar las temperaturas de las raíces en los huertos (69). Este es el principal inconveniente de la terapia térmica y probablemente debido a este hecho los resultados de algunos estudios han sido inconsistentes (8). Por ello, para controlar el HLB completamente, se ha planteado que una de las

estrategias más eficientes podría ser la combinación de la termoterapia y de antibióticos, siendo necesarios más estudios que profundicen en su uso combinado.

6.5 Especies de cítricos resistentes al HLB

Todos los tipos de cítricos comerciales importantes son susceptibles al HLB pero a distintos niveles, existiendo diferencias entre ellos en cuanto al comportamiento y afectación de la enfermedad. Algunos ejemplos reportados de menos susceptibilidad se han dado en las limas, pomelos, limones y otros cítricos no cultivados (revisado en 11). Se ha observado que parámetros como la frecuencia de infección, la población bacteriana y los síntomas, pueden variar entre diferentes especies (70). Otros estudios apoyan esta afirmación, y han profundizado en la susceptibilidad de diferentes especies (71,72). Concretamente, se ha visto que *Poncirus trifoliata* (*P. trifoliata*) es menos susceptible al HLB (72,73). Este se utiliza como base para el injerto de varias especies de citrus en plantaciones comerciales. Se ha visto que los híbridos de *P. trifoliata* presentan menor susceptibilidad al HLB, aunque no está claro el motivo y son necesarios más estudios para confirmar estos hechos. Por ello, se están llevando a cabo diferentes programas con el objetivo de mejorar las propiedades de los cítricos en Florida y desarrollar nuevas variedades con una menor susceptibilidad (74,75). Sin embargo, la evaluación de esta susceptibilidad al HLB de manera significativa requiere varios años de ensayo a escala comercial y hasta el momento los datos disponibles son muy limitados. La obtención de variedades resistentes a la enfermedad podría ser el enfoque más eficiente y sostenible para controlar el HLB. Sin embargo, la mejora tradicional de los cítricos se ha visto a menudo obstaculizada por la esterilidad de los óvulos, las incompatibilidades sexuales y de injerto, y la prolongada juventud (76).

Además de la mejora convencional, se han utilizado diversos métodos biotecnológicos para desarrollar variedades de cítricos modificadas (77,78). Concretamente, existe un gran interés en las estrategias transgénicas con el objetivo de reducir la susceptibilidad al HLB en los cultivos normalmente utilizados en la industria.

6.5.1 Plantas transgénicas

La resistencia genética al HLB se considera clave para la supervivencia de la industria cítrica de Florida y, por lo tanto, ha sido un objetivo primordial en la investigación. Sin embargo, la selección e hibridación, la mutagénesis y la hibridación somática todavía no han dado lugar a variedades de cítricos altamente resistentes o

inmunes comercialmente aceptables (20). No obstante, la utilización de genes de otras plantas en enfoques de ingeniería genética es una línea prometedora (79).

Se han desarrollado muchas nuevas líneas transgénicas en varios proyectos. La mayoría poseen resistencia a CLas, y el resto están destinadas al control del vector. La transformación de los cítricos se ha logrado mediante *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), principalmente en protoplastos, hojas, segmentos de tallo, semillas, epicotilos y suspensiones celulares embriogénicas (80). Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes es la pérdida en la eficiencia de transformación. Esta puede verse influida de forma negativa por diversos factores como son el genotipo, la edad, el tipo de explante, la cepa de *A. tumefaciens*, el procedimiento de inoculación, las condiciones de precultivo o el régimen de selección (5).

A pesar de los desafíos asociados a la transformación de los cítricos, el interés por el desarrollo de líneas transgénicas es muy alto. Para ello, se están llevando a cabo diferentes estudios utilizando distintas estrategias como; la identificación de genes de resistencia a la enfermedad (81), el uso de péptidos antimicrobianos (PAM) (49) y anticuerpos contra proteínas de CLas (82), el análisis de interacciones planta-patógeno describiendo así proteínas efectoras de la bacteria contra las que poder actuar (83) o el uso de promotores dirigidos específicamente al floema que permiten la expresión localizada del gen de interés en el lugar donde reside la bacteria (84). De entre estos estudios, la utilización de genes de resistencia y los PAM han presentado buenos resultados y su expresión en plantas para hacer frente a la enfermedad resulta de gran interés, por ello, se detallan a continuación algunos de los estudios más prometedores.

Los PAM se han utilizado como una nueva estrategia para el control de las enfermedades de las plantas, debido a la necesidad de alternativas con menor o ningún efecto de toxicidad e impacto en el medio ambiente (85). El modo de acción de los PAM no está completamente dilucidado, pero la mayoría de ellas inhiben el crecimiento microbiano mediante la permeabilización de la membrana celular a través de la formación de poros u otros efectos líticos que permiten el flujo de iones y nutrientes esenciales a las células (86,87). Un problema potencial es que los péptidos que actúan sobre las membranas no son completamente selectivos para las células microbianas y pueden presentar también toxicidad potencial para las células eucariotas (88,89). Por consiguiente, deben realizarse estudios detallados para determinar si una línea concreta es viable o no para el control de los fitopatógenos.

Una de las ventajas de los PAM es el amplio espectro de acción, ya que el uso de un solo péptido podría conferir resistencia a múltiples patógenos (90).

Concretamente y en base a los resultados, el péptido citrus-amp1, aislado de cítricos puede considerarse uno de los candidatos más prometedores de los analizados hasta el momento, ya que ha demostrado un efecto bactericida en las células procariotas, y una baja toxicidad en las células eucariotas (49). Es importante recalcar además que el hecho de contar con la secuencia completa del genoma de *Citrus sinensis*, contribuye en este tipo de estudios a reducir los problemas de desregulación y evitar la adición de secuencias extrañas en los cítricos.

Uno de los trabajos más avanzados, es el de los cítricos transgénicos resistentes al HLB que expresan dos genes de defensinas de espinacas, familia de péptidos dentro de los PAM en plantas (91). En la actualidad, se han obtenido ya los permisos de los Servicios Reguladores de Biotecnología del Servicio de Inspección de Salud Animal y Vegetal (APHIS) y de la Agencia de Protección Ambiental para realizar pruebas de campo más extensas tanto en Florida como en Texas (20).

Otro enfoque reciente de mejora genética en cítricos es el uso de genes que permiten inducir la resistencia sistémica adquirida (SAR). Esto ha dado lugar a la producción de árboles transgénicos resistentes a enfermedades como el Citrus Canker (78) y los resultados parecen prometedores en el HLB (77). La SAR es una respuesta de defensa de las plantas que da lugar a la expresión de genes de defensa específicos que aumentan la resistencia innata a una mayor infección por patógenos (92). La utilización del SAR es un método novedoso para emplear el sistema inmunológico inherente de la planta para reducir el desarrollo y la propagación de la enfermedad. El SAR proporciona protección contra un amplio espectro de microorganismos y se asocia con la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (93). Los resultados de un estudio mostraron que la sobreexpresión del gen AtNPR1 podría proporcionar resistencia al HLB (77). Se ha visto que algunas líneas transgénicas que sobreexpresan AtNPR1, bajo el promotor constitutivo CaMV35S y un promotor específico del floema (AtSUC2), han mostrado una reducción de la gravedad de la enfermedad y un pequeño porcentaje permanecieron libres de la misma, después de 36 meses de plantación en un campo infectado por el patógeno.

Además, se han realizado diferentes estudios “ómicos” y en concreto transcriptómicos para comprobar la diferencia de expresión génica entre especies tolerantes como *Citrus hystrix* y *P. trifoliata*, y especies susceptibles como *Citrus*

sinensis. Sin duda, estos trabajos pueden ayudar a la identificación de genes interesantes para la futura obtención de plantas resistentes al HLB (94,95).

A pesar del optimismo de que las mejoras de la resistencia al HLB producidas mediante tecnologías de ingeniería genética podrían suponer el fin de la lucha contra el patógeno, existen diferentes inconvenientes que podrían retrasar este objetivo. Por una parte, el desarrollo de líneas transgénicas está frenado por los problemas técnicos asociados a la transformación de los cítricos (5). Además, existe una gran preocupación sobre la aceptación de alimentos transgénicos en la industria alimenticia. En relación a esto, en un estudio realizado por Singerman et al. en 2017 mostraron que las preocupaciones específicas más importantes acerca de los cítricos genéticamente resistentes al HLB incluían, por orden, I) la aceptación del consumidor, II) la aceptación del elaborador, III) cuestiones de producción, IV) el costo de adquisición y plantación de los nuevos árboles, V) cuestiones de seguridad relacionadas con el origen de los genes añadidos, y VI) preocupaciones ambientales (96). A todo esto se añadiría el proceso de reglamentación que puede ser difícil y largo, ya que los representantes de organismos reguladores deben de aprobar el uso de los nuevos cultivos de cítricos transgénicos (20).

7. Perspectivas de futuro

La mejora de la detección del HLB a partir de la capacidad olfativa canina (47), podría suponer que la identificación de los árboles afectados y su eliminación se convierta en una de las alternativas más eficaces para acabar con la enfermedad. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, este método presenta como principal inconveniente, el coste económico que supone la pérdida de los árboles así como las inspecciones necesarias. Es por esto por lo que el escenario actual tiene como objetivo principal mantener la productividad de los árboles infectados con CLAs y para ello, se están investigando numerosos tratamientos terapéuticos, aunque hasta la fecha ninguno ha demostrado ser eficaz. El uso de antibióticos y la termoterapia, se presentan como las dos alternativas más prometedoras y quizás, su uso combinado podría suponer un gran avance para acabar con la enfermedad. Profundizar en el estudio de estos tratamientos podría ayudar a controlar el HLB a corto plazo. Sin embargo, el desarrollo de nuevos cultivos menos susceptibles al HLB que los utilizados actualmente, ya sean mediante el cultivo convencional o la transformación genética se plantea como la única esperanza a largo plazo contra la enfermedad. No obstante, la mejora de los cítricos es un proceso muy largo y, por tanto, obtener

variedades resistentes al HLB para reemplazar las utilizadas actualmente, puede llevar mucho tiempo.

Los métodos de cultivo convencionales presentan limitaciones para producir nuevos cultivos de cítricos con mayor resistencia a las enfermedades (81). Por lo tanto, la ingeniería genética, incluidas las tecnologías transgénicas o de edición del genoma, podría ser el método elegido para superar estas limitaciones y permitir la liberación de cultivos transgénicos con características deseables en un plazo de tiempo más breve (21). Sin embargo, la obtención de estos cultivos y los ensayos necesarios siguen siendo procesos largos. Además, los obstáculos reglamentarios que acompañan a la liberación de los cítricos transgénicos puede alargar aún más el proceso.

La eficiencia de la transformación es uno de los principales motivos que dificulta y retrasa la obtención de cultivos transgénicos resistentes al HLB (20). Existe la necesidad de desarrollar sistemas de transformación altamente eficientes para los genotipos de cítricos de interés comercial. Mientras tanto, podría ser útil seleccionar un huésped cítrico susceptible, pese a que no sea de interés comercial, que proporcione niveles constantemente altos de transformación como modelo que pueda utilizarse para evaluar los genes de interés. Un avance más rápido en la transformación de los cítricos debería ser un objetivo primordial de todos los equipos que trabajan en los proyectos de ingeniería genética.

Respecto a los obstáculos reglamentarios, la industria de los cítricos debería de seguir los pasos de otros sectores que ya han recibido aprobaciones reglamentarias para cultivos transgénicos o que están en proceso de obtenerla, como las manzanas, ciruelas y las papayas. De este modo se podría facilitar y agilizar estos procesos en la industria cítrica.

En las zonas afectadas por la crisis provocada por el HLB, las soluciones a largo plazo supondrán, probablemente, la combinación de diferentes métodos. Es probable que la gestión de la enfermedad dependa tanto de la reducción del vector como el desarrollo de huéspedes resistentes al HLB de forma duradera.

En las zonas donde la enfermedad aún no ha sido detectada, se ha de evitar la introducción, tanto de la bacteria como de sus vectores utilizando las medidas de cuarentena adecuadas. Las experiencias de otras zonas cítricas demuestran que la respuesta a la presencia de alguno de los vectores del HLB debe ser rápida para reducir los riesgos de entrada y/o dispersión de la enfermedad. En estos casos, por

tanto, el mejor punto sobre el que actuar es el control de la transmisión mediada por insectos (36). Las dificultades asociadas a trabajar con el patógeno, y la falta de información sobre las interacciones bacteria-huésped dificulta el diseño de estrategias eficaces para controlar la infección (20). Por ello, en Europa deberían ponerse en marcha medidas para hacer frente al vector, reduciendo su población y limitando su predilección por los cítricos, con el objetivo de dificultar la entrada de la enfermedad en la región y si esto sucede, poder controlarla más fácilmente (97). Se proponen diversas aproximaciones que deberían de estudiarse en los próximos años que podrían ayudar a lograr este objetivo, estas se resumen en la **Figura 6** (97).

Una alternativa interesante es la generación de cultivos modificados genéticamente que expresan una proteína (Cry) de *Bacillus thuringiensis* que cuando es ingerida por el insecto se procesa y une a receptores específicos que conducen a su muerte. Además, los humanos y la mayoría de insectos beneficiosos carecen de estos receptores, por tanto es una tecnología inocua para estos. Se han encontrado diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* capaces de matar a las ninfas *D. citri* (98). La investigación de su efectividad en *T. erythrae* aún debe de ser probada, pero la sobreexpresión de estos genes podría ser un método interesante para generar plantas resistentes a ambos insectos.

Otra técnica que se ha utilizado para el manejo de plagas es el silenciamiento de genes esenciales para la vida del vector, mediante ARN de interferencia (ARNi). Su efectividad para acabar con el vector ha sido demostrada mediante la aplicación exógena de dsARN específicos (99). El desarrollo de plantas transgénicas capaces de inducir estos ARNi frente a uno o más de estos genes diana supondrá una forma eficaz de limitar la supervivencia del insecto y, por tanto, la transmisión del HLB.

Otra de las alternativas que cabe destacar es el papel de los compuestos orgánicos volátiles (COV). Estos participan en la defensa de las plantas, en la comunicación con otros organismos e incluso en la comunicación entre distintas partes de la propia planta (100). Se ha observado que *D. citri* es atraída por el aroma de las hojas y repelida por distintos compuestos sulfurosos que son emitidos de forma transitoria por las hojas de la guayaba en respuesta a una herida. La presencia de guayabas junto a cítricos en cultivos mixtos ha demostrado que ejercen un papel protector frente a la infección por el HLB (101). El análisis de emisiones de COV de diferentes variedades de cítricos y guayabas ha permitido identificar compuestos que repelen a *D. citri*. La sobreexpresión de genes que inducen estos compuestos puede conducir a la obtención de variedades que resultarían repelentes para el insecto.

Además, determinar cuáles de los COV son responsables de la atracción de estos insectos y limitar su síntesis mediante ARNi o edición genómica con herramientas como CRISPR/Cas9 en las hojas o en los brotes puede ser otro enfoque interesante. Por tanto, profundizar en el estudio de estos COV tanto para *D. citri* como para *T. erytrae* puede ser una alternativa de gran interés para lograr su control, además, utilizar secuencias del propio genoma de los cítricos para realizar estas modificaciones, facilitaría su regulación y aceptación por el consumidor (97).

Por el momento ya se están realizando los primeros ensayos de naranjos modificados genéticamente mediante algunas de las estrategias descritas y se espera que, en un futuro próximo, la implementación de estas estrategias permita contribuir a controlar el HLB y sus vectores.

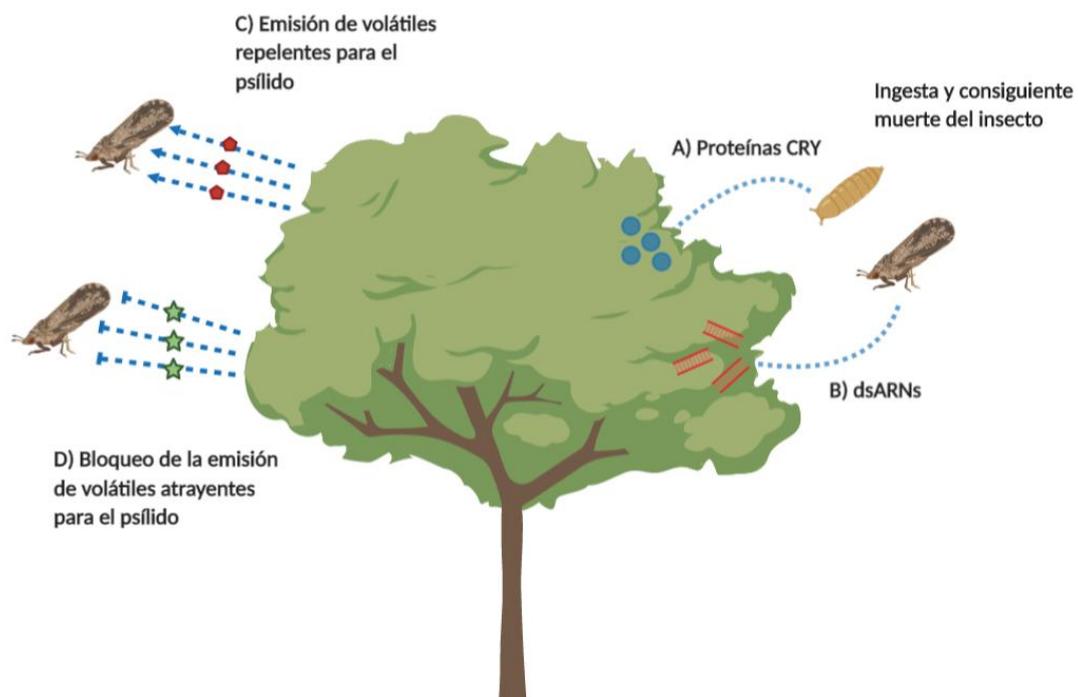


Figura 6. Posibles estrategias biotecnológicas encaminadas a controlar las poblaciones de los psíidos causantes del HLB. A) Expresión de proteínas CRY de *Bacillus thuringiensis* que conduce a la muerte del psílido. B) Silenciamiento de genes esenciales para la vida del vector mediante la aplicación exógena de dsARN específicos. C) Sobreexpresión de genes que inducen la emisión de COV repelentes para el psílido. D) Limitación de la síntesis de COV responsables de la atracción de los insectos. Adaptado de Alquézar y Peña, 2016.

8. Conclusión

El HLB es la amenaza más grave para la producción mundial de cítricos, provocando la disminución de la productividad y de la calidad de los frutos hasta acabar con la viabilidad económica de los árboles. El HLB se ha extendido por la mayoría de las regiones productoras de cítricos del mundo, a excepción de la Cuenca del Mediterráneo, Australia o Nueva Zelanda. Sin embargo, en países como España o Portugal, se ha detectado la presencia de *T. erythrae*, y por tanto, la entrada del HLB es una seria amenaza para la industria citrícola de esta zona.

Aunque se han investigado numerosos tratamientos terapéuticos con el objetivo de acabar con el HLB y mantener la productividad de los árboles infectados con *CLAs*, hasta la fecha ninguno ha demostrado ser efectivo. Profundizar en el estudio de los mismos puede ser de gran ayuda para acabar con la enfermedad. Sin embargo, el desarrollo de cultivos menos susceptibles al HLB que los estándares actuales, ofrece la única esperanza a largo plazo de encontrar una solución a la enfermedad. El enfoque más prometedor para el desarrollo de cultivares resistentes al HLB es a través de la transformación genética, ya que se puede lograr más rápidamente que la reproducción convencional. Por tanto, es una alternativa de gran interés y los próximos estudios deberían de centrarse en avanzar en este campo. Adicionalmente, la ingeniería genética también podría ser clave en las zonas donde el vector esté presente, aunque no lo esté la enfermedad, ya que existen diferentes alternativas de gran interés para su control.

9. Metodología

Estrategia de búsqueda: Para una primera aproximación al tema, se realizó una búsqueda de revisiones que tuviesen como tema central el Huanglongbing (HLB). Para ello, se utilizaron las plataformas PubMed y Web Of Science, utilizando como palabras clave “Huanglongbing review” y “HLB review”. De entre los resultados se escogieron los artículos que mejor se ajustaban al objetivo, obtener una visión general de la enfermedad. Además, dada la importancia de un autor en el HLB se decidió hacer una búsqueda de todos los artículos de dicho autor relacionados con el HLB, repitiendo las búsquedas anteriores y añadiendo como autor “J. M. Bové”. Posteriormente, se realizaron búsquedas para profundizar en el conocimiento de los vectores, agente causal y la sintomatología, utilizando como palabras clave “Asian citrus psyllid”, “Diaphorina citri”, “African citrus psyllid” y “Trioza erytrae” para el vector; “Candidatus Liberibacter”, “Candidatus Liberibacter asiaticus” y “Candidatus Liberibacter americanus” para el agente causal; “HLB-associated symptoms” y “HLB/Huanglongbing symptoms” para la sintomatología. Además, se realizó otra búsqueda con el objetivo de conocer en detalle las diferentes alternativas utilizadas y en investigación, para tratar la enfermedad, para ello se usaron como palabras clave “HLB/Huanglongbing management”, “Control of HLB/Huanglongbing”, “HLB/Huanglongbing management strategies”. Finalmente, se realizó una búsqueda adicional para profundizar, concretamente, en las estrategias relacionadas con la mejora genética, ya que se trata de los aspectos más prometedores en este ámbito, para ello se utilizaron como palabras clave “HLB/Huanglongbing genetic engineering”. Las búsquedas se han realizado entre los meses de Marzo y Junio de 2020, concretamente, las últimas búsquedas se han realizado el 20 de Junio de 2020, donde se ha realizado una revisión general de todos los temas comentados, comprobando, que no se hubiese actualizado ninguno de estos con nueva información.

Criterios de inclusión y exclusión: Se incluyeron las publicaciones recientes, principalmente las realizadas en los últimos 5 años sobre cada uno de los temas, a excepción de cuando se realizó una búsqueda general del tema, ya que se pretendía obtener un visión más global. Se utilizó la información que era relevante para cada uno de los puntos de desarrollo del presente trabajo. Además, se incorporó la información que era citada en las publicaciones seleccionadas, pese a la antigüedad, si era oportuna a la hora de explicar aspectos importantes.

10. Autoevaluación

El trabajo presentado se ha realizado a partir de la estancia en prácticas en el grupo de investigación de Virología Molecular de Plantas del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). En un primer momento, se pretendía caracterizar dos promotores floemáticos de *Citrus sinensis* como aportación al proyecto PRE-HLB. El objetivo de este proyecto es desarrollar e implementar un plan de contingencia integral para proteger el sector de los cítricos en la Unión Europea de los factores impulsores de la enfermedad de HLB y crear nuevas soluciones para gestionar la enfermedad a través de un enfoque multidisciplinar. Sin embargo, dada la situación actual provocada por el SARS-CoV-2, las prácticas se interrumpieron sin poder llegar a resultados sólidos. Por esta razón, se decidió realizar una revisión sobre las diferentes aproximaciones que se pueden utilizar para el control de la enfermedad. Por una parte, el tiempo de la estancia ha sido realmente provechoso y suficiente para adquirir más experiencia a nivel de laboratorio y aprender conocimientos sobre el Huanglongbing que han podido ser aprovechados el trabajo. Por otra parte, realizar la revisión sobre el mismo tema que las prácticas ha sido de gran utilidad, ya que ha permitido una mayor comprensión de las mismas y ampliar mis conocimientos sobre las diferentes técnicas que pueden utilizarse para tratar la enfermedad, destacando principalmente, las técnicas de ingeniería genética. Por tanto, se ha tratado de una oportunidad para aprender sobre un tema de auge en el sector biotecnológico.

En conclusión, realizar el Trabajo de Fin de Grado de Biotecnología ha sido un proceso muy positivo y enriquecedor que me ha permitido desarrollar diversas competencias tanto prácticas como teóricas que pueden ser de gran utilidad en un futuro.

11. Bibliografía

1. Liu Y, Heying E, Tanumihardjo SA. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2012;11(6):530–45.
2. Hussain S, Rao MJ, Anjum MA, Ejaz S, Umar U ud D, Ali MA, et al. Effect of different combinations of antibiotics on fruit quality and antioxidant defense system in Huanglongbing infected Kinnow orchards. *AMB Express.* 2019;9(1).
3. Blauer R. Citrus: World Markets and Trade | USDA Foreign Agricultural Service. *USDA Foreign Agric Serv.* 2020;13.
4. U.S. Department of Agriculture NASS (USDA-N. Citrus Fruits 2019 Summary). 2019;1–34.
5. Febres V, Fisher L, Khalaf A, Moore G. Citrus Transformation: Challenges and Prospects. *Genet Transform.* 2011;101–22.
6. Lee RF, Keremane ML. Mild strain cross protection of tristeza: A review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Front Microbiol.* 2013;4:1–11.
7. Tabachnick WJ. Diaphorina Citri (Hemiptera: Liviidae) Vector Competence for the Citrus Greening Pathogen “Candidatus Liberibacter Asiaticus.” *J Econ Entomol.* 2015;108(3).
8. McCollum G, Baldwin E. Huanglongbing: Devastating disease of citrus. In: *Horticultural Reviews.* 2016. p. 315–61.
9. Hodges AW, Spreen TH. Economic Impacts of Citrus Greening (HLB) in Florida, 2006/07–2010/11. *IFAS Ext.* 2012;1–6.
10. Court CD, Hodges AW, Rahmani M, Spreen TH. Economic Contributions of the Florida Citrus Industry in 2015-16. *UF/IFAS Ext Serv.* 2017;1–39.
11. Zhang C. Citrus greening is killing the world’s orange trees. Scientists are racing to help. *Chemical & Engineering News.* 2019;97:1–11.
12. Palomo JL, Siverio F, Cubero J. Candidatus Liberibacter: agentes causales de enfermedades importantes en cultivos de interés en España. In: *FITOPATOLOGÍA n°1: Bacterias asesinas.* 2017. p. 15–22.
13. Cosave. Plan regional de contencion del Huanglongbing de los citricos (HLB). 2017;1–59.
14. Gabriel D, Gottwald TR, Lopes SA, Wulff NA. Bacterial pathogens of citrus: Citrus canker, citrus variegated chlorosis and Huanglongbing. In: *The Genus Citrus.* 2020. p. 371–89.
15. Abdullah TL, Shokrollah H, Sijam K, Abdullah SNA. Control of Huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. *African J Biotechnol.* 2009;8(17):4007–15.
16. Reinking OA. Diseases of Economic Plants in Southern China. *Philipp Agric.* 1919;8(4):109–34.
17. Graça JV. Citrus Greening Disease. In: *Annual Review of Phytopathology.* Annual Reviews Inc.; 1991. p. 109–36.

18. Fagen JR, Leonard MT, Coyle JF, McCullough CM, Davis-Richardson AG, Davis MJ, et al. *Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(7):2461–6.
19. Lafèche D, Bové J. Mycoplasmes dans les agrumes atteints de “Greening”, de “Stubborn” ou de maladies similaires. *Fruits*. 1970;25(6):455–65.
20. A Review of the Citrus Greening Research and Development Efforts Supported by the Citrus Research and Development Foundation: Fighting a Ravaging Disease. Washington DC: The National Academies Press; 2018. 1-289 p.
21. Sun L, Nasrullah, Ke F, Nie Z, Wang P, Xu J. Citrus genetic engineering for disease resistance: past, present and future. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21).
22. Thapa SP, De Francesco A, Trinh J, Gurung FB, Pang Z, Vidalakis G, et al. Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provides insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Mol Plant Pathol*. 2020;21(5):716–31.
23. Tsai JH, Liu YH. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on Four Host Plants. *J Econ Entomol*. 2000;93(6):1721–5.
24. Parra JRP, Lopes JRS, Torres MLG, Nava DE, Paiva PEB. Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao Huanglongbing. *Citrus Res Technol*. 2010;31(1):37–51.
25. Junta de Andalucía: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. *Diaphorina citri*, vector del Huanglongbing (Psílido asiático de los cítricos) [Internet]. [cited 2020 Apr 19]. p. 4. Available from:
https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/ficha_divulgativa_DIAPHORINA_CITRI.pdf
26. Gottwald TR. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. *Annu Rev Phytopathol*. 2010 Jul 5;48(1):119–39.
27. Ammar ED, Shatters RG, Hall DG. Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Associated with Citrus Huanglongbing Disease, in its Psyllid Vector using Fluorescence in situ Hybridization. *J Phytopathol*. 2011;159(11–12):726–34.
28. El Gobierno alerta de la presencia en Cantabria de una plaga que daña los cítricos [Internet]. Europa Press. 2020 [cited 2020 Jun 26]; Available from:
<https://www.europapress.es/cantabria/noticia-gobierno-alerta-presencia-cantabria-plaga-dana-citricos-20200622130010.html>
29. McClean APD, Schwarz RE. Greening or Blotchy-Mottle Disease of Citrus. *Phytophylactica*. 1970;194:177–94.
30. Bove J. Huanglongbing: a Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. *J Plant Pathol*. 2006;85(4):265–70.
31. Dala-Paula BM, Plotto A, Bai J, Manthey JA, Baldwin EA, Ferrarezi RS, et al. Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Front Plant Sci*. 2019;9:1–19.
32. Bassanezi RB, Montesino LH, Stuchi ES. Effects of Huanglongbing on fruit

- quality of sweet orange cultivars in Brazil. *Eur J Plant Pathol.* 2009;125(4):565–72.
33. Rosales R, Burns JK. Phytohormone Changes and Carbohydrate Status in Sweet Orange Fruit from Huanglongbing-infected Trees. *J Plant Growth Regul.* 2011;30(3):312–21.
 34. Albrecht U, Fiehn O, Bowman KD. Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. *Plant Physiol Biochem.* 2016;107:33–44.
 35. Martinelli F, Dandekar AM. Genetic mechanisms of the devious intruder *Candidatus Liberibacter* in citrus. *Front Plant Sci.* 2017;8:1–4.
 36. Cocuzza GEM, Alberto U, Hernández-Suárez E, Siverio F, Di Silvestro S, Tena A, et al. A review on *Trioza erytreae* (African citrus psyllid), now in mainland Europe, and its potential risk as vector of huanglongbing (HLB) in citrus. *J Pest Sci (2004).* 2017;90(1).
 37. Paudyal KP. Technological Advances in Huanglongbing (HLB) or Citrus Greening Disease Management. *J Nepal Agric Res Counc.* 2016;1:41–50.
 38. Pan XL, Dong FS, Wu XH, Xu J, Liu XG, Zheng YQ. Progress of the discovery, application, and control technologies of chemical pesticides in China. Vol. 18, *Journal of Integrative Agriculture.* Chinese Academy of Agricultural Sciences; 2019. p. 840–53.
 39. Amondi BR. Assessment of incidence , severity and distribution patterns of citrus greening in Kenya and Tanzania; the role of African Citrus Triozid endosymbionts in disease epidemiology Brenda Amondi Rasowo. [Bonn]: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; 2019.
 40. *Tamarixia dryi* reduce las poblaciones de *Trioza erytreae* en Canarias [Internet]. *Phytoma.* 2019 [cited 2020 Jun 5]. Available from:
<https://www.phytoma.com/noticias/noticias-de-actualidad/tamarixia-dryi-reduce-las-poblaciones-de-trioza-erytreae-en-canarias>
 41. El IVIA inicia el seguimiento de la *Tamarixia dryi*, la avispa contra el insecto que contagia el HLB tras sus sueltas experimentales en Galicia y Portugal [Internet]. *El Periòdic.* 2019 [cited 2020 Jun 5]. Available from:
https://www.elperiodic.com/ivia-inicia-seguimiento-tamarixia-dryi-avispa-contra-insecto-contagia-tras-sueltas-experimentales-galicia-portugal_653297
 42. Berg MA van den. Synopsis of strategies to reduce populations of *Citrus psylla*, *Trioza erytreae*, and the spread of greening. *Fruits.* 1996;49(3):229–34.
 43. Tomaseto AF, Marques RN, Fereres A, Zanardi OZ, Volpe HXL, Alquézar B, et al. Orange jasmine as a trap crop to control *Diaphorina citri*. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–11.
 44. Quarles W. IPM for Asian citrus psyllid and huanglongbing disease. *IPM Pract.* 2013;33(1):1–16.
 45. Mccollum G, Hilf M, Irey. Relationship between Ct values, HLB symptoms and CLas titer. Vol. 1, *Journal of Citrus Pathology.* 2014.
 46. Agustí M, Mesejo C, Juan M, Almela V. Cuajado y Desarrollo de los Frutos

- Cítricos. Valencia: Generalitat Valenciana: Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación; 2003. 80 p.
47. Gottwald T, Poole G, McCollum T, Hall D, Hartung J, Bai J, et al. Canine olfactory detection of a vectored phyto-bacterial pathogen, *Liberibacter asiaticus*, and integration with disease control. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Feb 18 [cited 2020 Jul 7];117(7):3492–501. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1914296117
 48. Zhang M, Powell CA, Zhou L, He Z, Stover E, Duan Y. Chemical compounds effective against the citrus Huanglongbing bacterium “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in planta. *Phytopathology*. 2011;101(9):1097–103.
 49. Kishi RNI, Stach-Machado D, de Lacorte Singulani J, Santos CT dos, Fusco-Almeida AM, Cilli EM, et al. Evaluation of cytotoxicity features of antimicrobial peptides with potential to control bacterial diseases of citrus. *PLoS One*. 2018;13(9):1–18.
 50. Munir S, He P, Wu Y, He P, Khan S, Huang M, et al. Huanglongbing Control: Perhaps the End of the Beginning. *Microb Ecol*. 2018;76(1):192–204.
 51. McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL. Antibiotic Use in Plant Agriculture. *Annu Rev Phytopathol*. 2002;40(1):443–65.
 52. Zhang M, Guo Y, Powell CA, Doud MS, Yang C, Duan Y. Effective antibiotics against “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in HLB-affected citrus plants identified via the graft-based evaluation. *PLoS One*. 2014;9(11):17–21.
 53. Puttamuk T, Zhang S, Duan Y, Jantasorn A, Thaveechai N. Effect of chemical treatments on “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infected pomelo (*Citrus maxima*). *Crop Prot*. 2014;65:114–21.
 54. Spann TM, Rouse RE, Schumann AW. The Theory of Managing Huanglongbing with Plant Nutrition and Real World Success in Florida. In: *Proceedings of the 2nd international research conference on Huanglongbing*. 2011.
 55. Xia Y, Ouyang G, Sequeira RA, Takeuchi Y, Baez I, Chen J. A Review of Huanglongbing (Citrus Greening) Management in Citrus Using Nutritional Approaches in China. *Plant Heal Prog*. 2011;12(1):24.
 56. Gottwald TR, Graham JH, Irey MS, McCollum TG, Wood BW. Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Prot*. 2012;36:73–82.
 57. Xia Y, Ouyang G, Sequeira RA, Takeuchi Y, Baez I, Chen J. A Review of Huanglongbing (Citrus Greening) Management in Citrus Using Nutritional Approaches in China. *Plant Heal Prog*. 2011;12(1):24.
 58. Frank G. An alternative approach [Internet]. 2009 [cited 2020 Apr 25]. Available from: <https://www.growingproduce.com/citrus/an-alternative-approach/>
 59. Rouse B, Irey M, Gast T, Boyd M, Willis T. Fruit Production in a Southwest Florida Citrus Grove Using the Boyd Nutrient / SAR Foliar Spray. *Proc Fla State Hort Soc*. 2012;125(61):61–4.
 60. Spreen TH, Baldwin J-P, Stephen H F. An Economic Assessment of the Impact of Huanglongbing on Citrus Tree Plantings in Florida. *HortScience*. 2014;49(8):1052–5.

61. Bové JM. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica*. 2014;42(5):579–83.
62. Shen W, Cevallos-Cevallos JM, Nunes da Rocha U, Arevalo HA, Stansly PA, Roberts PD, et al. Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus Liberibacter Ct* values in citrus trees infected with Huanglongbing. *Eur J Plant Pathol*. 2013;137(4):727–42.
63. Stansly PA, Arevalo HA, Qureshi JA, Jones MM, Hendricks K, Roberts PD, et al. Vector control and foliar nutrition to maintain economic sustainability of bearing citrus in Florida groves affected by huanglongbing. *Pest Manag Sci*. 2014;70(3):415–26.
64. Chiyaka C, Singer BH, Halbert SE, Morris JG, Van Bruggen AHC. Modeling huanglongbing transmission within a citrus tree. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(30):12213–8.
65. Kunkel LO. Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of Peach. *Phytopathology*. 1936;26(9):809–30.
66. Fan G, Xia Y, Lin X, Hu H, Wang X, Ruan C, et al. Evaluation of thermotherapy against Huanglongbing (citrus greening) in the greenhouse. *J Integr Agric*. 2016;15(1):111–9.
67. Hoffman MT, Doud MS, Williams L, Zhang MQ, Ding F, Stover E, et al. Heat treatment eliminates “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology*. 2013;103(1):15–22.
68. Lindow SE, Brandl MT. Microbiology of the phyllosphere. Vol. 69, Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology (ASM); 2003. p. 1875–83.
69. Johnson EG, Wu J, Bright DB, Graham JH. Association of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathol*. 2014;63(2):290–8.
70. Stover EW, McCollum TG. Levels of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and *Xanthomonas citri* in diverse citrus genotypes and relevance to potential transmission from pollinations. *HortScience*. 2011;46(6):854–7.
71. Ahmad K, Sijam K, Hashim H, Abdu A, Rosli Z. Assessment of Citrus Susceptibility towards *Candidatus Liberibacter Asiaticus*-Terengganu Isolate Based on Vector and Graft Transmission Tests. *J Agric Sci*. 2011;3(3):p159.
72. Albrecht U, Bowman KD. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Sci*. 2012;185–186:118–30.
73. Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S, Dawson WO. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (Citrus Greening) under different conditions. *Phytopathology*. 2009;99(12):1346–54.
74. Grosser JW, Fred G, Gmitter Jr, Gmitter FGJ. Breeding disease-resistant citrus for Florida: Adjusting to the canker/HLB world - Part 2: rootstocks. *Citrus Ind*. 2013;94:10–6.

75. Stover E, McCollum T, Ramos J, Shatters R. Growth, health and *Liberibacter asiaticus* titer in diverse citrus scions on mandarin vs. trifoliolate hybrid rootstocks in a field planting with severe Huanglongbing. *Proc Florida State Hortic Soc.* 2014;127:53–9.
76. Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. Plant protoplasts: Status and biotechnological perspectives. Vol. 23, *Biotechnology Advances*. 2005. p. 131–71.
77. Dutt M, Barthe G, Irey M, Grosser J. Transgenic citrus expressing an arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus greening). *PLoS One.* 2015;10(9):1–17.
78. Chen X, Barnaby JY, Sreedharan A, Huang X, Orbović V, Grosser JW, et al. Over-expression of the citrus gene CtNH1 confers resistance to bacterial canker disease. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2013;84(1):115–22.
79. Soler N, Plomer M, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, et al. Methods for Producing Transgenic Plants Resistant to CTV. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 229–43.
80. Dutt M, Grosser JW. An embryogenic suspension cell culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Rep.* 2010;29(11):1251–60.
81. Qiu W, Soares J, Pang Z, Huang Y, Sun Z, Wang N, et al. Potential Mechanisms of AtNPR1 Mediated Resistance against Huanglongbing (HLB) in Citrus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):1–17.
82. Yuan Q, Jordan R, Brlansky RH, Minenkova O, Hartung J. Development of single chain variable fragment (scFv) antibodies against surface proteins of “*Ca. Liberibacter asiaticus*.” *J Microbiol Methods.* 2016;122:1–7.
83. Clark K, Franco JY, Schwizer S, Pang Z, Hawara E, Liebrand TWH, et al. An effector from the Huanglongbing-associated pathogen targets citrus proteases. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–11.
84. Dutt M, Ananthakrishnan G, Jaromin MK, Brlansky RH, Grosser JW. Evaluation of Four Phloem-Specific Promoters in Vegetative Tissues of Transgenic Citrus Plants. *Tree Physiol.* 2012;32(1).
85. Hancock REW, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Vol. 24, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group; 2006. p. 1551–7.
86. Castro M, Cilli E, Fontes W. Combinatorial Synthesis and Directed Evolution Applied to the Production of α -Helix Forming Antimicrobial Peptides Analogues. *Curr Protein Pept Sci.* 2006;7(6):473–8.
87. Paulsen VS, Blencke H-M, Benincasa M, Haug T, Eksteen JJ, Styrvold OB, et al. Structure-Activity Relationships of the Antimicrobial Peptide Arasin 1 — And Mode of Action Studies of the N-Terminal, Proline-Rich Region. *PLoS One.* 2013;8(1):1–11.
88. Bradshaw JP. Cationic antimicrobial peptides: Issues for potential clinical use. Vol. 17, *BioDrugs*. Springer; 2003. p. 233–40.
89. Cespedes GF, Lorenzón EN, Vicente EF, Mendes-Giannini MJ, Fontes W,

- Castro MS, Cilli EM. Mechanism of Action and Relationship Between Structure and Biological Activity of Ctx-Ha: A New Ceratotoxin-like Peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *Protein Pept Lett*. 2012;19(6):596–603.
90. Stover ED, Stange RR, Mccollum TG, Jaynes J, Irely M, Mirkov E. Screening antimicrobial peptides in vitro for use in developing transgenic citrus resistant to huanglongbing and citrus canker. *J Am Soc Hortic Sci*. 2013;138(2):142–8.
 91. Spinach genes may stop deadly citrus disease | AgriLife Today [Internet]. [cited 2020 Jun 10]. Available from:
<https://agrifetoday.tamu.edu/2012/03/26/transgenic-citrus-trees/>
 92. Kuć J. Induced Immunity to Plant Disease. *Bioscience*. 1982;32(11):854–60.
 93. Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, et al. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*. 1991;3(10):1085–94.
 94. Hu Y, Zhong X, Liu X, Lou B, Zhou C, Wang X. Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in response to “*Candidatus Liberibacter Asiaticus*” infection. *PLoS One*. 2017 Dec 1;12(12).
 95. Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, et al. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. *Hortic Res*. 2017;4.
 96. Singerman A, Useche P. Florida citrus growers’ first impressions on genetically modified trees. University of Missouri, College of Agriculture, Food and Natural Resources; 2017.
 97. Alquézar B, Peña L. Estrategias biotecnológicas para el control del Huanglongbing | Revista de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular | SEEBM [Internet]. 2016 [cited 2020 Jun 22]. Available from:
<https://www.seebm.es/revista/articulo.php?id=274&url=estrategias-biotecnologicas-para-el-control-del-huanglongbing>
 98. Dorta SO, Balbinotte J, Monnerat R, Lopes JRS, da Cunha T, Zanardi OZ, et al. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains in citrus and their pathogenicity to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) nymphs. *Insect Sci*. 2018;27(3):519–30.
 99. El-Shesheny I, Hajeri S, El-Hawary I, Gowda S, Killiny N. Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality. *PLoS One*. 2013;8(5):2–9.
 100. Hijaz F, Nehela Y, Killiny N. Possible role of plant volatiles in tolerance against huanglongbing in citrus. *Plant Signal Behav*. 2016;11(3).
 101. Rouseff RL, Onagbola EO, Smoot JM, Stelinski LL. Sulfur volatiles in guava (*Psidium guajava* L.) leaves: Possible defense mechanism. *J Agric Food Chem*. 2008;56(19):8905–10.