

Capítulo VI

Manejo de enfermedades de cítricos en ambiente protegido

Diana Rodríguez-Mora

Lizeth Palacios Joya

Mauricio Fernando Martínez

Nubia Murcia

La producción de plántulas de cítricos dentro de casa de malla es una de las estrategias de manejo preventivo para reducir la aparición de algunas plagas y enfermedades. No obstante, la propagación vegetativa de cítricos se hace a través de injerto; esta forma de multiplicación favorece la diseminación de diferentes tipos de virus, viroides y bacterias, que producen enfermedades como la tristeza de los cítricos, la exocortis y el Huanglongbing (HLB), entre otras. Estas enfermedades afectan los cítricos por su condición sistémica (su movimiento dentro de la planta), y son transmitidas de forma mecánica por herramientas o insectos vectores; además, los síntomas se observan en un periodo posterior a la infección o simplemente no se observan síntomas (asintomáticas).

Al estar presentes en las plantas de vivero, estas enfermedades pasan a los nuevos huertos por el uso del mismo material de siembra contaminado. La multiplicación de plantas de cítricos en casa de malla también se puede ver afectada por diferentes patógenos que causan enfermedades como la gomosis, antracnosis y fumagina, que se diferencian de las otras enfermedades por la forma de diseminación y las condiciones de manejo dentro de las casas de malla.

En este capítulo se presentan algunas generalidades del modelo de certificación de cítricos y se describen las principales enfermedades que se pueden encontrar en ambiente protegido de casa de malla, así como algunas recomendaciones de manejo para asegurar que las plantas se multipliquen y comercialicen libres de patógenos, con base en las directrices reglamentadas en la Resolución 12816 del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 2019).

Modelo de certificación de cítricos

La mejor alternativa para garantizar la sanidad del material de siembra es la certificación sanitaria del material de propagación básico: semillas y yemas, así como la tecnología usada para la producción de plantas de vivero bajo ambiente protegido, pues ambas garantizarían la vida útil y la producción de los nuevos huertos por establecer. El sistema de producción de material de propagación certificado de cítricos requiere la conectividad entre el programa de saneamiento, el programa de cuarentena y el programa de certificación.

El programa de saneamiento permite la obtención de plantas sanas de variedades establecidas en el país y diagnóstico de patógenos, y debe cumplir varios requisitos: 1) selección de los árboles madres a partir de cultivares locales, 2) pruebas de diagnóstico de patógenos reglamentados a los árboles madres seleccionados, 3) saneamiento del material de propagación para la obtención de plantas libres de patógenos por el método de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* o termoterapia, 4) pruebas de diagnóstico de plantas obtenidas por microinjertación, y 5) conservación y mantenimiento de plantas sanas bajo condiciones protegidas (Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical [IIFT], 2010).

El programa de cuarentena contiene las regulaciones y procedimientos para introducir de manera segura recursos genéticos de cítricos (yemas y semillas) y evitar la introducción de plagas y enfermedades exóticas o cuarentenarias que representen

un riesgo para la citricultura del país; asimismo, el programa de certificación garantiza el estatus fisiológico, genético y sanitario del material que se va a propagar y distribuir a través de los viveros (IIFT, 2010; Murcia et al., 2012).

En el mundo, los programas de certificación de cítricos se iniciaron cuando se comprobó que las enfermedades eran transmisibles por injerto. La presencia de tristeza de los cítricos, exocortis, caquexia, psorosis, clorosis variegada de los cítricos (CVC) y HLB han ejercido fuerte presión para desarrollar estrategias para mantener la producción a pesar de la presencia de estas enfermedades, para lo cual se ha establecido la multiplicación de material propagativo y semillas de cítricos en cuatro categorías:

1. Genética (manejado en banco de germoplasma por el genetista).
2. Fundación (manejado en bloque de reserva).
3. Registrada (manejado en bloque de multiplicación).
4. Certificada (manejado en bloque de multiplicación masal).

Según el glosario de términos fitosanitarios de la NIMF N.º 5 de la FAO, la categoría *genética* es el material propagativo original resultante del proceso de mejoramiento genético, capaz de reproducir la identidad de un cultivador o variedad, producida y mantenida bajo el control directo de su obtentor, o bajo su dirección o supervisión por otro fitomejorador.

La categoría *fundación* es el material propagativo obtenido a partir de semilla genética, sometida al proceso de certificación, que cumple con los requisitos establecidos para la categoría, en el reglamento específico de la especie o grupo de especies correspondiente.

La categoría *registrada* es el material propagativo obtenido a partir de la semilla genética, sometida al proceso de certificación, que cumple con los requisitos mínimos establecidos para dicha categoría en el reglamento específico de la especie o grupo de especies correspondientes.

La categoría *certificada* es el material propagativo obtenido a partir de la semilla genética o de semilla registrada, que cumple con los requisitos mínimos establecidos en el reglamento específico de la especie o grupo de especies, y que ha sido sometida al proceso de certificación.

El manejo de las plantas de cítricos de las categorías *genética* y *fundación* deberá ser responsabilidad del Ministerio de Agricultura de cada país, mientras que las categorías *registrada* y *certificada* pueden ser manejadas por los viveristas.

De acuerdo con los programas de certificación, la producción de plantas de cítricos en cualquiera de estas categorías debe realizarse bajo ambientes protegidos, además de ser inspeccionadas periódicamente y evaluadas por indexación; es decir, se debe comprobar el estado fitosanitario de las plantas respecto a las enfermedades priorizadas en la norma de certificación de cada país, mediante métodos biológicos con plantas indicadoras y análisis de laboratorio con métodos serológicos y moleculares, con el fin de asegurar la sanidad del material de siembra.

En Colombia, la producción de plantas de cítricos se reglamentó a través de la Resolución 3180 (ICA, 2009), donde se establecen los requisitos y procedimientos para la producción y distribución de material de propagación de frutales en el territorio nacional. Actualmente, la producción de material vegetal de cítricos en ambientes protegidos está regulada por la Resolución 12816 de agosto del 2019, donde se establecen los requisitos para el registro de los viveros y/o huertos básicos productores y/o comercializadores de semilla sexual y/o asexual (material vegetal de propagación) de cítricos.

Desde 1967 se identificó la necesidad de disponer en el país de un programa de certificación de cítricos para producir material de propagación sano con características agronómicas deseadas por el productor, con el fin de garantizar la ausencia de enfermedades causadas por virus y otras enfermedades transmitidas por injerto (Giacometti & Ríos, 1967).

Orientados hacia este objetivo, inicialmente el ICA y, posteriormente, Corpoica —ahora AGROSAVIA— a mediados de la década del 80 establecieron un programa de saneamiento de materiales utilizando la técnica de microinjerto *in vitro* de ápices caulinares. Así, se realizó la limpieza de una colección de variedades comerciales a partir del banco de germoplasma de cítricos ubicado en AGROSAVIA, C. I. Palmira (Caicedo et al., 2006; Murcia et al., 2012). Esta técnica se ha aplicado rápidamente al germoplasma presente en los programas de certificación y se ha convertido en el método más valioso para liberar de patógenos transmisibles por injerto a selecciones clonales (Roistacher, 1991).

La colección de variedades de cítricos obtenidas por microinjerto se conservan en ambiente protegido, ubicadas dentro de casa de malla antipulgón, que incluye variedades de tangelos, mandarinas, naranjas, limas ácidas y pomelos, y se ha logrado comprobar su sanidad frente a tristeza de los cítricos, exocortis y HLB (Rodríguez-Mora et al., 2017).

Esta colección de variedades de cítricos se utilizará en el futuro como plantas madre para el programa de certificación de cítricos en Colombia, con el fin de conformar la categoría de semilla (bloque de fundación) en los viveros de cítricos y que este procedimiento inicial permita garantizar el uso de material sano para establecer plantaciones nuevas.

Enfermedades de los cítricos

A continuación, se describen las enfermedades más comunes presentes en el sistema productivo de los cítricos, causadas por diferentes patógenos, entre los que se encuentran virus, viroides, bacterias y hongos, así como las medidas para su manejo preventivo.

Tristeza de los cítricos

La tristeza de los cítricos es una enfermedad de importancia económica a nivel mundial, que afecta a todos los cultivares de cítricos, especialmente limas ácidas, naranjas y toronjas (Mateus et al., 2010; Naranjo, 1997). En Colombia, esta enfermedad es endémica (Chaparro-Zambrano et al., 2013; Murcia et al., 2005) y ha sido detectada en cultivos comerciales de cítricos en los departamentos del Valle del Cauca, en la Zona Central Cafetera, Tolima, Costa Atlántica, Cundinamarca y Llanos Orientales (Murcia et al., 2002), así como en viveros productores de material vegetal de cítricos a libre exposición (Lozano et al., 2009; Mosquera et al., 2015).

Agente causal

La tristeza de los cítricos es causada por el virus la tristeza de los cítricos (CTV) (Closterovirus: Closteroviridae). Se trata de una partícula flexuosa de 2.000 nm de longitud por 11 nm de diámetro, constituida por ARN de cadena sencilla, con sentido positivo, de un tamaño calculado de 20 kilobase (kb), organizado en 12 marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) (Dawson et al., 2015).

El virus es limitado al floema, se transmite de forma mecánica y mediante propagación vegetativa cuando se injerta una yema infectada en un portainjerto (Lee & Bar-Joseph, 2000), y por varias especies de áfidos de forma semipersistente, entre los que se encuentran *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae), *Aphis spiraecola* Patch, 1914 (Hemiptera: Aphididae), y el más eficiente para la transmisión,

Toxoptera citricida Stoetzel, 1994 (Cambra & Moreno, 2000; Rocha-Peña et al., 1995). No hay evidencias que CTV se transmite por semilla sexual (Roistacher, 1991).

Síntomas

CTV puede afectar las plantas de cítricos en cualquier estadio de desarrollo. Sin embargo, en la fase de vivero las plántulas de cítricos pueden ser asintomáticas a la infección del virus. La lima mexicana o limón pajarito (*Citrus × aurantiifolia* (Christm.) Swingle), como comúnmente se conoce, es muy susceptible al virus, razón por la cual se usa como planta indicadora para su diagnóstico. Bajo estas condiciones, puede expresar síntomas de clorosis en hojas, aclaramiento de las nervaduras y crecimiento retardado.

Los principales síntomas que se observan en los árboles en campo afectados por CTV son el declinamiento rápido de árboles, que ocurre cuando se usan portainjertos sensibles, principalmente en naranjo agrio; las acanaladuras o picado del tallo denominado “*stem pitting*”, que conduce a una reducción del crecimiento, rendimiento reducido y producción de frutos pequeños no comercializables, y el retraso del crecimiento de la planta, conocido como “*stunting*” (figura 53).



Fotos: Lizeth Palacios y Diana Rodríguez

Figura 53. Síntomas causados por CTV en limas ácidas en campo. a. Acanaladuras o picado del tallo (*stem pitting*) en limón pajarito; b. Retraso del crecimiento de la planta (*stunting*) en lima ácida Tahiti; c. Fruto de limón pajarito sano; d. Frutos de limón pajarito deformes y pequeños.

Otros síntomas de plantas infectadas con el virus son clorosis generalizada del árbol, suberización de venas, deformación de hojas, aclaramiento de nervaduras, acucharamiento de hojas y epinastia en brotes jóvenes. Estos síntomas se pueden presentar especialmente en árboles de lima ácida Tahití —*Citrus × latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka— y limón pajarito, que son los hospederos más susceptibles al virus (Cambra & Moreno, 2000; Dawson et al., 2015; Orduz-Rodríguez & Mateus, 2012; Quiroga-Cardona et al., 2010) (figura 54).



Fotos: Lizeth Palacios y Diana Rodríguez

Figura 54. Síntomas de CTV en hojas de limas ácidas. a. Árbol de limón pajarito sano; b. Árbol de limón pajarito con clorosis generalizada; c. Hojas de lima ácida Tahití con nervaduras suberizadas; d. Hojas de limón pajarito acucharadas; e. Aclaramiento de nervaduras en hoja de limón pajarito.

Diagnóstico

Para garantizar la sanidad del material de siembra en los viveros de cítricos bajo ambiente protegido, se requieren métodos de diagnóstico de patógenos sensibles, fiables y reproducibles, ya que el diagnóstico erróneo de una sola planta madre donadora de yemas conlleva la distribución de miles de plantas infectadas a los agricultores.

El diagnóstico de CTV se realiza mediante a) indexación biológica, b) métodos serológicos y c) moleculares, aprobados por la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (Nappo, 2013a) e incluidos en la convención internacional de protección fitosanitaria (Convención Internacional de Protección Fitosanitaria [CIPF], 2016), sugeridos en programas de cuarentena, saneamiento y certificación de cítricos en varios países.

- *Indexación biológica*. Esta técnica de diagnóstico consiste en la utilización de plantas indicadoras de especies de cítricos libres del patógeno, que reaccionan ante la infección del virus, al expresar diversos síntomas diferenciales según el patógeno y el aislamiento (Roistacher, 1991).

Para el análisis de CTV se usa limón pajarito, que se inocula mediante injerto con corteza de la planta que se va a analizar (Wallace & Drake, 1951). En cada ensayo se deben inocular varias repeticiones e incluir un control negativo (planta sana) y un control positivo (planta inoculada con CTV), para hacer la comparación de síntomas y garantizar la fiabilidad del diagnóstico. Las plantas se deben ubicar en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura, con fluctuaciones entre 24°C a 28°C en el día y de 17°C a 21°C en la noche, durante aproximadamente un año (Roistacher, 1991).

Los síntomas dependen de la cepa del virus (suave o severa). Los más característicos son las acanaladuras en el tallo, enanismo (acortamiento de entrenudos), aclaramiento de nervaduras, engrosamiento de nervaduras y acucharamiento de hojas (Figuroa et al., 2009; Murcia et al., 2002) (figura 55).



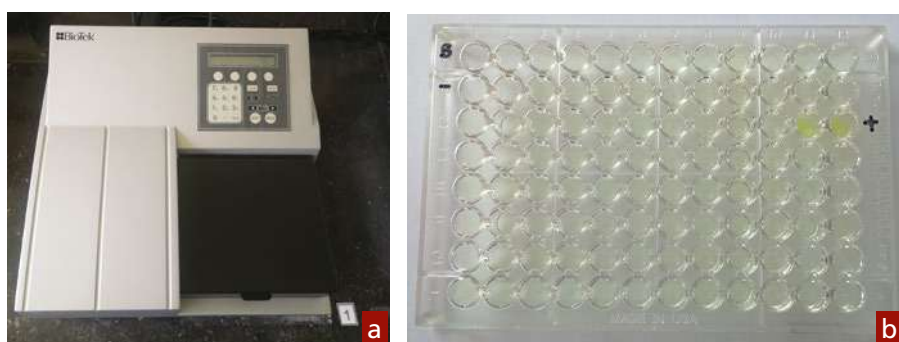
Fotos: Diana Rodríguez

Figura 55. Diagnóstico biológico de CTV en limón pajarito. a. Enanismo (izquierda), planta sana (derecha); b. Acucharamiento de hojas; c. Aclaramiento de nervaduras (izquierda), Hoja sana (derecha); d. Acanaladuras en el tallo (izquierda) y tallo sano (derecha).

- *Serología, mediante prueba de Elisa.* El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (Elisa, por sus siglas en inglés) fue publicado por Bar-Joseph et al. (1979), y por Cambra et al. (1979), quienes demostraron su utilidad para un diagnóstico rápido, efectivo y fiable en tan solo 24 horas; además, puede analizar muestras en grandes volúmenes, con una eficiencia del 98% (Cambra, 1983; Cambra et al., 2002).

El protocolo más usado para el diagnóstico de CTV es la inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpo (Das-Elisa) (Cambra et al., 2002). El método consiste en recolectar brotes tiernos de forma uniforme en la periferia del dosel de la planta que se desea evaluar. De cada planta, se requiere 0,5 g de tejido vegetal finamente picado (corteza y nervadura central de las hojas). Cada muestra procesada debe analizarse por duplicado, además de incluir un control positivo de infección de CTV y un control negativo (planta sana). Las pruebas serológicas se realizan con kits comerciales, siguiendo las metodologías del fabricante y, en general, se cumplen los siguientes pasos.

El tejido vegetal se debe macerar con *buffer* de extracción y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se requiera para realizar la prueba. Para esta técnica, se utilizan placas de poliestireno tapizadas con anticuerpos (IgG) específicos para el virus. La fijación del antígeno se realiza mediante la aplicación del extracto de la muestra (material vegetal macerado previamente). Posteriormente, se realiza la aplicación del anticuerpo conjugado marcado con la enzima (fosfatasa alcalina) y, finalmente, se adiciona el sustrato de la enzima (p-nitrofenil fosfato), que produce una coloración amarilla cuando la reacción es positiva. Esta coloración es detectable a simple vista y cuantificable mediante lector de Elisa (figura 56).



Fotos: Lizeth Palacios

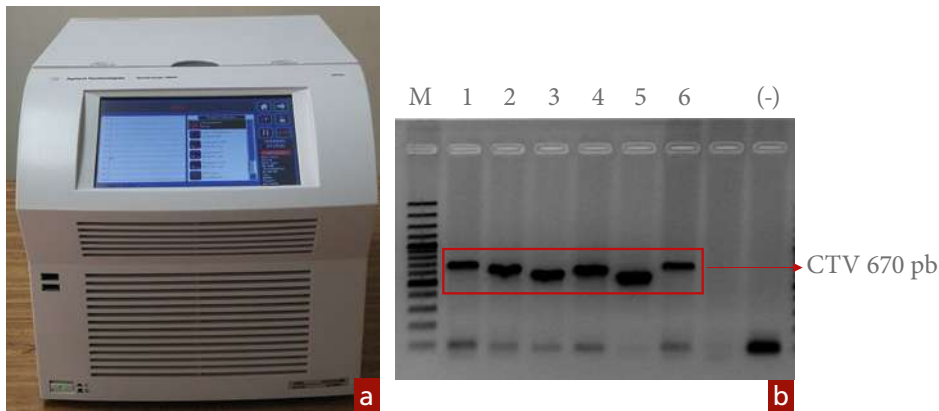
Figura 56. Resultado del diagnóstico de CTV por Das-Elisa en plantas de cítricos. a. Lector de Elisa; b. Placa de Elisa: + corresponde al control positivo y - corresponde al control negativo; el resto de los pozos en la placa corresponden a muestras de cítricos evaluadas. Pozos con coloración amarilla indican que las muestras están infectadas por CTV.

El proceso se realiza a diferentes temperaturas y tiempos de incubación que permiten el fijado de los anticuerpos y, al final de cada paso, se realizan lavados para eliminar el exceso de anticuerpos que no hayan logrado unirse. Las lecturas de las placas de Elisa se realiza a los 30, 60 y 120 minutos a 405 nm ; los valores con densidad óptica mayores a dos veces la media de dos testigos negativos son considerados como positivos a la infección por CTV (CIPE, 2016).

- *Técnicas moleculares.* Estas técnicas se usan como complemento al diagnóstico biológico y serológico. Las técnicas más utilizadas para la detección de CTV son la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real o PCR cuantitativa (qRT-PCR).

La RT-PCR es altamente sensible y permite la detección e identificación de cepas de CTV suaves y severas por medio de secuenciación (Hilf et al., 2013). La qRT-PCR ha sido ampliamente utilizada en estudios de la expresión de genes, detección de ácidos nucleicos específicos presentes en diversos tipos de muestras y la cuantificación específica de la cepa (Freeman et al., 1999; Heid et al., 1996; Solano et al., 2018); además, presenta una alta sensibilidad y reproducibilidad, lo que la hace útil como herramienta de diagnóstico de virus. También permite cuantificar de forma exacta del número de copias de ARN molde presente en una muestra (Morales et al., 2013; Oliveros et al., 2009; Ruiz et al., 2007; Solano et al., 2018).

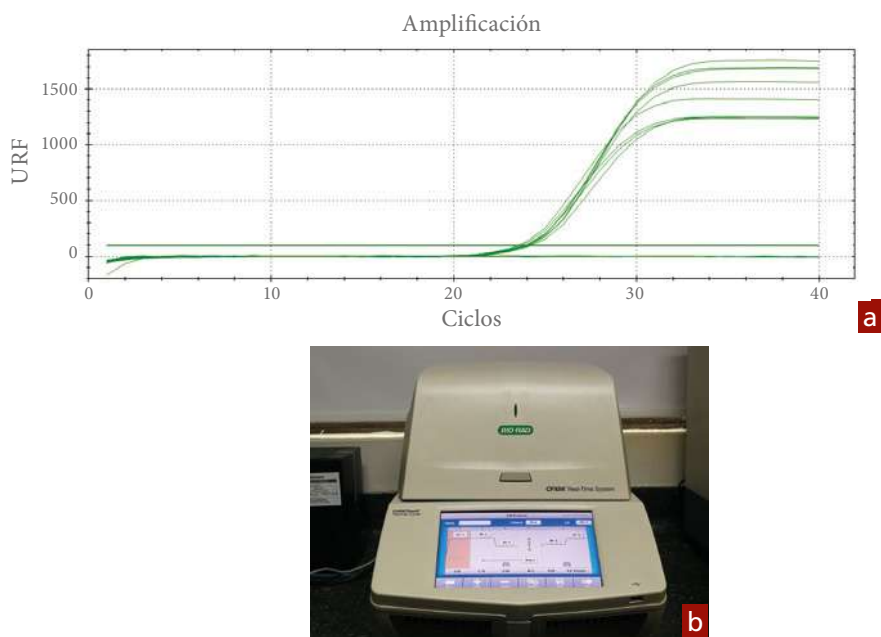
Para el diagnóstico por RT-PCR y qRT-PCR se deben recolectar brotes tiernos de forma uniforme en la periferia de la planta de cítricos que se quiere evaluar, a partir del cual se realiza la extracción del ácido ribonucleico (ARN) y posterior síntesis de ADN complementario (ADNC), para usarlo como molde para las amplificaciones. Tanto para la RT-PCR como para la qRT-PCR se han diseñado cebadores específicos que permiten la amplificación de regiones conservadas del genoma de CTV que codifican para el gen de la proteína de la cápside (Catara et al., 2010; Hilf et al., 2005; Morales et al., 2013; Solano-Luna et al., 2018). Los productos amplificados por RT-PCR se pueden visualizar en geles de electroforesis mediante un fotodocumentador (figura 57).



Fotos: Diana Rodríguez y Lizeth Palacios

Figura 57. Diagnóstico molecular de CTV por RT-PCR. a. Termociclador; b. Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR con cebadores específicos para identificar CTV (CN 150/CN 151). M: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 1, 2, 3, 4, 5 y 6 corresponden a plantas de lima ácida Tahití infectadas con CTV donde se amplificó un fragmento de la proteína de la cápside del virus de aproximadamente 670 pb; - corresponde al control negativo del coctel de PCR.

La técnica qRT-PCR emplea un fluoróforo y combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia, que se visualiza en un sistema óptico acoplado al termociclador (figura 58).



Fotos: Diana Rodríguez y Lizeth Palacios

Figura 58. Diagnóstico de CTV por qRT-PCR. a. Curvas de amplificación para la detección de CTV. En el eje de las ordenadas, se observa la fluorescencia relativa y, en de las abscisas, el número de ciclos de la PCR. Las líneas verdes representan la fluorescencia emitida por el compuesto SYBR Green, usado para detectar la amplificación. La línea paralela verde representa el valor del umbral de fluorescencia para la reacción; b. Termociclador para PCR cuantitativa.

Exocortis de los cítricos

La exocortis es una enfermedad que está presente en casi todas las regiones cítricas del mundo y afecta la mayoría de las especies de cítricos, especialmente las naranjas y limas ácidas (Durán-Vila, 1989). La exocortis disminuye la productividad, pero no causa la muerte de los árboles. En Colombia, esta enfermedad se ha reportado en viveros productores de plántulas de cítricos y huertos comerciales de lima ácida Tahití en Santander, Tolima, Cundinamarca, Eje Cafetero (Quindío, Caldas y Risaralda) y Valle del Cauca (Murcia et al., 2010; Rodríguez-Mora et al., 2015).

Agente causal

El agente causal de la exocortis de los cítricos es el *viroide de la exocortis de los cítricos* (CEVd) (Pospiviroid: Pospiviridae) (Semancik & Weathers, 1972). El genoma del viroide es más pequeño que los virus que afectan las plantas; está constituido por un ARN monocatenario circular de aproximadamente 370-375 nucleótidos (Gross et al., 1992). Este viroide se transmite por injerto al usar yemas infectadas y de forma mecánica cuando se utilizan herramientas de poda contaminada; no se transmite por semilla sexual y, hasta el momento, se desconocen vectores asociados (Durán-Vila, 2004).

Síntomas

La exocortis puede infectar las plantas de cítricos desde la etapa de vivero hasta el establecimiento en campo. En etapa de vivero, las plantas son asintomáticas. Los síntomas suelen aparecer a partir del cuarto o quinto año de su establecimiento en campo (Durán-Vila, 2004), por lo que se requiere de técnicas de diagnóstico biológico y molecular para su detección oportuna y garantizar que el material que se lleva a campo está libre de la enfermedad. En campo, la exocortis presenta síntomas asociados a la aparición de escamas en la corteza del portainjerto, grietas en tallos y ramas, y enanismo (Bernad et al., 2009; Durán-Vila, 2004) (figura 59).



Fotos: Nubia Murcia

Figura 59. Síntomas asociados con exocortis en cítricos. a. Árbol con síntomas de descamaciones en la corteza del portainjerto; b. Agrietamiento en ramas.

Diagnóstico

El diagnóstico de la exocortis de los cítricos se hace a partir de la detección del CEVd mediante pruebas de diagnóstico biológico y molecular, aceptadas por la Nappo (2013a).

- *Indexación biológica.* Para el diagnóstico, se usa cidro etrog clon Arizona 861-S1 (*Citrus medica* L.), una planta altamente susceptible que se seleccionó como indicadora general para los viroides, y expresa los síntomas propios de la infección por estos patógenos: epinastia, enanismo, necrosis de peciolo, nervaduras y tallo (Durán-Vila et al., 1988) (figura 60).



Figura 60. Síntomas de exocortis en cidro etrog clon Arizona 861-S1. a. Planta sana (derecha) vs. planta con enanismo (izquierda); b. Hoja sana (izquierda) vs. necrosis de peciolo y nervadura de hoja: basal, media y apical (derecha); c. Hoja sana (izquierda) vs. epinastia (derecha); d. Tallo sano (izquierda) vs. necrosis de tallo (derecha).

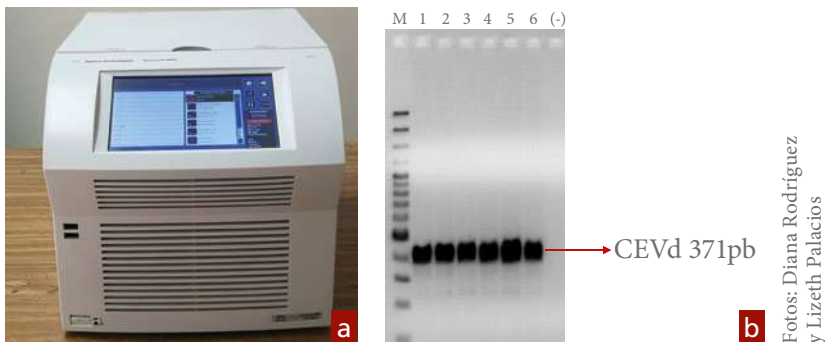
La inoculación en cidro etrog se realiza mediante injerto con tejido de corteza de la planta que se va a analizar; además, se debe incluir un control negativo (planta sana) y un control positivo (planta inoculada con CEVd) para asegurar el rigor y confianza del diagnóstico. Las plantas inoculadas se deben ubicar en condiciones controladas de temperatura entre 28 °C y 32 °C, para asegurar la expresión de

los síntomas, que generalmente se presentan de tres a seis meses después de la inoculación (Durán-Vila, 1989).

Cuando se realizan los ensayos biológicos en la especie indicadora cidro etrog, se pueden replicar varias especies de viroides. Cuando se inocula tejido de plantas afectadas de campo, en las que generalmente se presentan mezclas de viroides, es necesario utilizar controles positivos inoculados con la especie de viroide que se evaluará de forma independiente y acompañar la detección del agente causal con las técnicas moleculares como complemento del diagnóstico biológico.

- *Técnicas moleculares.* Dentro de estas técnicas se encuentran el análisis de ácidos nucleicos por electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (SPAGE) (Durán-Vila et al., 1993), la hibridación de ácidos nucleicos (Murcia et al., 2009, 2010) y la RT-PCR (Bernad & Duran-Vila, 2006). La RT-PCR se basa en el uso de cebadores que amplifican secuencias completas o parciales del genoma de CEVd; se trata de una de las pruebas más utilizadas para el diagnóstico de viroides por su alto grado de sensibilidad, reproducibilidad y capacidad para discriminar entre variantes suaves y agresivas de CEVd (Bernad & Durán-Vila, 2006).

Para el diagnóstico por RT-PCR, se debe coleccionar tejido vegetal de cidro etrog (seis meses después de la inoculación con el tejido que se desea evaluar) o directamente de tejido vegetal de cítricos, a partir del cual se realiza la extracción del ácido ribonucleico (ARN) y posterior síntesis de ADN complementario (ADNC), como molde para la amplificación. Los productos amplificados por PCR se visualizan en geles de electroforesis mediante un fotodocumentador (figura 61).



Fotos: Diana Rodríguez y Lizeth Palacios

Figura 61. Diagnóstico molecular de CEVd por RT-PCR. a) Termociclador; b) Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR con cebadores específicos para la amplificación del genoma completo de CEVd (CEVd - F1/R1). M: Marcador de peso molecular 100 pb. 1, 2, 3, 4, 5 y 6: muestras de cidro etrog infectadas con CEVd (tamaño aproximado de 371 pb); - control negativo (planta sana).

Huanglongbing de los cítricos

El HLB es una enfermedad catastrófica para la citricultura, que afecta plantas de la familia Rutaceae y a todos los cultivares de cítricos (Halbert, 1998). También el mirto (*Murraya paniculata* (L.) Jacq.) se ha citado como hospedante secundario (Hung et al., 2000; Walter et al., 2012). La enfermedad está ampliamente distribuida en países productores de cítricos y fue reportada por primera vez en 1919 en China (Lin, 1956); posteriormente, en África (Garnier et al., 2000) y, a partir del 2004, se ha diseminado en países citrícolas del continente americano como Brasil, Cuba, Estados Unidos y México (Nappo, 2012). En Colombia, se detectó en cultivos de limas ácidas en el 2016, y se encuentra reportada en los departamentos de La Guajira, Atlántico, Bolívar, Cesar, Magdalena, Norte de Santander, Córdoba y Sucre (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2017, 2018).

Agente causal

Los agentes causales del HLB son tres bacterias fastidiosas del género *Candidatus Liberibacter*, familia Rhizobiaceae, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Bové, 2006), *Candidatus Liberibacter africanus* (Garnier et al., 2000) y *Candidatus Liberibacter americanus* (Texeira et al., 2008). Estas bacterias son gramnegativas, vasculares, limitadas al floema y no se pueden aislar en medio de cultivo artificial (Camacho-Tapia et al., 2016). *Candidatus Liberibacter asiaticus* es la especie reportada en Colombia (ICA, 2015a).

La transmisión del HLB se presenta principalmente por material vegetal contaminado (plantas y yemas) a través de la injertación y por insectos vectores. *C. L. africanus* es transmitida por el psílido *Trioza erytrea* (Del Guercio), mientras que *C. L. asiaticus* y *C. L. americanus* son transmitidas por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Halbert & Manjunath, 2004) de forma persistente circulativa (Ammar et al., 2016). la transmisión por semilla sexual aún no se ha demostrado (Hartung et al., 2010).

Síntomas

El HLB afecta todos los cultivares cítricos; no obstante, la manifestación y severidad de los síntomas son distintos en las diferentes especies. Incluso se puede presentar una distribución desigual de la infección por la bacteria en los árboles afectados, y se pueden encontrar plantas asintomáticas (Folimonova et al., 2009; Paredes-Tomás et al., 2015).

Los síntomas iniciales de la enfermedad se comienzan a manifestar en la planta después de un periodo de latencia que varía entre seis meses y un año (Hung et al., 2000), y se presentan en una o varias ramas de un lado del árbol, con una clorosis intensa que claramente es diferencial con el color verde del resto de la planta. Hacia la base de las ramas afectadas aparecen hojas maduras con el síntoma típico del HLB, un moteado asimétrico que se manifiesta por manchas de color verde y amarillo en forma de parches con bordes difusos, que se distribuyen de forma irregular en ambos lados de la nervadura central de la hoja; además, las nervaduras se tornan amarillas, gruesas y corchosas (Bové, 2006; Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y Semillas [Senave], 2013)

Las hojas de las nuevas brotaciones disminuyen progresivamente de tamaño y puede presentarse una clorosis intensa que puede confundirse con deficiencias nutricionales con zinc, manganeso, hierro y magnesio (figura 62).

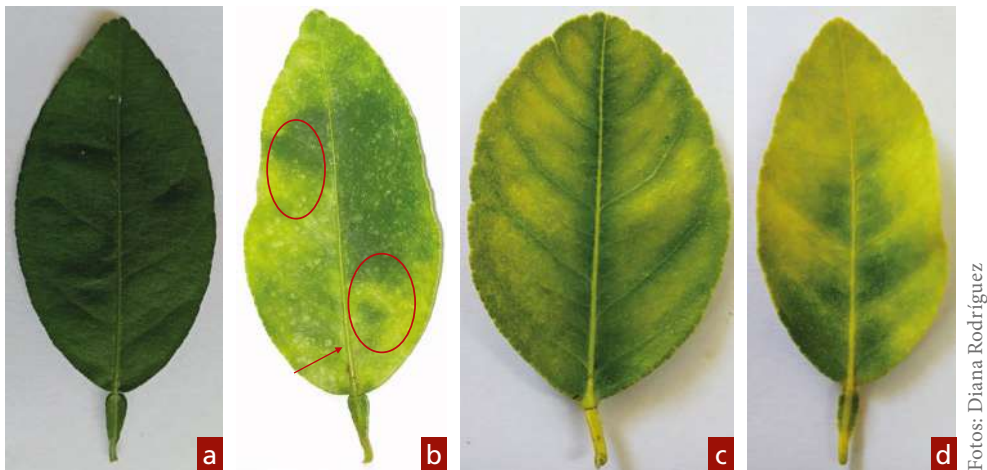


Figura 62. Síntomas de HLB en hoja de limón pajarito. a. Hoja sana; b. Moteado asimétrico y nervadura central corchosa; c. Deficiencia de magnesio; d. Deficiencia de zinc.

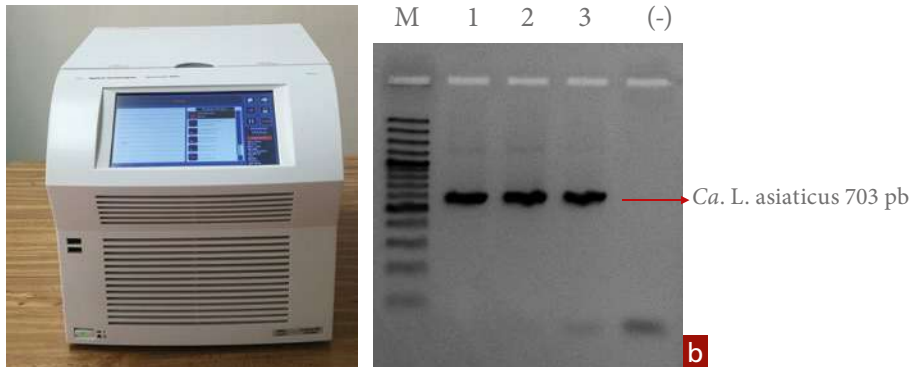
A medida que avanza la enfermedad, se produce defoliación, seguida de brotaciones irregulares y floración fuera de época, así como formación de frutos pequeños y deformes que se desprenden fácilmente del árbol con semillas vanas de color amarillo oscuro a marrón; además, los árboles se vuelven improductivos hasta que, finalmente, ocurre la muerte de la planta (Bové, 2006; Senave, 2013).

Diagnóstico

De acuerdo con la Nappo (2013a), las pruebas avaladas para hacer el diagnóstico de HLB en el material de propagación de cítricos son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR en tiempo real (qPCR) o PCR cuantitativa. Estas técnicas se basan en el uso de cebadores que amplifican las secuencias de ADN de *Candidatus Liberibacter* spp. Las secuencias del genoma de la bacteria causante del HLB en Colombia, *C. L. asiaticus*, extraídas de *D. citri*, fueron recientemente reportadas por Wang et al. (2020).

Para el diagnóstico por PCR y qPCR, se deben coleccionar brotes tiernos de forma uniforme en la periferia de la planta de cítricos que se quiere evaluar, a partir de los cuales se realiza la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN), con el fin de usarlo como molde para las amplificaciones.

La PCR utiliza cebadores que amplifican las secuencias de los genes 16s rDNA y genes proteínicos (operon-B). Los cebadores Ol1-Ol2c (Jagoueix et al., 1996) y A2-J5 (Hocquellet et al., 1999) se usan para el diagnóstico de *C. L. africanus* y *C. L. asiaticus*, y los cebadores GB1-GB3 (Teixeira et al., 2005) para *C. L. americanus*. Los productos amplificados por la PCR se visualizan en geles de electroforesis mediante un fotodocumentador, mientras que los productos amplificados por la qPCR se visualizan en un sistema óptico acoplado al termociclador (figura 63).



Fotos: Diana Rodríguez y Lizeth Palacios

Figura 63. Diagnóstico molecular de HLB por PCR. a. Termociclador; b. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR con cebadores específicos para identificar *C. L. asiaticus* (A2-J5). M: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 1, 2 y 3 corresponden a muestras de limón pajarito infectadas con HLB (tamaño aproximado de 703 pb); - corresponde al control negativo (planta sana).

La baja concentración y la distribución irregular del patógeno en las plantas huésped, junto con los inhibidores de la PCR presentes en los extractos de cítricos, han dificultado la detección del patógeno. Aunque la PCR y la qPCR son técnicas aceptadas para la confirmación de árboles sintomáticos para HLB, la qPCR es mucho más sensible y robusta que la PCR, y permite detección y cuantificación de la bacteria incluso en plantas asintomáticas. Sin embargo, las dos técnicas están avaladas para hacer el diagnóstico de HLB (Nappo, 2012).

Manejo preventivo de enfermedades de origen viral, viroidal y bacteriano

Las estrategias de manejo para el control de enfermedades como la tristeza de los cítricos, exocortis y HLB son preventivas, no tienen cura, y por eso se deben atender las siguientes recomendaciones:

- Utilizar yemas de cítricos provenientes de plantas sanas, obtenidas de programas de saneamiento, a partir de la técnica de microinjertación de ápices caulinares, conservadas bajo ambiente protegido en casa de malla antipulgón.
- Realizar un estricto control fitosanitario de las plantas utilizadas para producir portainjertos que son cultivadas en campo para obtener semillas, debido a que estas enfermedades no se transmiten por semilla sexual. No obstante, las plantas madre que son portadoras sospechosas o diagnosticadas como portadoras de estas enfermedades no se deben usar para este propósito.
- Usar portainjertos que están indicados como tolerantes al virus de la tristeza y la exocortis (tabla 16).
- Producir plantas de cítricos bajo ambiente protegido. Las casas de malla o invernaderos deben disponer de infraestructura con doble puerta, con marco cerrado y cubierta con malla antipulgón, diseñada para evitar entrada de posibles vectores.
- Realizar una inspección periódica de las plantas.
- Disponer de herramientas de uso exclusivo para actividades de vivero como tijeras podadoras y navajas para injertación.
- Tener vestuario de uso exclusivo para las actividades al interior de casas de malla.
- Desinfectar las herramientas mediante inmersión con hipoclorito de sodio al 3%, durante las labores de injertación y poda (cuchillas, tijeras, serruchos etc.). Los viroides son muy estables y pueden transmitirse con facilidad con las herramientas en el momento que se hace contacto con el árbol, inclusive después de varias semanas (Durán-Vila, 2004).

- Realizar labores de inspección y vigilancia del estado de la infraestructura del invernadero, especialmente de la malla antipulgón, con el fin de realizar las reparaciones oportunas y evitar la entrada de los vectores del virus o bacterias.

Tabla 16. Comportamiento de portainjertos usados en Colombia frente a las enfermedades causadas por hongos, virus y viroides

Portainjerto	Nombre científico	Gomosis	Tristeza	Exocortis
Naranja agrio	<i>Citrus aurantium</i> L.	Tolerante	Susceptible	Tolerante
Naranja dulce	<i>Citrus sinensis</i> (L.)	Susceptible	Tolerante	Tolerante
Kryder 15-3	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Tolerante	Medianamente tolerante	Susceptible
Citrumelo CPB 4475 o citrumelo swingle	<i>Citrus paradisi</i> Macf. × <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Resistente	Tolerante	Tolerante
Citrango Carrizo	(<i>Citrus sinensis</i> 'Washington' sweet orange × <i>Poncirus trifoliata</i>).	Medianamente Tolerante	Tolerante	Susceptible
Citrango Troyer	<i>Citrus sinensis</i> 'Washington' sweet orange × <i>Poncirus trifoliata</i>)	Tolerante	Tolerante	Susceptible
Mandarina Cleopatra	<i>Citrus reshni</i> Horth. Ex Tan.	Susceptible	Susceptible	Tolerante
Limón Volkameriana	<i>Citrus volkameriana</i> Ten. y Pasq.	Susceptible	Tolerante	Tolerante
Limón rugoso	<i>Citrus jambhiri</i> Lush.	Susceptible	Tolerante	Tolerante
Sunky × English	<i>Citrus sunki</i> Hort. ex Tan. × <i>P. trifoliata</i> (L.) Raf.	Resistente	Tolerante	Susceptible
Sunky × Jacobson	<i>Citrus sunki</i> Hort. ex Tan. × <i>Poncirus trifoliata</i> [L.] Raf.)	Resistente	Medianamente tolerante	Susceptible
Lima Rangpur	<i>Citrus limonia</i> Osbeck	Susceptible	Tolerante	Susceptible

Fuente: López y Cardona (2007), Orduz-Rodríguez et al. (2009), Orduz-Rodríguez y Mateus (2012), Chaparro-Zambrano et al. (2013)

Mancha marrón

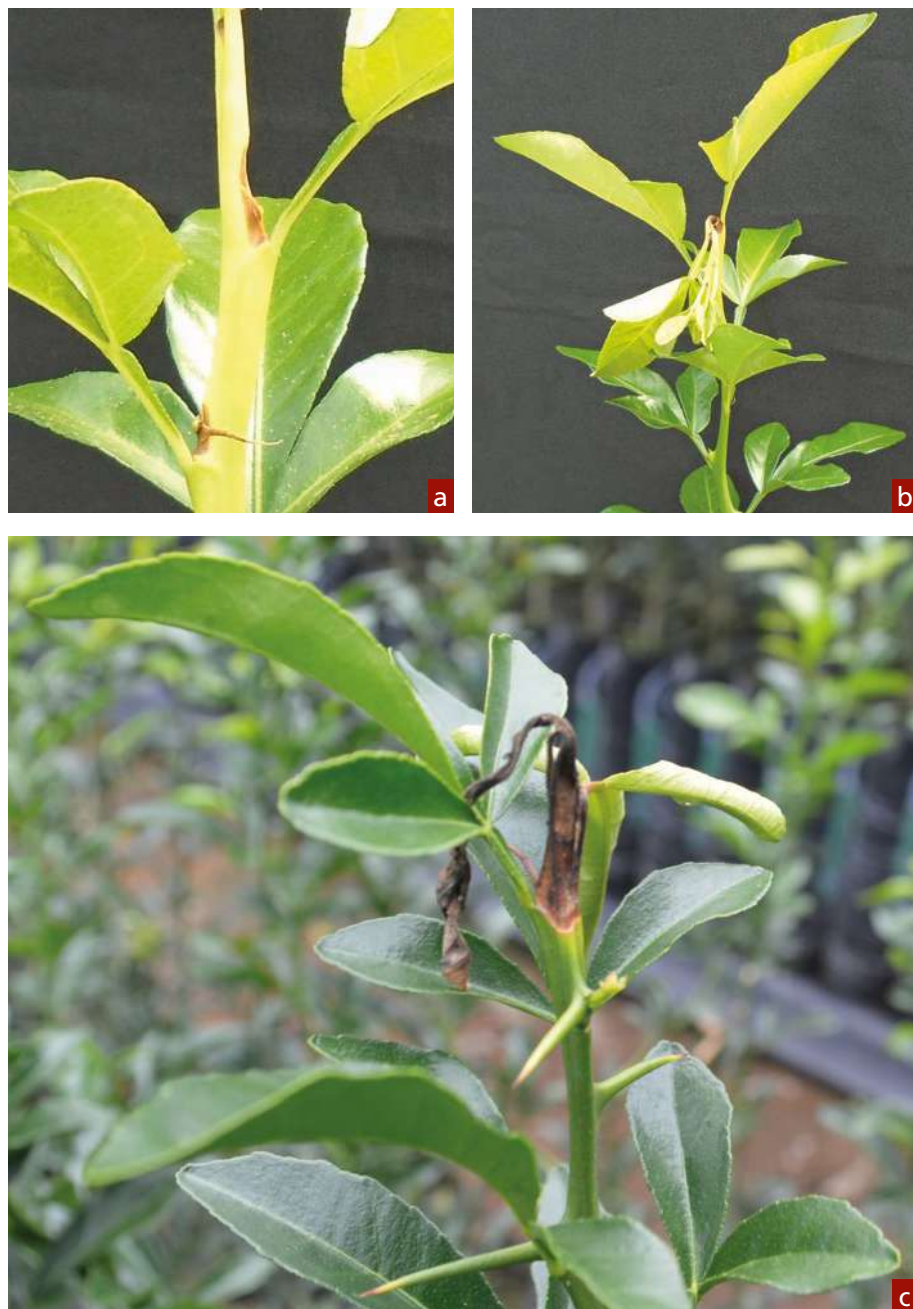
La mancha marrón es una enfermedad que afecta todos los estadios de desarrollo de los cítricos desde la etapa de vivero hasta su establecimiento en campo. Se ha identificado mayor susceptibilidad a la enfermedad en tangelos (Castro-Caicedo et al., 1994), mandarinas (Dalkilic et al., 2005) y pomelos (Timmer et al., 2003). La enfermedad se ha reportado en países subtropicales y tropicales como Sudáfrica, Israel, Turquía, México, Estados Unidos (Florida) y Colombia (Castro et al., 2000).

Agente causal

El agente causal asociado a la mancha marrón es un patotipo del género *Alternaria*, perteneciente a la familia Pleosporaceae (Mycobank, 2015). *Alternaria* ha sido ampliamente descrito como causante de enfermedades en cítricos. Actualmente, se conocen cuatro enfermedades causadas por este patógeno: 1) la mancha marrón de las mandarinas causada por un patotipo de *A. alternata*, que afecta selectivamente a un grupo de variedades; 2) la mancha foliar del limón rugoso (*C. jambhiri* Lush) y la lima Rangpur (*C. limonia* Osbeck) causada por otro patotipo de *A. alternata*; 3) la mancha foliar del limón pajarito causada por la especie *A. limicola* Simmons y Palm (Simmons, 1990) y 4) la podredumbre negra de los frutos de cítricos causada por *A. alternata* (Bliss & Fawcett, 1944; Peever et al., 2004; Simmons, 1990; Timmer et al., 2003). Otras especies de *Alternaria* como *A. limicola* y *A. tenuissima* han sido identificadas afectando mandarinas, limones y tangelo Minneola.

Síntomas

La infección por *Alternaria* spp. puede causar manchas alargadas, necrosis y marchitez del tallo, así como secamiento apical de brotes (Valkonen & Koponen, 1990) (figura 64).



Fotos: Lizeth Palacios

Figura 64. Síntomas ocasionados por *Alternaria* sp. en el portainjerto Sunki x English. a. Manchas alargadas en tallo; b. Necrosis y marchitez del tallo; c. y d. Secamiento apical de brotes.

Las hojas afectadas desarrollan manchas de color marrón a negro o manchas que pueden variar considerablemente en tamaño, color y forma. Estas hojas pueden caer prematuramente. Algunas especies de *Alternaria*, particularmente *A. alternata*, dependen de la producción de toxinas para la colonización de su hospedero. La toxina se transloca a través del sistema vascular produciendo clorosis a lo largo de las venas desde la lesión de la hoja, causando la muerte del tejido foliar adyacente (Pegg et al., 2014).

Diagnóstico

Los síntomas producidos por *Alternaria* spp. son similares a los ocasionados por otros microorganismos fúngicos; por eso, un diagnóstico visual no es suficiente para la identificación del agente causal de la enfermedad, sino que se requiere del montaje de cámaras húmedas y el aislamiento del patógeno en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y posterior observación de caracteres morfológicos del hongo mediante el uso de claves taxonómicas. El micelio de *Alternaria* spp. se caracteriza por tener hifas septadas dematiáceas (figura 65a); las conidias tienen características muy particulares que las hacen fáciles de reconocer, son anchas cerca de la base y se van estrechando gradualmente hacia un pico alargado, con una pigmentación oscura, y presentan tabiques transversales y longitudinales (figura 65b). Estas se agrupan en cadenas o en forma ramificada en el ápice de los conidióforos. Las colonias fúngicas de *Alternaria* spp. presentan tonalidades negras, grises o verdes (Pegg et al., 2014).



Fotos: Lizeth Palacios

Figura 65. Morfología microscópica a partir de cultivo de *Alternaria* spp., 40X. a. Hifas septadas dematiáceas; b. Conidias con septos transversales y longitudinales, catenuladas, redondas en un extremo y estrechas en el otro.

Manejo de la enfermedad

El manejo de la enfermedad en vivero se basa en prácticas preventivas. Es recomendable el uso de yemas sanas para realizar la injertación, instalar pediluvios en la entrada de los viveros, evitar realizar riego por aspersión, procurar mayor espacio entre las plantas para mejorar la ventilación y realizar monitoreos periódicos de las plantas, con el fin de detectar los daños ocasionados por el patógeno y tomar medidas de control (Pegg et al., 2014).

Una vez se presente la enfermedad en el vivero, es recomendable llevar a cabo prácticas como podar y desechar las ramas, brotes y hojas enfermas; eliminar cualquier acumulación de hojarasca en la base de las plantas, para minimizar la acumulación de esporas y eliminar plantas afectadas; evitar el exceso de riego y la fertilización nitrogenada durante algún tiempo para no promover el crecimiento vegetativo excesivo, debido a que este es tejido susceptible (Dewdney, 2021; Whiteside, 1976).

Como fungicidas efectivos para el control de *Alternaria* spp. se han reportado los ditiocarbamatos, aplicados una semana después de la emergencia del brote y, de nuevo, dos semanas después (Timmer et al., 2000). También se ha sugerido la aplicación de triazoles y famoxadon (Sadowsky et al., 2002) y la estrobilurina, probada y determinada como efectiva (Dewdney, 2021; Mondal et al., 2005; Sadowsky et al., 2002).

Gomosis

La gomosis de los cítricos, denominada también *podrición del pie*, es una enfermedad muy común en los cítricos. La infección se puede presentar tanto en vivero como en campo. El patógeno afecta el cuello de la raíz, los tallos y las ramas primarias de las plantas de cítricos. También puede colonizar raíces, causando la pudrición de las plantas, cuando se presenta una alta humedad en el suelo (Luis et al., 2010). Estos daños reducen los rendimientos del cultivo entre 10 % y 30 % cuando se siembran sobre portainjertos susceptibles (Mounde et al., 2009) (tabla 16).

Agente causal

La gomosis está asociada con más de 10 especies de oomicetes del género *Phytophthora* (Peronosporaceae). Entre las especies más frecuentes se registran *P. parasitica* Dastur, 1913, *P. citrophthora* (R. E. Sm. & E. H. Sm.) Leonian, 1925, *P. citricola* Sawada 1927,

P. palmivora E. J. Butler, 1919, *P. cryptogea* Pethybr. & Laff., 1919 (Feichtenberger et al., 2005). Las diferencias morfológicas entre algunas de las especies son pocas y variables, lo que dificulta la clasificación precisa de la especie y conduce a diferentes respuestas ante las estrategias de control (Klotz, 1978), lo que le da mayor ventaja a *Phytophthora*. Varios estudios han identificado a *P. citrophthora* y *P. parasitica* como las especies más destructivas causantes de podredumbre del pie en cítricos (Klotz, 1973; Vernière et al., 2004).

Phytophthora es un habitante natural del suelo, que sobrevive sobre suelos con alta humedad, capaz de dispersarse por el movimiento de suelo y uso de sustratos contaminados, contacto entre raíces, aguas superficiales, salpicaduras desde el suelo a los tejidos de la planta o movimiento de propágulos por humanos o invertebrados (Ristaino & Gumpertz, 2000).

Síntomas

La infección de *Phytophthora* spp. en cítricos puede ocurrir en las semillas antes de la germinación o en la etapa de germinación, infectando los tejidos de la base del hipocótilo con lesiones deprimidas de color oscuro que aumentan de tamaño y, finalmente, causan la muerte de las plántulas (Neto et al., 2016).

Cuando el patógeno afecta las raíces, estas se ablandan. La corteza se puede levantar de forma fácil y se produce un síntoma de necrosis en el leño. Cuando las lesiones avanzan hacia el tallo, se produce un crecimiento retardado de la planta, marchitez prematura y muerte de la planta. Cuando la enfermedad afecta el tallo, aparecen lesiones con manchas oscuras e irregulares que avanzan hacia la yema injertada. También se pueden presentar grietas en la corteza, lesiones de color oscuro en el leño y pueden aparecer exudaciones de goma. Las hojas de las plantas se tornan de color verde pálido y las nervaduras amarillas, con brotes escasos y decaimiento de la planta. En ocasiones, se pueden presentar lesiones directamente en el follaje, donde se producen manchas concéntricas irregulares o redondeadas de color pardo oscuro (Luis et al., 2010).

La gomosis también se puede presentar de forma asintomática. El patógeno puede permanecer en las raíces de las plantas infectadas, así como en el sustrato hasta su establecimiento en el campo (Neto et al., 2016), donde puede desarrollar síntomas de podredumbre de la raíz o podredumbre de la corona. La corteza infectada se mantiene firme con pequeñas grietas a través de las cuales se produce abundante exudación de goma (Savita & Avinash, 2012) (figura 66).



Fotos: Diana Rodríguez

Figura 66. Síntoma asociado a gomosis en naranja Valle Washington injertada sobre CPB 4475. a. Exudación de goma; b. Necrosis interna en tallos principal.

Un síntoma de infección grave es el cambio en la coloración de las hojas a verde pálido con venas amarillas, manchas irregulares de color oscuro en la base del tallo cerca del suelo, flacidez generalizada de hojas y presencia de cancro bien definido (Álvarez et al., 2006; Jagtap et al., 2012).

Diagnóstico

Para el diagnóstico de la gomosis, se han desarrollado medios selectivos para el aislamiento de *Phytophthora* spp. a partir del suelo, raíces o de la corteza en la base del tallo de árboles enfermos (Tsao, 1960, 1970, 1983). Los medios más utilizados para aislamiento de *Phytophthora* en cítricos son los siguientes: medio de Kerr's modificado, (Hendrix & Kuhlman, 1965), medio MacCain (McCain et al., 1967), medio Masago (Masago et al., 1977), medio PVPH (Tsao & Guy, 1977), medio PARPH (Mitchell et al., 1986) y medio BHMPVR (Bist & Nene, 1988). Los más exitosos son aquellos que contienen antibióticos antibacterianos y agentes fúngicos (Eckert & Tsao, 1960; Kueh & Khew, 1982; Naqvi, 1990; Tsao & Guy, 1977; Tsao & Ocana, 1969).

El muestreo se realiza seleccionando tejido vegetal con lesiones como exudaciones de goma, agrietamiento visible con exposición de leña, presencia de cancro y destrucción de leña (Orozco, 1995), o plantas de vivero que presenten marchitez o muerte súbita. Una vez recolectadas las muestras, se procede a la desinfección del tejido y posterior siembra en la caja de Petri con medio selectivo, para la obtención del aislamiento de *Phytophthora* spp.

En medio de cultivo, las cepas de *Phytophthora* spp. se caracterizan por presentar un patrón de crecimiento de tipo petaloide o en forma arrosada. Microscópicamente, muestra hifas coraloides, torulosas, clamidosporas de pared gruesa intercalares (formadas entre hifas) o terminales (en los extremos de las hifas) y esporangios que pueden ser papilados o semipapilados con una a dos papilas, o caducos. Los esporangios pueden presentar forma obpiriforme o limoniforme (Drenth & Sendall, 2001).

Manejo de la enfermedad

El manejo de la enfermedad en vivero se fundamenta en prácticas preventivas, para lo cual es recomendable realizar las siguientes acciones:

- Utilizar un sustrato con una mezcla de insumos o materiales que eviten la compactación excesiva, que permitan el crecimiento de raíces y el buen drenaje el agua.
- Desinfectar las semillas antes de la siembra.
- Desinfectar los sustratos con fungicidas sistémicos específicos para los protozoos del tipo oomicetos, como son las fenilamidas y los etilfosfonatos. Dentro de las fenilamidas se encuentra el metalaxyl, que tiene acción preventiva y curativa. Los etilfosfonatos son las sales o ésteres del ácido fosfónico, cuyo principal compuesto es el fosetilaluminio y su acción es sistémica. Estos fungicidas se aplican en el momento del trasplante de semillero a bolsa, en una dosis de 1 cc/L y 3 g/L en *drench*, respectivamente. Para evitar problemas de toxicidad del operario y de las plantas del vivero, es necesario que el viverista conozca la toxicidad del producto y el tiempo de espera de la aplicación a la siembra. Por ello, se debe leer cuidadosamente la etiqueta del producto y consultar a un ingeniero agrónomo sobre los pasos para el tratamiento.
- Utilizar portainjertos tolerantes a gomosis (tabla 16).
- Realizar monitoreos o inspecciones periódicas de las plantas para detectar los daños ocasionados por el patógeno y tomar medidas de control.

- Evitar el exceso de riego y realizar una fertilización de acuerdo con los requerimientos de las plantas.
- Eliminar plantas enfermas.

Adicionalmente, se requiere de forma obligatoria las siguientes disposiciones de la Resolución 12816 de 2019 del ICA:

- Disponer de un sistema de riego y drenaje, para evitar encharcamientos que causen pudrición de las semillas, presencia de enfermedades fungosas en la plántula u otros problemas.
- Tener camas o estibas elevadas del suelo, mínimo 15 cm, para aislar efectivamente el material de propagación contra patógenos del suelo (figura 67).



Foto: Yeison López-Galé

Figura 67. Plantas de cítricos dispuestas sobre estibas de concreto elevadas a 15 cm del suelo.

- Tener un cobertizo que aisle los sustratos del agua lluvia, viento y luz solar directa, y disponer de un área de almacenamiento, un área de mezclas sobre piso de cemento u otro material que no permita que estos estén en contacto directo con el suelo, y un área de desinfección de sustratos.

- El acceso a la casa de malla debe tener una antecámara de desinfección con piso de cemento, con doble puerta con marco cerrado y cubierta con malla antiáfidos, diseñada para evitar entrada de posibles vectores o patógenos, donde se debe tener una zona de desinfección de zapatos con cal viva (figura 68), para evitar la contaminación del vivero con patógenos del suelo (pediluvio).
- Llevar un registro de las labores fitosanitarias que se realicen en el vivero y los insumos de los agroquímicos y orgánicos utilizados (nombre comercial, ingrediente activo, dosis/litro, frecuencia) para el manejo de los problemas fitosanitarios.



Fotos: Nubia Murcia

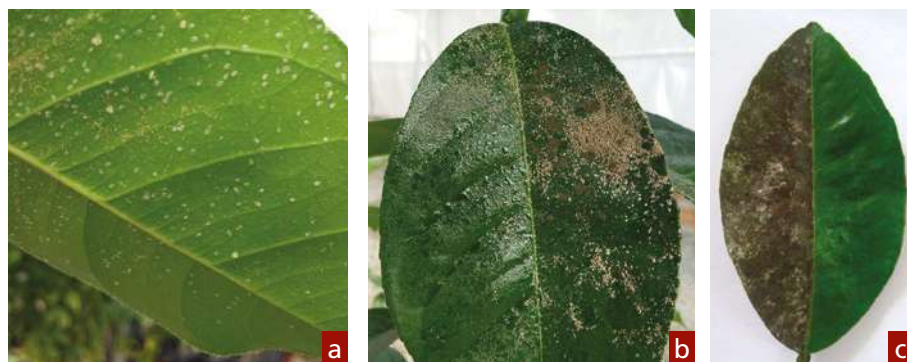
Figura 68. Casa de malla de cítricos. a. Antecámara de desinfección con piso de cemento; b. Zona de desinfección de calzado.

Fumagina

La fumagina no es una enfermedad exclusiva de los cítricos; también se presenta en otros hospederos (Barahona & Barrantes, 1991). Afecta todas las especies de cítricos y se presenta en hojas, tallos y frutos, principalmente cuando las plantas son afectadas por insectos que excretan melaza (Castillo, 2001; Orozco, 1999). En ataques fuertes de fumagina, la planta se debilita, lo que provoca una intensa defoliación; se disminuye sustancialmente el vigor vegetativo y puede incluso llegar a causar la muerte de la planta (Castaño & Del Río, 1994; Loussert, 1992).

Agente causal

Los hongos que causan la fumagina pertenecen al género *Capnodium*, familia Capnodiaceae. El daño que causa *Capnodium* spp. es indirecto; el hongo no parasita directamente al tejido vegetal, sino que se desarrolla utilizando la melaza de los insectos chupadores como áfidos, mosca blanca, escamas y el piojo harinoso (Pastrana et al., 1998). Al limpiar la superficie de la hoja que presenta fumagina, la capa negra sale fácilmente y se ve el verde brillante de la hoja sin presentar algún tipo de daño. El hongo crece sobre la superficie de las hojas y, por lo tanto, dificulta la actividad fotosintética (Barahona & Barrantes, 1991) (figura 69).



Fotos: Diana Rodríguez

Figura 69. Tipo de daño ocasionado por fumagina en cítricos. a. Insectos chupadores (mosca blanca) en el envés de la hoja de cítricos; b. Sustancias azucaradas en el haz de la hoja con presencia de fumagina; c. Lado izquierdo de la hoja: infección superficial por fumagina, lado derecho de la hoja: color verde brillante sin presentar ningún tipo de daño después de limpiar la superficie de la hoja con infección de fumagina.

Las conidias del hongo son las que diseminan la enfermedad de una hoja a otra y, si al germinar encuentran nutrientes suficientes (sustancias azucaradas), comienza el desarrollo micelio característico de la enfermedad.

Síntomas

El síntoma característico de la fumagina es una mancha formada por un polvo negro muy fino que se fija generalmente en el haz de las hojas. El polvo poco a poco invade todo el limbo, formando una película delgada, suave al tacto y fácilmente desprendible al raspar la hoja, ya que el hongo no penetra los tejidos vegetales (figura 70).



Fotos: Diana Rodríguez

Figura 70. Hojas de cítricos con diferente grado de infección de fumagina. a. Hoja sana; b. Invasión de la fumagina con diferentes grados de infección hasta cubrir el 100 % del limbo de la hoja.

La presencia de esta enfermedad depende de las poblaciones de insectos chupadores que se presentan en las brotaciones vegetativas de las plantas. Cuanto mayor sean las infestaciones de insectos chupadores, mayor será la secreción de las sustancias azucaradas y, por ende, mayor será la incidencia del hongo (Pastrana et al., 1998). Las condiciones atmosféricas también tienen un papel muy importante en la incidencia de la enfermedad: la elevada humedad relativa y la poca iluminación son condiciones favorables para su desarrollo (Barahona & Barrantes, 1991).

Diagnóstico

El diagnóstico de la fumagina se puede realizar fácilmente de forma visual, ya que la sintomatología es muy similar al tizne. El hongo se desarrolla de forma superficial sobre las hojas, formando una especie de película de color negro muy distinguible a simple vista, por lo que se requieren de monitoreos frecuentes para la detección oportuna de insectos chupadores y síntomas de la enfermedad, para hacer un manejo adecuado de la fumagina y garantizar la sanidad de las plantas de cítricos.

Manejo de la enfermedad

Dado que la fumagina es siempre consecuencia de los ataques de insectos chupadores, su principal método de manejo es la prevención a través de un adecuado control de las poblaciones de insectos (ICA, 2012) con insecticidas convencionales solos o en combinación con aceites minerales que han resultado ser muy útiles para el control

de plagas en cítricos (Larral & Ripa, 2009). También es recomendable realizar las siguientes labores:

- Evitar la alta densidad de plantas por área para mejorar la aireación y disminuir las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad: alta humedad relativa y poca iluminación de las plantas.
- Cuando la enfermedad se establece en las plantas de cítricos, se debe hacer control de la población de insectos chupadores; sin embargo, como la fumagina queda en las hojas, se debe utilizar detergentes agrícolas para así limpiar el tejido de la planta (figura 71).



Fotos: Diana Rodríguez

Figura 71. Control de fumagina en cítricos. a. Control de insectos chupadores (mosca blanca); b. Desprendimiento de la fumagina de las hojas de cítricos después de realizado el control.

- En caso de que se presenten daños severos por la fumagina, se debe realizar aspersiones de fungicidas cúpricos o carbamatos (Barahona & Barrantes, 1991).
- Todas las labores fitosanitarias que se realicen en el vivero se deben registrar en un libro de campo.

Referencias

- Álvarez, L. A., Vicente, A., García, R. D., Martínez, C. P., De la Rosa, E., Bascon, J., Armengol, J., Abad, C. P., Alfaro, L. A., & García, J. J. (2006). Muerte de árboles cítricos causada por ataques de *Phytophthora citrophthora* a ramas principales. Boletín de sanidad vegetal. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 32(2), 241-258. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_Plagas/BSVP_32_02_241_258.pdf
- Ammar, E. Ramos, J., Hall, D., Dawson, W., & Shatters, R. (2016). Acquisition, replication and inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* following various acquisition periods on Huanglongbing-infected Citrus by nymphs and adults of the Asian Citrus Psyllid. *PLoS One*, 11(7), e0159594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159594>
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Porciff, D. E., Clark, M. F., & Loebenstein, G. (1979). The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 69, 190-194. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1979Articles/Phyto69n02_190.pdf
- Barahona, M., & Barrantes, S. (1991). *Fruticultura especial: Fascículo 1. cítricos*. Fruticultura II. Editorial Universidad Estatal a Distancia.
- Bernad, L., & Duran-Vila N. (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular & Cellular Probes*, 20(2), 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.11.001>
- Bernad, L., Duran-Vila, N., & Elena, S. F. (2009). Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 90(8), 2040-2049. <http://doi.org/10.1099/vir.0.010769-0>
- Bliss, D. E., & Fawcett, H. S. (1944). The morphology and taxonomy of *Alternaria citri*. *Mycologia*, 36(5), 469-502. <https://doi.org/10.2307/3754954>
- Bist, V. S., & Nene, Y. L. (1988). A selective medium for *Phytophthora* causing pigeon pea blight. *Pigeon Pea Newsletter*, 8, 12-13.
- Bové, J. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Plant Pathology*, 88(1), 7-37. <https://www.jstor.org/stable/41998278>
- Caicedo, A., Ramírez, R., Bermúdez, C., Gómez, H., Rivera, J., Muñoz, R., & Gómez, C. (2006). *Fortalecimiento del proceso de certificación de cítricos para Colombia*. Boletín divulgativo N.º 7. Corpoica. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19194>

- Camacho-Tapia, M., Rojas-Martínez, R., Rebollar-Alviter, A., Aranda-Ocampo, S., Suárez-Espinosa, J. (2016). Biological, ecological, epidemiological and management aspects of Candidatus Liberibacter. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 22(1), 5-16. <http://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.09.021>
- Cambra, M. (1983). Diagnóstico del virus de la tristeza (CTV) mediante la técnica ELISA: Interés y aplicaciones. *Levante Agrícola*, 245, 11-17. https://digital.csic.es/bitstream/10261/128680/1/CambraM_LevAgric_1983.pdf
- Cambra, M., Gorrís M. T., Olmos, A., Martínez, M. C., Román, M. P., Bertolini, E., ... López, A., Carbonell, E. A. (2002). European Diagnostic Protocols (Diagpro) for Citrus tristeza virus in adult trees. En J. da Graça, R. Milne & L. W. Timmer (Eds.), *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCv)* (pp. 69-77). https://escholarship.org/content/qt4ph9b2xr/qt4ph9b2xr_noSplash_0faa4b1b0c5d8758b00194e62f8d7bd7.pdf?t=p0w8pa
- Cambra, M., & Moreno, P. (2000). Tristeza. En P. Moreno, & N. Durán-Vila (Eds.), *Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología*, N.º 2 (pp. 77-81). Ediciones Mundi-Prensa.
- Cambra, M., Moreno, P., & Navarro, L. (1979). Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos mediante técnica inmunoenzimática Elisa "sándwich". *Anales, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Protección Vegetal*, 12, 115-125.
- Castaño, J., & Del Río, M. L. (1994). *Guía para el diagnóstico y control de enfermedades en cultivos de importancia económica*. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras.
- Castillo L. J. (2001). *Manual técnico de cítricos (Citrus spp. Rutaceae)*. Dirección Regional Central Occidental.
- Castro, B., Timmer, L., Leguizamón, J., & Müller, G. (2000). *Enfermedades de los cítricos en Colombia*. Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola. http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_56_Enfermedades%20citriscos.pdf
- Castro-Caicedo, B., Leguizamón-Caycedo, J., & López-Ríos, J. (1994). La mancha foliar de los cítricos en la zona cafetera. *Avances Técnicos*, 198. https://www.cenicafe.org/es/index.php/nuestras_publicaciones/avances_tecnicos/avance_tecnico_0198
- Catara, A., Lombardo, A., Nobile, G., & Rizza, S. (2010). Characterization of additional Citrus tristeza virus isolates in a highly infected Citrus area of Sicily. *Proceedings, 17th Conference, IOCv, 2010 - Citrus Tristeza Virus*, 17(17), 80-83.

- Chaparro, Z., Velásquez, H., & Orduz-Rodríguez, J. (2013). Influencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en el comportamiento de la lima acida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre seis patrones en el pie de monte llanero de Colombia (1997-2008). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1), 33-38. https://doi.org/10.21930/rcta.vol14_num1_art:268
- Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF). (2016). *PD 15: Virus de la tristeza de los cítricos*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2017/02/DP_15_2016_Es_2017-01-31.pdf
- Dalkilic, Z., Timmer, L. W., & Gmitter, F. G. (2005). Linkage of an *Alternaria* disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(2), 191-195. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.191>
- Dawson, W. O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., & Moreno, P. (2015). Citrus tristeza virus: Making an-Ally from an Enemy. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 137-155. <http://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>
- Dewdney, M. M. (2021). 2020–2021 Florida Citrus Production Guide: Citrus Scab, *EDIS: 2020–2021*. <http://doi.org/10.32473/edis-cg021-2021>
- Drenth, A., & Sendall, B. (2001). *Practical guide to detection and identification of Phytophthora*. CRC for Tropical Plant Protection.
- Durán-Vila, N. (2004). Enfermedades de cítricos causadas por viroides: exocortis y caquexia. *Vida Rural*, 188, 52-56. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_vrural/Vrural_2004_188_52_56.pdf
- Durán-Vila, N., Pina, J., Ballester, J., Juárez, J., Roistacher, C., Rivera- Bustamante, R., & Semancik, S. (1988). The citrus exocortis disease: A complex of viroid-RNAs. *Proc 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol. (IOCV)*, Riverside CA. EE. UU., pp. 152-164. <http://hdl.handle.net/20.500.11939/7714>
- Durán-Vila, N., Pina, J., & Navarro, L. (1993). Improved indexing of citrus viroids. *Proc. 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol (iocv)* (pp. 202-211). Riverside, CA, EE.UU.
- Eckert, J. W., & Tsao, P. H. (1960). A preliminary report on the use of pimaricin to the isolation of *Phytophthora* spp. from root tissues. *Plant Disease Reports*, 44(8), 660-661.
- Figueroa, J., Foguet, L., Figueroa-Castellanos, A., & Stein, B. (2009). Biological characterization of Citrus tristeza virus strains in lemon in Tucumán, Argentina. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 86(1), 37-41. <http://www.scielo.org.ar/pdf/riat/v86n1/v86n1a05.pdf>

- Feichtenberger, E., Bassanezi, R. B., Spósito, M. B., & Belasque, Jr. J. (2005). Doenças dos citros. En H. Kimati L. Amorim, J. A. M., Rezende, A. Bergamin Filho & L. E. A. Camargo (Eds.), *Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas* (v.2, cap. 28, pp. 239-269). Agronômica Ceres.
- Folimonova, S., Robertson, C., Garnsey, S., Gowda, S., & Dawson, W. (2009). Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) under different conditions. *Phytopathology*, 99(12), 1346-1354. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-12-1346>
- Freeman, W. M., Walker, S. J., & Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: pit-falls and potential. *Biotechniques*, 26(1), 112-125. <https://doi.org/10.2144/99261rv01>
- Garnier, M., Bové, J. J., Cronje, C., Sanders, G., Korsten, L., & Le Roux, H. (2000). Presence of “*Candidatus Liberibacter africanus*” in the Western Cape Province of South Africa. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*, 14(14), 369-372. <https://doi.org/10.5070/C52sz5q3w7>
- Giacometti, D., & Ríos, D. (1967). Programa de certificación de yemas para la propagación de cítricos en Colombia. *Separata de la Revista Agricultura Tropical*, 23(5), 277-287.
- Gross, H. Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Jank, P., Lossow, C., Alberty, H., Ramm, K., & Sängler, H. (1982). Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *European Journal of Biochemistry*, 121, 249-257. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05779.x>
- Halbert, S., & Manjunath, K. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87(3), 330-353. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0330:ACPSPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0330:ACPSPA]2.0.CO;2)
- Hartung, J., Halbert, S., Pelz-Stelinski, K., Bransky, R., Chen, C., & Gmitter, F. (2010). Lack of evidence for transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ through citrus seed taken from affected fruit. *Plant Disease*, 94(10), 1200-1205. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-09-0595>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Resource*, 6, 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hendrix, F. F., & Kuhlman, E. G. (1965). Factors affecting direct recovery of *Phytophthora innamomic* from soil. *Phytopathology*, 55, 1183-1187.
- Hilf, M. E., Mavrodieva, V. A., & Garnsey, S. M. (2005). Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza* virus: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology*, 95, 909-917. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0909>

- Hocquellet, A., Toorawa, P., Bové, J., & Garnier, M. (1999). Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the h operon. *Molecular and Cellular Probes*, 13(5), 373-379. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0263>
- Hung, T., Wu, M., & Su, H. (2000). Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. *Journal of Phytopathology*, 148, 321-326. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00506.x>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos (Citrus). Medidas para la temporada invernal*. <https://www.ica.gov.co/getattachment/89f7ca91-2820-4d06-9826-74964de55de6/Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Citricos.aspx>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2009). *Resolución N.º 3180, por medio de la cual se establecen los requisitos y procedimientos para la producción y distribución de material de propagación de frutales en el territorio nacional y se dictan otras disposiciones*.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2015a). *Resolución N.º 2390, por medio de la cual se declara el estado de emergencia fitosanitaria en el territorio nacional por la presencia de adultos de Diaphorina citri infectados con la bacteria de la enfermedad del HLB de los cítricos*.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2015b). *Resolución N.º 2684, por medio de la cual se modifica la Resolución 4214 de 2014*.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2017). *Resolución N.º 7109, Por medio de la cual se declara el estado de emergencia fitosanitaria en el territorio nacional por la presencia de la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) de los cítricos*.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2018). *Resolución N.º 19680, por medio de la cual se declara en cuarentena fitosanitaria el Departamento de Norte de Santander por la presencia de la plaga denominada Huanglongbing (HLB) de los cítricos*.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2019). Resolución 12816 de agosto de 2019 “Por medio de la cual se establece los requisitos para el registro ante el ICA de los viveros y/o huertos básicos productores y/o comercializadores de semilla sexual y/o asexual (material vegetal de propagación) de cítricos, así como los requisitos fitosanitarios para la conservación, producción, certificación y distribución de material de propagación de cítricos en viveros, en el territorio nacional”.

- Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). (2010). Sistema de producción de material de propagación certificado de cítricos en Cuba. En *Viveros de cítricos en el contexto fitosanitario actual* (pp. 61-73). IIFT. <http://riacnet.net/wp-content/uploads/2014/11/Viveros-citricos-completo.pdf>
- Jagoueix, S., Bové, J., & Garnier, M. (1996). PCR detection of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes*, 10(1), 43-50. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1996.0006>
- Jagtap, G. P., Dhavale, M. C., & Dey, U. (2012). Symptomatology, survey and surveillance of citrus gummosis disease caused by *Phytophthora* spp. *Scientific Journal of Agricultural*, 1(1), 14-20. <https://doi.org/10.14196/AA.V1I1.8>
- Klotz, L. (1973). *Color Handbook of Citrus Diseases*. University of California.
- Klotz, L. (1978). Fungal, bacterial and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, and nursery orchard. En W. Reuther, E.C. Calavan, G.F. Carman (Eds.), *The Citrus Industry Vol. 4. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources* (p. 62). Richmond, Crop Protection.
- Kueh, T., & Khew, K. (1982). Survival of *Phytophthora palmivora* in soil and after passing through alimentary canals of snails. *Plant Disease*, 66, 897-99. https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1982Articles/PlantDisease66n10_897.pdf
- Larral, D. P., & Ripa, S. R. (2009). Aceite mineral en manejo integrado de plagas en cítricos. *Revista Tierra Adentro*, 84, 20-22. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/5055>
- Lee, R., & Bar-Joseph, M. (2000). Tristeza. En L.W. Timmer, S. M. Garnsey & J.H. Graham (Eds.), *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd edn (pp. 61-63). APS Press.
- Lin, K. (1956). Observation on yellow shoot of citrus. Etiological study of yellow shoot of citrus. *Acta Phytopathologica*, 2(1), 1-42.
- López, J., & Cardona, J. (2007). *Evaluación de portainjertos de cítricos en la zona central cafetera de Colombia*. Cenicafé. <https://www.cenicafe.org/es/publications/bot030.pdf>
- Loussert, R. (1992). *Los agrios*. Ediciones Mundi Prensa.
- Lozano, I., Calvert, L., Moreno, M., Angel, J., Turizo, W., Gómez, J., Narváez, J., Narváez, E., Caicedo, A., & Rojas, A. (2009). *Desarrollo e implementación de una red nacional para la certificación fitosanitaria de cítricos*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19904>
- Luis, M., Peña, M., Collazo, C., Ramos, P., & Llauger, R. (2010). *Enfermedades bacterianas y fungosas en viveros de cítricos: características y control*.

- Taller regional sobre viveros de cítricos. <http://riacnet.net/wp-content/uploads/2014/11/Conf-6-Enfermedades-fungosas.pdf>
- Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M., & Nakanishi, N. (1977). Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytopathology*, 67, 425-28. <http://doi.org/10.1094/Phyto-67-425>
- Mateus, D., Pulido, X., Gutiérrez, A., & Orduz-Rodríguez, J. (2010). Evaluación económica de la producción de cítricos cultivados en el Piedemonte del Departamento del Meta durante 12 años. *Orinoquia*, 14(1), 16-26. <https://doi.org/10.22579/20112629.122>
- McCain, A., Holtsman, O., & Trujillo, E. (1967). Concentration of *Phytophthora* cinnamon chlamydospores by soil sieving. *Phytopathology*, 57, 1134-35.
- Mitchell, D., Kannwischer-Mitchell, M., & Zentmyer, G. (1986). Isolating, identifying, and producing inoculum of *Phytophthora* spp. En K. D. Hickey (Ed.), *Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens* (pp. 63-66). American Phytopathological Society.
- Mondal, S. N., Bhatia, A., Shilts, T., & Timmer, L. W. (2005). Baseline sensitivities of fungal pathogens of fruit and foliage of citrus to azoxystrobin, pyraclostrobin, and fenbuconazole. *Plant Disease*, 89(11), 1186-1194. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PD-89-1186>
- Morales, J., Acosta, O., Tamayo, P., & Peñaranda, J. (2013). Characterization of Citrus tristeza virus isolates from Colombia. *Revista Protección Vegetal*, 28(1), 45-53. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv06113.pdf>
- Mosquera, V., Martínez, M., Cuellar, W., Vaca-Vaca, J., Lozano, I., & Murcia, N. (2015). Detection of viroids and Citrus tristeza virus (CTV) in Tahiti lime *Citrus latifolia* (Tanaka) through application of RT-PCR. *Memorias xxxii Congreso Colombiano de Fitopatología y i Simposio Internacional de Fusarium. Memorias xxxlll Congreso Colombiano de Fitopatología y Ciencias Afines*, 39(1), 59.
- Mounde, L., Ateka, E., Kihurani, A., Wasilwa, L., & Thurani, E. (2009). Occurrence and distribution of citrus gummosis (*Phytophthora* spp.) in Kenya, Africa. *African Journal of Horticultural, Science & Biotechnology*, 2, 56-68.
- Murcia, N., Bani Hashemian, S., Bederski, K., Wulff, N., Barbosa, C., Bové, J., & Durán-Vila, N. (2010). Viroids in Tahiti Lime Scions Showing Bark Cracking Symptoms. *Proceedings, 17th Conference, IOCV - Viroids*. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29406/1/MURCIAID27510.pdf>

- Murcia, N., Caicedo, A., Calvert, L., Sánchez, M., Dávila, G., Domínguez, A., & Martínez, H. (2005). Caracterización de diez aislamientos colombianos del virus de la tristeza de los cítricos. *Fitopatología Colombiana*, 28, 31-36.
- Murcia, N., Osorio, J., Morales, F., & Calvert, L. (2002). Distribución y caracterización serológica de aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. *Fitopatología Colombiana*, 26, 21-16. <https://hdl.handle.net/10568/44280>
- Murcia, N., Ríos, D., Caicedo, A., Martínez, M., & Corrales, D. (2012). *Importancia del programa de certificación como medida para controlar la calidad sanitaria y varietal de los cítricos en Colombia*. Plegable divulgativo. Corpoica. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/20664>
- Murcia, N., Serra, P., Olmos, A., & Durán-Vila, N. (2009). A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 23(2), 95-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2008.12.007>
- Mycobank. International Mycological Association. (2015). www.mycobank.org. Consultado el 12/01/2015 para clasificación taxonómica de *Alternaria* y *Pithomyces chartarum*.
- Naqvi, S. (1990). *Survey of Nagpur mandarin nurseries for Phytophthora spp.* Annual Report 1989-1990, NRC for Citrus Nagpur.
- Naranjo, M. (1997). Reseña bibliográfica sobre la enfermedad tristeza de los cítricos. II. Diversidad de razas de virus, caracterización, formas de transmisión, diagnóstico y estrategias de control. *Levante Agrícola*, 36, 355-368.
- Neto, H., Silva, S., Mourão-Filho, F., Sposito, M., & Caputo, M. (2016). *The citrus nursery practices in Brazil*. Vivecitrus Oroganização Paulista de Viveiros de Mudanças Cítricas https://www.researchgate.net/publication/316250188_The_Citrus_Nursery_Practices
- Oliveros, G. O., Martínez, S. N., Torres, R., & Acosta, O. (2009). CPM gene diversity in field isolates of Citrus tristeza virus from Colombia. *Archives of Virology*, 154(12), 1933-1937. <http://doi.org/10.1007/s00705-009-0530-6>
- Orduz-Rodríguez, J., León, G., & Arango, L. (2009). *Patrones para cítricos en los Llanos Orientales de Colombia*. Corpoica. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/2209>
- Orduz-Rodríguez, J., & Mateus, C. (2012). Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia En L. F. Garcés (Ed.), *Cítricos: Cultivo, poscosecha e industrialización* (Capítulo 2). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), Corporación Universitaria Lasallista; Universidad de Antioquia. <http://hdl.handle.net/10567/561>
- Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (Nappo). (2012). *Protocolos de diagnóstico de la NAPPO. PD 02 Huanglongbing de los cítricos*. https://nappo.org/application/files/1515/9353/4531/DP_2_HLB_04-10-2012-s.pdf

- Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (Nappo). (2013a). *Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias (NRMF). NRMF 16 medidas integradas para la movilización de material propagativo de cítricos*. http://nappo.org/files/8914/5083/2412/RSPM16_10-09-2013-s.pdf
- Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (Nappo). (2013b). *PD 01 Virus tristeza de los cítricos (Citrus Tristeza virus - CTV)*. Nappo.
- Orozco, S. (1995). *Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Orozco, S. (1999). *Enfermedades fungosas de los cítricos en México*. En H. Cárdenas, Apuntes del curso: Fitosanidad tropical. Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados. Tabasco, México.
- Pastrana, A., Rodríguez, C., León, A., & Ramírez, S. (1998). *Manejo tecnológico para el cultivo de la naranja en Tabasco*. Isprotab-Inifap.
- Paredes-Tomás, C., Luis-Pantoja, M., Collazo-Cordero, C., Peña-Bárcaga, I., López-Hernández, D., Batista-Le Riverend, L., & Hernández-Rodríguez, L. (2015). Diferencias en la manifestación de síntomas asociados a la enfermedad Huanglongbing (HLB) en diferentes especies cítricas en Cuba. *CitriFrut*, 32(2), 36-41. https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/26_Paredes_16.pdf
- Peever, T. L., Su, G., Carpenter-Boggs, L., & Timmer, L. W. (2004). Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96(1), 119-134. <https://doi.org/10.2307/3761993>
- Pegg, K., Duff, J., & Manners, A. (2014). *Alternaria diseases in production nurseries*. <https://www.vegkit.com.au/globalassets/hort-innovation/resource-assets/ny11001-alternaria-diseases.pdf>
- Quiroga Cardona, J., Hernández Parrado, F., Silva Herrera, M., & Orduz-Rodríguez, J. (2010). Comportamiento de la producción de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), injertada sobre el patrón de Mandarina Cleopatra (*Citrus reticulata* Blanco) y la influencia del virus de la tristeza (CTV) en condiciones del piedemonte del Meta, 1997-2008. *Orinoquia*, 14(1), 1-11. <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v14n1/v14n1a02.pdf>
- Ristaino, J. B., & Gumpertz, M. C. (2000). New frontiers in the study of dispersal and spatial analysis of epidemics caused by species in the genus *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 541-76. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.541>
- Rocha-Peña, M., Lee, R. F., Lastra, R., Niblett, C. L., Ochoa, F., Garnsey, S., & Yokomi, R. (1995). Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production. *Plant Disease*, 79, 437-445. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-79-0437>

- Rodríguez-Mora, D., Mosquera, V., Martínez, M., & Murcia, N. (2015). Standardizations of the Northern blot Technique to detect CEVd from citrus in Colombia. *Memorias xxxii Congreso Colombiano de Fitopatología y I Simposio Internacional de Fusarium*, 39(1), 59.
- Rodríguez-Mora, D., Palacios, L., Martínez, M., & Murcia, N. (2017). Collection of work of citrus varieties free of Tristeza, Exocortis, and Huanglongbing. *Libro de resúmenes del v Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical/ ix Simposio Internacional de piña "Fruticultura" 2017*, p. 35.
- Roistacher, C. (Ed.). (1991). *Graft-Transmissible Diseases of Citrus: Handbook for Detection and Diagnosis*. Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- Ruiz, R. S., Moreno, P., Guerri, J., & Ambros, S. (2007). A Real-Time RT-PCR assay for detection and absolute quantitation of Citrus tristeza virus in different plant tissues. *Journal of Virological Methods*, 145, 96-105. <http://doi.org/10.1016/j.jviro-met.2007.05.011>
- Sadowsky, A., Kimchi, M., Oren, Y., & Solel, Z. (2002). Occurrence and management of Alternaria brown spot in Israel 2002. *Phytoparasitica*, 30, 19. <https://doi.org/10.1007/BF03039999>
- Savita, G. S. V., & Avinash, N. (2012). Citrus diseases caused by Phytophthora species. *GERF Bulletin of Bioscience*, 3, 18-27.
- Semancik, J. S., & Weathers, L. G. (1972). Exocortis disease: Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology*, 237, 242-244. <https://doi.org/10.1038/newbio237242a0>
- Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y Semillas (Senave). (2013). *Manual técnico de identificación a campo del Huanglongbing (HLB) de los cítricos y el insecto vector, Diaforina citri*. <http://www.cosave.org/sites/default/files/Paraguay%20Manual%20de%20identificacion.pdf>
- Simmons, E. G. (1990). Alternaria themes and variations (27-53). *Mycotaxon*, 37, 79-119.
- Solano-Luna, L. M., Chavarro-Mesa, E., & Ángel-Díaz, J. E. (2018). PCR cuantitativa para la detección del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. *Revista Ciencia Agrícola*, 15(1), 7-18. <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.n1.2018.7789>
- Teixeira, D., Ayres, J., Kitajima, E., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., & Bové, J. (2005). First Report of a Huanglongbing-Like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil and Association of a New Liberibacter Species, "Candidatus Liberibacter americanus", with the Disease. *Plant Disease*, 89(1), 107. <https://doi.org/10.1094/pd-89-0107a>

- Timmer, L., Peever, T., Solel, Z., & Akimitsu, K. (2003). *Alternaria* diseases of citrus - novel pathosystems. *Phytopathologia Mediterranea*, 42(2), 99-112. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1710
- Timmer, L., Solel, Z., & Orozco-Santos, M. (2000). *Alternaria* brown spot of mandarins. En L. W. Timmer, S. M. Garnsey, & J. H. Graham (Eds.), *Compendium of Citrus Diseases* (pp. 19-21). APS Press.
- Tsao, P. (1960). A serial dilution end point method for estimating disease potential of citrus *Phytophthoras* in soil. *Phytopathology*, 50(10), 717-724.
- Tsao, P. (1970). Applications of vital fluorescent labeling technique with brighteners to studies of saprophytic behavior of *Phytophthora* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2, 247-56. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(70\)90031-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(70)90031-3)
- Tsao, P. (1983). Factors affecting isolation and quantification of *Phytophthora* from soil. En D. C. Erwin, S. Bartmicki-Garcia, & P. H. Tsao (Eds), *Phytophthora* its biology, taxonomy, ecology, and pathology (pp. 219-236). APS.
- Tsao, P., & Guy, S. (1977). Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora* isolation medium containing hymoxazol. *Phytopathology*, 67, 796- 801. <http://doi.org/10.1094/Phyto-67-796>
- Tsao, P. & Ocana, G. (1969). Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils. *Nature*, 223(5306), 636-638. <https://doi.org/10.1038/223636a0>
- Valkonen, J. P. T., & Koponen, H. (1990). The Seed-Borne Fungi of Chinese Cabbage (*Brassica pekinensis*), Their Pathogenicity and Control. *Plant Pathology*, 39(3), 510-516. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02527.x>
- Vernière, C., Cohen, S., Raffanel, B., Dubois, A., Venars, P., Panabieres, F. (2004) Variability in pathogenicity among *Phytophthora* spp. Isolated from citrus in Corsica. *Journal of Phytopathology*, 152(8-9), 476-83. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00878.x>
- Wallace, J. M., & Drake, R. J. (1951). Recent developments in studies of quick decline and related diseases. *Phytopathology*, 41, 785-793.
- Walter, A. J., Duan, Y., & Hall, D. G. (2012). Titters of ‘Ca. *Liberibacter asiaticus*’ in *Murraya paniculata* and *Murraya*-reared *Diaphorina citri* are much lower than in *Citrus* and *Citrus*-reared psyllids. *HortScience*, 47(10), 1449-1452.
- Wang, Y., Kondo, T., He, Y., Zhou, Z., & Lu, J. (2020). Genome Sequence Resource of *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in Colombia. *Plant Disease*, 105(1), 193-195. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1249-A>
- Whiteside, J. O. (1976). A newly recorded *Alternaria*-induced brown spot disease on Dancy tangerines in Florida. *Plant Disease Reporter*, 60, 326-329.

