

Artículo de investigación científica y tecnológica

Identificación de tecnologías y métodos para la detección temprana del Huanglongbing (HLB) a través de cienciometría en artículos científicos y patentes

 William Alejandro Orjuela-Garzón^{1*},  Wilson Arlen Araque Echeverry²,
 Rafael Cabrera Pedraza¹

¹ Centro de Productividad del Tolima. Ibagué, Colombia

² Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Bogotá, Colombia

* Autor de correspondencia: Centro de Productividad del Tolima. Carrera 4C #36-32, Barrio Cadiz, Ibagué, Tolima.
alejandro.orjuela@hotmail.es

Recibido: 12 de Diciembre de 2018

Aceptado: 17 de Diciembre de 2019

Publicado: 16 de Mayo de 2020

Editor temático: Lumey Pérez Artilles (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [AGROSAVIA])

Para citar este artículo: Orjuela-Garzón, W. A., Araque Echeverry, W. A., & Cabrera Pedraza, R. (2020). Identificación de tecnologías y métodos para la detección del Huanglongbing (HLB) a través de cienciometría en artículos científicos y patentes. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(2), e1208. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num2_art:1208

Resumen

El objetivo planteado para esta revisión de literatura científica y de patentes consiste en identificar las tendencias científicas y tecnológicas en la detección del Huanglongbing (HLB) o enverdecimiento de los cítricos, así como las principales acciones que se están adelantando para mitigar su impacto en la citricultura mundial. La detección rápida y oportuna de esta enfermedad es clave para los productores, debido a que se pueden plantear acciones correctivas que eviten una pérdida total de la producción, partiendo de que aún no se conoce una cura para la misma. Para lograr los resultados esperados, se realizó una revisión de las publicaciones en bases de datos científicas y tecnológicas, disponibles entre 2007 y 2018, a partir de una metodología de vigilancia tecnológica. Los resultados fueron analizados y procesados a través del *software* Matheo Analyzer, lo que permitió identificar las variables de futuro para el tema de trabajo. Se evidenció que Estados Unidos y China son los países que presentan un notable interés en el tema relacionado. Dentro de las instituciones líderes en investigación sobre detección temprana del HLB, se resaltan la Universidad de Florida y el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). Entre las tecnologías y métodos de detección temprana para esta enfermedad, se encontraron como áreas relevantes de investigación y desarrollo tecnológico la teledetección a partir de la radiación electromagnética captada por sensores, y el área de bioquímica y genética en la que se destacan las técnicas de identificación molecular como la amplificación isotérmica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Palabras clave: *Candidatus Liberibacter* spp, citrus, *Diaphorina citri*, enverdecimiento, vigilancia tecnológica

Identification of technologies and methods for the early detection of Huanglongbing (HLB) through scientometrics in scientific articles and patents

Abstract

The aim of this study was to identify scientific and technological trends in the detection of Huanglongbing (HLB) or “citrus greening”, one of the most devastating diseases for citrus worldwide, as well as the main actions that are being carried out to mitigate the impact of the disease in the citrus-producing sector. The rapid and timely detection of this disease is key for producers because corrective actions can be proposed, which prevent a total loss of production, an effective cure is still unknown. A review of publications in scientific and technological databases was carried out to fill the gap knowledge, gathering data available between 2007 and 2018. The review was based on a technology surveillance methodology. The results were analyzed and processed, employing the Matheo Analyzer software, which identified topic variables for future studies. From the results obtained, it was evident that the United States and China are the countries that have a notable interest in the subject. In the area of early detection of HLB, the main research actors are the University of Florida and the USDA (United States Department of Agriculture). Among the early detection technologies and methods for this disease to be considered, several relevant areas of research

and technological development were observed, including remote sensing from electromagnetic radiation captured by sensors. Another research area of interest was biochemistry and genetics, where molecular identification techniques, such as isothermal amplification and rapid polymerase chain reaction (PCR), are highlighted.

Keywords: *Candidatus Liberibacter* spp, citrus, *Diaphorina citri*, greening, technological surveillance

Introducción

La producción mundial de cítricos, *Citrus* spp. (familia Rutaceae), se estima en más de 105 millones de toneladas anuales, de las cuales más de la mitad corresponde a naranja, lo que hace de esta fruta el cultivo número uno del mundo (Cubero, Lee, Aleixos, Albert, & Blasco, 2016). Actualmente, este cultivo está seriamente afectado por la aparición de una enfermedad bacteriana que ha generado cuantiosas pérdidas económicas en países como Estados Unidos, México y Brasil: el Huanglongbing (HLB) o enfermedad de los brotes amarillos, que constituye una de las más devastadoras de los cítricos (Badaracco, Redes, Preussler, & Agostini, 2017; Bové, 2006; Cubero et al., 2016), con pérdidas de 3 billones de dólares en términos de valor de producción anual reportadas solamente en la Florida (Estados Unidos) (Sankaran, Maja, Buchanon, & Ehsani, 2013).

Esta bacteria es transmitida de un árbol a otro a través de insectos vectores: *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), en Asia y América, y *Trioza erytreae* (Del Guercio) (Hemiptera: Triozidae), en África (Bové, 2006), así como por material vegetal de propagación como plantones, injertos y yemas (Garcés-Giraldo, 2012; León & Kondo, 2017; Manjunath, Halbert, Ramadugu, Webb, & Lee, 2008).

La enfermedad fue detectada por primera vez en China, en 1919 (Vojnov, Do Amaral, Dow, Castagnaro, & Marano, 2010); posteriormente, en 1928 se encontraron árboles de cítricos con sintomatología similar, pero esta no fue reconocida oficialmente sino hasta 1937 (Bové, 2006). El HLB puede afectar a casi todos los cultivares de cítricos, siendo los naranjos dulces *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, los tangelos *Citrus × tangelo* J.W. Ingram & H.E. Moore, y los mandarinos *Citrus reticulata* Blanco los más susceptibles; mientras que *Citrus × aurantifolia* (Christm.) Swingle, el naranjo amargo *Citrus × aurantium* L. y *Citrus trifoliata* L. son las menos susceptibles (Knapp et al., 2004). Según Abdullah, Shokrollah, Sijam y Akmar (2009), solo algunos cultivares de otras especies como *Citrus indica* Tanaka y *Citrus macroptera* Montrouz han presentado alguna tolerancia o posible resistencia a la bacteria. El kumquat *Fortunella margarita* (Lour.) Swingle, antes reportado como resistente al HLB, fue recientemente infectado y moteado (Tsai, Hung, Su, & Liao, 2006).

En la actualidad no se conoce control 100 % eficaz contra la enfermedad, excepto prevenir que los árboles se infecten (Bové, 2006), por lo que identificarla lo más rápido posible permite a los agricultores tomar medidas necesarias para su manejo, ya que, una vez confirmada la presencia de la enfermedad, la

erradicación es una de las principales recomendaciones para el manejo (León & Kondo, 2017), o el uso de técnicas de tratamiento y control como las expuestas por Al-Jumaili y Ehsani (2015).

La detección visual de esta enfermedad se dificulta debido a que su periodo de incubación es largo y puede ser influenciado por la edad y salud del árbol, por lo que puede existir el doble de infecciones asintomáticas que las visualmente sintomáticas (Gottwald, 2010). Debido a esto, es necesario identificar soluciones científicas y tecnológicas que permitan a los cultivadores detectar de manera temprana la presencia de la enfermedad, con el fin de mitigar el impacto que esta podría llegar a tener.

Ante esta problemática, los procesos de búsqueda, tratamiento y análisis de información a partir de bases de datos científicas y tecnológicas son en una herramienta útil para rastrear posibles soluciones innovadoras que sirvan de apoyo en las decisiones de los productores, entendiendo que el número de trabajos académicos publicados y patentes concedidas es un indicador importante para medir la tendencia de desarrollo de cierta área de investigación (Wang, Pan, Ke, Wang, & Wei, 2014).

Revisiones adelantadas por otros autores como Ifikhar, Rauf, Shahzad y Zahid (2016) han identificado soluciones para el control de la enfermedad como técnicas fitosanitarias, control sobre las poblaciones de vectores, prácticas culturales, quimioterapia y la propagación de material libre de la enfermedad, dejando a un lado las técnicas de detección rápida. Otras revisiones desarrolladas por Valdés et al. (2016) se han enfocado en la rapidez de la detección, debido a que el mecanismo más ampliamente usado es la exploración árbol a árbol, que resulta costosa e intensiva en mano de obra, por lo que se destacan las técnicas de reacción en cadena polimerasa y otras técnicas de tratamiento de imágenes. Cabe destacar que en ninguna de estas revisiones se muestra un modelo de revisión estructurada y tratamiento de resultados de bases de datos científicas o tecnológicas que sustenten sus hallazgos y permitan evidenciar la evolución de esta temática a través del tiempo.

En una economía basada en conocimiento, la capacidad de descubrir las semillas de innovación en la investigación básica y aplicada es la fuente de la competitividad, el crecimiento económico y del desarrollo de aplicaciones tecnológicas (Shibata, Kajikawa, & Sakata, 2011), por lo que artículos científicos y patentes forman parte de la infraestructura de investigación implicados en la construcción del conocimiento público (Hemmungs-Wirtén, 2015).

No obstante, el crecimiento exponencial en la producción científica y tecnológica es necesario emplear métodos y herramientas tecnológicas que permitan realizar un tratamiento eficiente a esos grandes volúmenes de datos y convertirlos en información estratégica. Existen diferentes herramientas tecnológicas para el tratamiento de los datos obtenidos de fuentes como Scopus, para artículos científicos, y PatentScope, para patentes, entre las que se encuentran Vosviewer, SciMAT, BibExcel, CiteSpace y Matheo Analyzer; esta última es empleada en esta revisión, dado que es un *software* de pago que permite analizar grandes volúmenes de datos, crear un panel de control, refinar la extracción, visualizar gráficamente la información y crear reglas para la identificación de información que otros *software* gratuitos no contemplan.

La enfermedad Huanglongbing de los cítricos

En los cítricos, los síntomas de HLB se presentan en las hojas como manchas amarillentas con aspecto de moteado asimétrico y el retraso del crecimiento de plantas en desarrollo, así como la producción de frutos deformes, pequeños y con coloración invertida (figura 1). Los frutos pueden desprenderse del árbol prematuramente (Bové, 2006; Gottwald, Graça, & Bassanezi, 2007). Los síntomas en hojas pueden confundirse con deficiencias nutricionales causadas por plagas y otras enfermedades (Bové, 2006; Gottwald, Graça, & Bassanezi, 2007).



Figura 1. Síntomas de HLB en frutos (deformidad) y en hojas (moteado).

Fuente: Takumasa Kondo (AGROSAVIA)

Caracterización del ciclo de la enfermedad

Tres formas o especies de bacteria han sido asociadas a la enfermedad de HLB: *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus L. asiaticus* y *Candidatus L. americanus*, presente en Brasil (Lafèche & Bové, 1970). El ciclo de infección de la enfermedad se desarrolla a partir del insecto vector conocido como *Diaphorina citri*, que mediante la alimentación es capaz de inocular la bacteria en el floema de la planta (Augier, Gastaminza, Lizondo, Argañaraz, & Willink, 2006).

En el continente americano se presentan *C. Liberibacter asiaticus* y *C. Liberibacter americanus* (Lafèche & Bové, 1970), por lo que son de interés en la presente investigación; ambas generan una obstrucción progresiva del floema por acumulación de almidón (León & Kondo, 2017), lo que dificulta el transporte normal de nutrientes en la planta, genera daños en hojas y frutos, y provoca finalmente la muerte productiva y fisiológica del árbol infectado (Bayer, 2015). El vector infectado continúa su alimentación migrando de árbol a árbol y dejando huevecillos que posteriormente continúan esparciendo la enfermedad en todo el cultivo (Bayer, 2015).

El vector *Diaphorina citri* Kuwayama (psílido asiático de los cítricos)

El HLB o enverdecimiento de los cítricos es una enfermedad bacteriana causada por *C. Liberibacter spp.*, y transmitida por dos especies de insectos: *D. citri*. *T. erytrae* (Hall, 2008), de las cuales solo la primera especie se encuentra en Colombia (León & Kondo, 2017) y está asociada con la transmisión de *C. L.*

asiaticus. El psílido vector se encuentra distribuido en las regiones tropicales y subtropicales. En Suramérica, se ha reportado en Argentina, Brasil, Colombia, Paraguay, Uruguay y Venezuela (Augier et al., 2006; Cermeli, Morales, Perozo, & Godoy, 2007; European and Mediterranean Plant Protection Organization [EPPO], 2006; Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2010).

En Colombia, *D. citri* se reportó por primera vez en 2007 en el departamento de Tolima. Posteriormente, se informó su presencia en los departamentos de Antioquia, Atlántico, Bolívar, Boyacá, Caldas, Casanare, Cauca, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Huila, La Guajira, Magdalena, Meta, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander, Sucre y Valle del Cauca (ICA, 2010; Kondo, Quintero, Campuzano, Wyckhuys, & Heraty, 2012).

Diaphorina citri tiene una extensa lista de plantas hospederas, principalmente en la familia Rutaceae (León & Kondo, 2017). Halbert y Manjunath (2004) registraron 25 géneros de plantas de la familia Rutaceae como los principales hospederos de *D. citri*. En Colombia, se destacan el mirto o murraya (*Murraya paniculata* (L.) Jack) y la swinglea (*Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr.) como las especies que más favorecen la dispersión de *D. citri* (León & Kondo, 2017).

Este insecto pasa por cinco estadios ninfales, que varían en tamaño después de cada muda; el último estadio se caracteriza por presentar los primordios alares de mayor tamaño (García, Ramos, Sotelo, & Kondo, 2016; Hall, 2008). Las ninfas son de color anaranjado amarillo, con esbozos alares (alas pequeñas en formación) abultados y un par de ojos rojos compuestos (EPPO, 2006; García et al., 2016). La duración de los estadios ninfales puede ser de 15 días bajo condiciones adecuadas de temperatura de 28 °C (Martínez-Carrillo, 2016). Las ninfas no transmiten el HLB en el campo, aunque pueden adquirirlo cuando se alimentan en plantas infectadas y después lo transmiten como adultos (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas [Senave], 2013).

Las ninfas del primer instar miden de 0,3 mm de largo y 0,17 mm de ancho, alcanzando 1,6 mm de largo y 1,02 mm de ancho en el quinto instar (Tsai & Liu, 2000) (figura 2a). El patrón de coloración del adulto es característico, con manchas oscuras hacia el borde de las alas y con el centro ligeramente transparente (Hall, 2008). Estos permanecen posados en inclinación de 30-45° sobre ramas y hojas (figura 2b), característica que ayuda a su identificación en el campo (Hall, 2006).

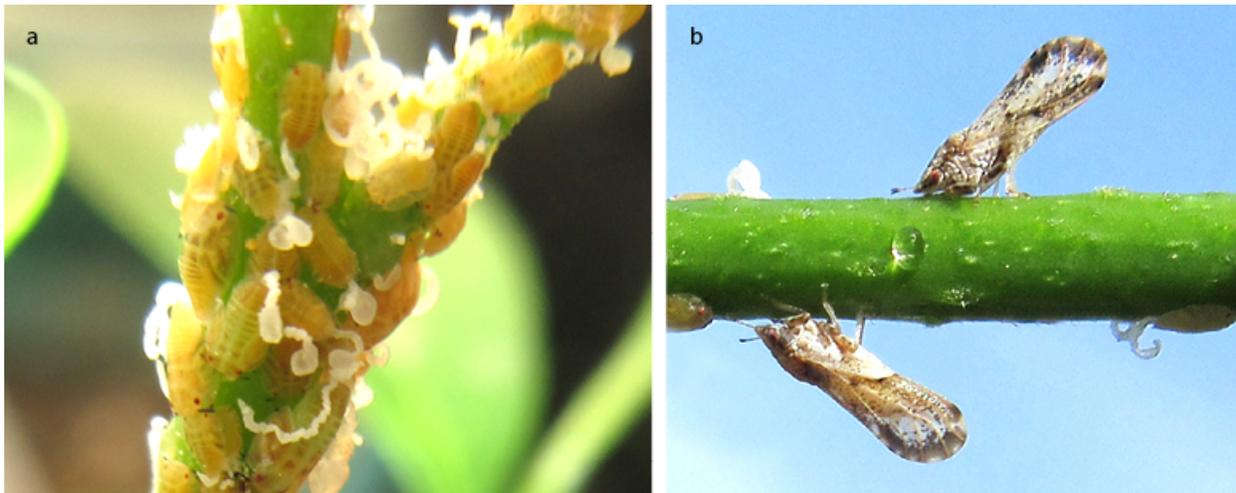


Figura 2. Psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*. a. Ninfas del tercer a quinto instar con sus típicas excreciones cerosas blancas; b. Posición característica de *D. citri* en ángulo de 45°.

Fuente: Takumasa Kondo (AGROSAVIA).

El principal daño que causa *D. citri* está relacionado con la participación del insecto como vector de las especies de bacterias limitadas al floema, responsables de la enfermedad de Huanglongbing (HLB), considerada como la más importante y catastrófica para los cítricos (Alemán, Baños, & Ravelo, 2007; Fonseca, Valera, & Vásquez, 2007; Halbert & Manjunath, 2004; Hall, 2008).

En el Estado de Sinaloa, México, se han detectado cinco especies de depredadores asociados con *D. citri*: las crisopas *Chrysoperla comanche* (Banks) y *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister) (Neuroptera: Chrysopidae), y las mariquitas *Cycloneda sanguinea* (L.), *Olla v-nigrum* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) y el parasitoide *Tamarixia radiata* (Waterston) (Cortez-Mondaca, Lugo-Angulo, Pérez-Márquez, & Apodaca-Sánchez, 2009).

Para el caso de Colombia, un estudio realizado por Kondo et al. (2015) identificó 16 especies de enemigos naturales de *D. citri* distribuidos en seis familias en cinco órdenes. En Ecuador, Chávez et al. (2017) reportan la presencia de dos enemigos naturales de *D. citri*. *Tamarixia radiata* y *Cheilomenes sexmaculata*, que atacan las ninfas del psílido. Para México, Hernández-Fuentes et al. (2014) y Sánchez-González et al. (2015) reportaron cerca de 100 especies de enemigos naturales artrópodos, incluyendo arañas, avispas, coccinélidos, crisópidos, hemípteros y sírfidos. Recientemente, Kondo, González y Guzmán-Sarmiento (2017), con base en literatura científica, presentaron una lista de artrópodos enemigos naturales de *D. citri* compuesta por 101 especies distribuidas en nueve órdenes y 26 familias a nivel mundial.

Agente causal: ‘*Candidatus Liberibacter*’ spp.

En los últimos años, basándose en sus secuencias de 16S ADN_r (ADN ribosómico), tres especies de *C. Liberibacter* han sido aisladas de árboles con la enfermedad: *C. L. asiaticus* y *C. L. americanus* (ambos transmitidos por el psílido cítrico asiático *D. citri*) y *C. L. africanus*, transmitido por el psílido *T. erythrae* (Bové, 2006; Gottwald, 2010). Cada especie de *C. Liberibacter* ha evolucionado en el continente que le da

nombre, presentando los mismos síntomas donde sea que se desarrolle la enfermedad del HLB. Los autores destacan como métodos de detección en laboratorio la hibridación dot blot con sonda de DNA y varios formatos de PCR, y usando iniciadores basados en la secuencia de operón 16S rRNA o rplKAJL-rpoBC (Bové, 2006).

Candidatus L. asiaticus y *C. L. americanus* bloquean los haces vasculares de planta (Lafèche & Bové, 1970), desarrollando uno o más brotes amarillos después de un periodo latente de 6 a 18 meses, mientras que otras partes del árbol permanecen asintomáticas (Belasque et al., 2010). Los árboles afectados tendrán sectores sintomáticos, así como asintomáticos y tal sectorización es prevalente en árboles jóvenes (Belasque et al., 2010).

Materiales y métodos

El estudio se ejecutó mediante un ejercicio de vigilancia tecnológica, proceso estructurado y organizado de búsqueda, captura y análisis de información científica y tecnológica, que permite la identificación de tendencias y toma de decisiones, aplicando la metodología descrita por Orjuela-Garzón, Méndez-Arteaga y Castro (2017), que permitió identificar las tendencias y el desarrollo científico y tecnológico en Colombia y el resto del mundo en relación con los métodos de detección del HLB en campo.

Se siguieron las siguientes etapas: inicialmente, se planteó un objetivo o pregunta clave que orienta todo el ejercicio de búsqueda, en este caso fue “identificar las tendencias científicas y tecnológicas en la detección temprana del Huanglongbing (HLB)”; después, se definieron los tesauros (palabras clave) (tabla 1), para posteriormente proceder a la construcción de dos fórmulas de búsqueda, a partir de las cuales se recuperan los registros relacionados de artículos científicos y patentes en las bases de datos Scopus y PatentScope, respectivamente; estos registros fueron descargados en formato plano (archivos estructurados) para proceder a la etapa de análisis de datos (figura 3).

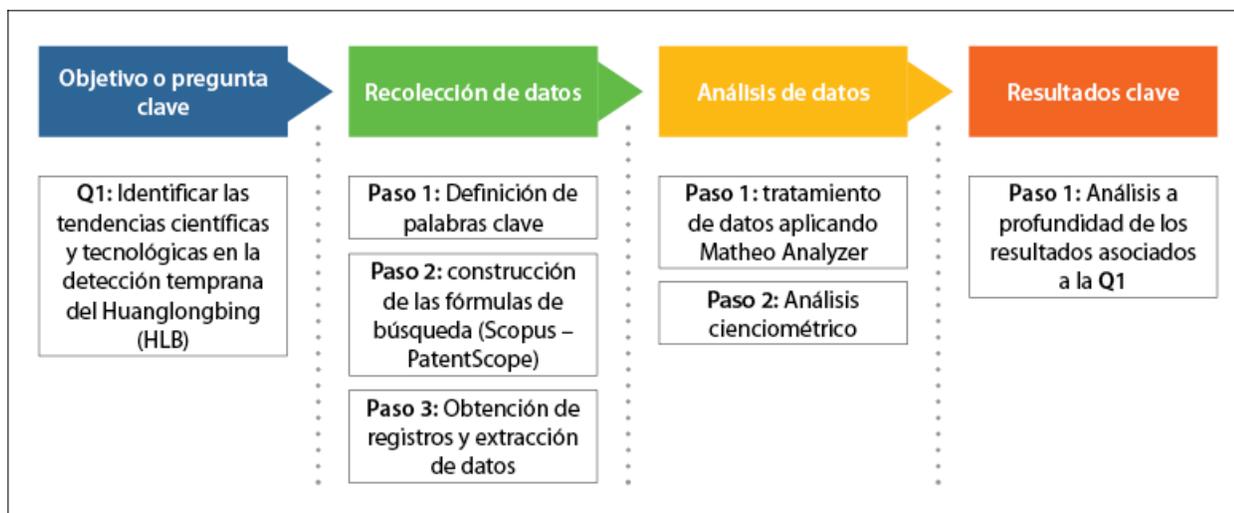


Figura 3. Metodología general implementada.

Fuente: Elaboración propia

Para la etapa de análisis de datos, tanto en el caso de artículos científicos como de patentes, la información provista por la fase anterior fue tratada a través del *software* especializado Matheo Analyzer, versión 3.2, que permite realizar un análisis de las métricas a nivel de autores, instituciones, países y producción a través del tiempo, entre otras, mediante la extracción refinada de todos los campos de análisis de los registros obtenidos y su síntesis a través de representaciones gráficas como histogramas. Matheo Analyzer permite la importación de todo tipo de ficheros estructurados (formato bibliográfico, formato de valores separados por comas CSV, entre otros), provenientes de bases de datos públicas o privadas como Esp@cenet, PubMed, Questel-Orbit, Dialog, stn, Scopus, Clarivate, y extraer de forma fácil información particularmente relevante, en campos con multicriterios o multiinformación.

El fichero estructurado o archivo plano se importa al Matheo Analyzer, y se definen las reglas de extracción; posteriormente, se realiza una limpieza y agrupación de datos, según corresponda para preparar los datos para el análisis cuantitativo, en cuya fase se construyen representaciones gráficas de las métricas antes expuestas, empleando histogramas, matrices, redes o clústeres; finalmente, se exportan los resultados en diferentes formatos (figura 4).



Figura 4. Proceso de análisis de datos empleando Matheo Analyzer.

Fuente: Elaboración propia

Como punto de partida se establecen las palabras clave o tesauros de búsqueda (Orjuela-Garzón, Perilla-Maluche, Andrade-Navia, & Quintero-Bonilla, 2019); en este caso, los tesauros fueron agregados en tres grupos: el primero relacionado con la enfermedad; el segundo relacionado con los cítricos, y un tercer grupo orientado al objetivo de la búsqueda que es la detección.

Tabla 1. Palabras clave para la consulta de búsqueda

Grupo 1 Huanglongbing - "citrus greening" - "greening disease*" - "yellow shoot" - "Diaphorina citri" - "citrus psyllid" - "Candidatus Liberibacter"
Grupo 2 "citrus tree*" - "citrus plant*" - "Citrus fruit*"
Grupo 3 detection - diagnostic - identif*

Fuente: Elaboración propia

A partir de estos grupos de palabras se diseñó una fórmula de búsqueda para la base de datos Scopus, teniendo en cuenta un periodo de 10 años (Andrade-Navia, Ramírez-Plazas, & Orjuela-Garzón, 2018). Los campos de búsqueda seleccionados para la recuperación de la literatura científica fueron Título (TITLE), Resumen (ABS), Palabras Clave (KEY) y periodo de publicación (PUBYEAR). La fórmula de búsqueda se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2 . Fórmula de búsqueda para artículos científicos

```
((( ( ( ( TITLE-ABS-KEY ( huanglongbing ) ) OR ( TITLE-ABS-KEY ( "citrus greening" ) ) OR ( TITLE-ABS-KEY ( "greening disease*" ) ) OR ( TITLE-ABS-KEY ( "yellow shoot" ) ) ) ) ) OR ( ( ( TITLE-ABS-KEY ( "Diaphorina citri" ) ) OR ( TITLE-ABS-KEY ( "citrus psyllid" ) ) ) ) ) OR ( TITLE-ABS-KEY ( "Candidatus Liberibacter" ) ) ) AND ( ( TITLE-ABS-KEY ( "citrus tree*" ) ) OR ( TITLE-ABS-KEY ( "citrus plant*" ) ) OR ( TITLE-ABS-KEY ( "Citrus fruit*" ) ) ) ) AND ( TITLE-ABS-KEY ( detection ) OR TITLE-ABS-KEY ( diagnostic* ) OR TITLE-ABS-KEY ( identif* ) ) ) PUBYEAR > 2006
```

Fuente: Elaboración propia

Para el caso de búsqueda de patentes en la base de datos Patentscope, se diseñó una fórmula de búsqueda empleando los tesauros definidos en la tabla 1; además, los campos de búsqueda seleccionados para la recuperación de registros fueron título (TI) y resumen (AB) (Orjuela, Andrade, Cardona, Peralta, & Mendez, 2019). En ambos casos se empleó el inglés como idioma de recuperación y no se limitó por periodo de tiempo. La fórmula de búsqueda se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Fórmula de búsqueda para patentes

```
((EN_TI:huanglongbing OR EN_AB:huanglongbing) OR (EN_TI:"citr* greening" OR EN_AB:"citr* greening") OR (EN_TI:"greening disease*" OR EN_AB:"greening disease*") OR (EN_TI:"yellow shoot" OR EN_AB:"yellow shoot") OR (EN_TI:"Diaphorina citri" OR EN_AB:"Diaphorina citri") OR (EN_TI:"Candidatus Liberibacter" OR EN_AB:"Candidatus Liberibacter"))
```

Fuente: Elaboración propia

Resultados y discusión

Análisis cuantitativo

La dinámica de publicación científica en un estudio de vigilancia tecnológica juega un papel importante, ya que permite identificar las tendencias y el grado de avance de investigación en un tema determinado. En este caso se encontraron 164 documentos científicos para el periodo 2007-2018, durante el cual se observa un comportamiento fluctuante en el número de publicaciones, con tendencia positiva. Esto indica que es un área de conocimiento aún emergente. Estos artículos fueron publicados en diferentes revistas de gran impacto, dentro de las que se destacan *PlosOne*, *Phytopathology*, *Plant Disease*, *Computers and Electronics in Agriculture* y *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (figura 5).

Los autores que se destacan pertenecen principalmente a instituciones de los Estados Unidos y China. Entre los principales se encuentran Won Suk Lee, con 11 documentos, seguido por Yong Duan, con 9 documentos publicados, Reza Ehsani, con 8 documentos, y Lukasz Stelinski, con 7 documentos. Hong Lin, con 6 documentos, es el único autor en este listado que no pertenece a Estados Unidos, teniendo como afiliación un laboratorio de seguridad alimentaria en China (figura 5).

Las instituciones de mayor representatividad son la Universidad de Florida y a el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). La Universidad de Florida se ha dedicado en los años más recientes a investigar sobre la detección de la enfermedad mediante mecanismos de agricultura de precisión. Por otro lado, la USDA ha desarrollado diferentes estudios de detección del Huanglongbing mediante técnicas moleculares, además de tratamiento mediante fungicidas y suplementos microbiológicos para contrarrestar los síntomas y aspectos de la biología de la bacteria para el entendimiento de la enfermedad (figura 5).

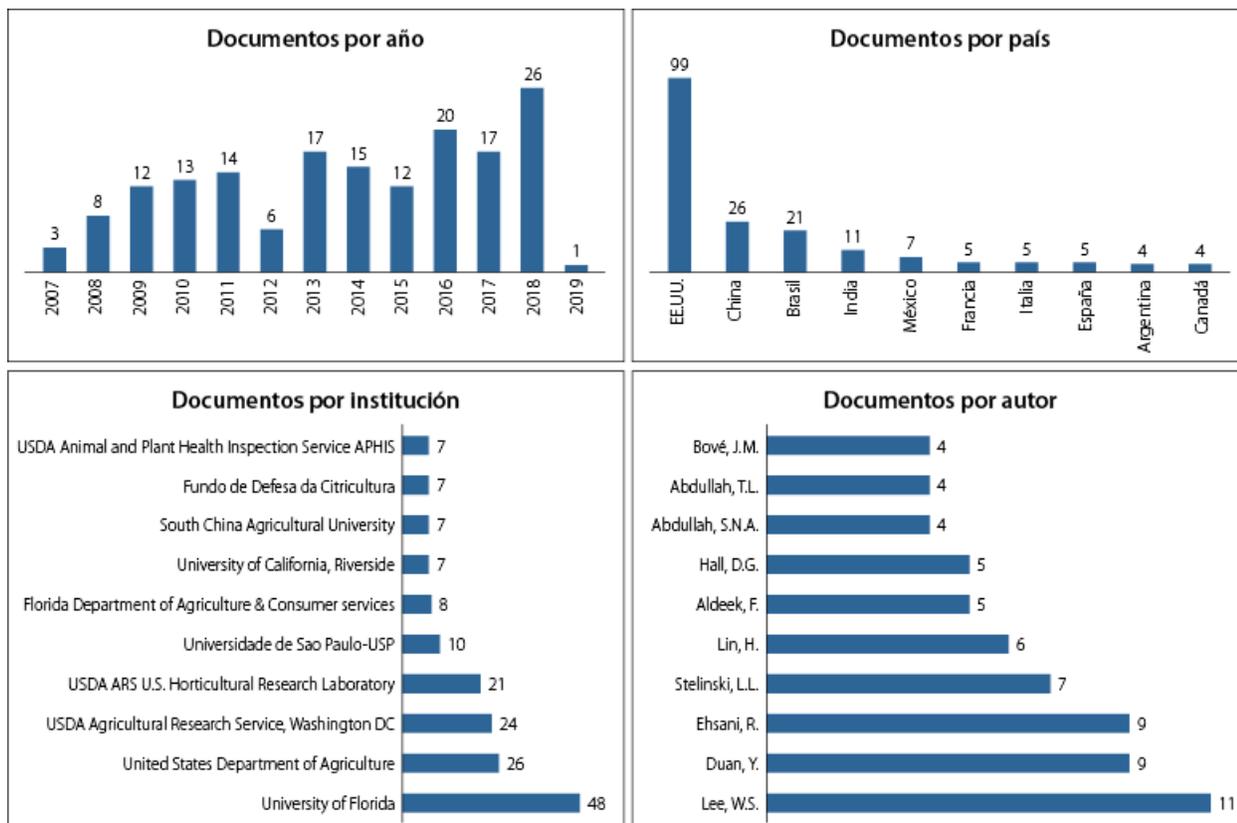


Figura 5. Análisis cuantitativo de los métodos de detección del HLB.

Fuente: Elaboración propia

Tendencias mundiales en métodos de detección del HLB en campo

Tomando en consideración que en la actualidad no hay tratamiento para esta enfermedad, los esfuerzos se están enfocando en la detección temprana de los síntomas en los árboles utilizando sistemas de visión computarizada (Cubero et al., 2016), para lo cual se han desarrollado las siguientes tecnologías:

Espectroscopia de fluorescencia inducida por láser (Portátil LIFS-405)

Esta es una metodología que emplea un sistema de espectroscopia de fluorescencia inducida por láser portátil (LIFS-405) y herramientas estadísticas, capaz de identificar no solo hojas sintomáticas de HLB en el campo, sino también árboles asintomáticos (Ranulfi et al., 2016). Esta herramienta es más usada en medicina, ya que puede proporcionar información útil respecto a la concentración y a las propiedades físico-químicas de algún sustrato biológico y, eventualmente, podría servir como herramienta de diagnóstico para HLB.

Espectroscopía de ruptura inducida por láser

Este es un método óptico que se basa en la generación de plasma a través de la ablación láser para el análisis espectroscópico de su emisión (Rao et al., 2018). El Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) ha sido implementado inicialmente para la identificación del HLB en México y China, obteniendo la columna de plasma directamente de la epidermis de las frutas (Rao et al., 2018). La novedad de este método radica en la toma de huellas de registros de plantas sanas y enfermas en función de sus componentes orgánicos e inorgánicos, además del uso de un láser de múltiples pulsos junto con un microscopio para tomar espectros del floema de plantas (Ponce, Etxeberria, González, Ponce, & Flores, 2018).

Espectrometría infrarroja transformada de Fourier

Esta técnica, junto con una sonda de muestreo de reflexión total atenuada (ATR), ha demostrado ser eficaz para detectar enfermedades en plantas (Gandolfo, Mortimer, Woodhall, & Boonham, 2016). Gandolfo et al. (2016) afirman que el uso de otras regiones del espectro electromagnético está limitado por una serie de factores. En la región ultravioleta (UV) (10-400 nm), la radiación solar es fuertemente atenuada por la clorofila y los carotenoides, lo que resulta en una fuerte absorción. En la región espectral del infrarrojo cercano (NIR), la alta reflectancia de las células mesófilo-esponjosas en el interior o la parte inferior de las hojas da lugar a la aparición de fuertes rayos de reflexión. En las ondas de onda corta (SWIR) a longitudes de onda (1200-2500 nm), la respuesta está fuertemente influenciada por el contenido de agua, la celulosa y las concentraciones de lignina, así como otros componentes bioquímicos (Curran, 1989).

Al comparar hojas sanas contra hojas infectadas en laboratorio con *C. Liberibacter asiaticus* y *C. Liberibacter africanus*, usando espectrometría infrarroja transformada de Fourier, las diferencias marcadas entre los espectros sanos y enfermos se encuentran en 960 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} , 1109 cm^{-1} , 1154 cm^{-1} , 1225 cm^{-1} , 1385 cm^{-1} , 1462 cm^{-1} , 1740 cm^{-1} , 2882 cm^{-1} , 2982 cm^{-1} y 3650 cm^{-1} .

Espectroscopía de Raman

Esta es una técnica óptica no invasiva, fácil de llevar a cabo y que solo requiere una configuración muy compacta, lo que significa que puede ser portátil (Pérez et al., 2016). Esta técnica mide la dispersión de luz inelástica basada en una fuente monocromática, proporcionando información sobre la composición química del objeto analizado (Pérez et al., 2016).

La espectroscopía Raman combinada con un análisis estadístico de los espectros resultantes, a partir de análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante lineal (LDA), ha mostrado una sensibilidad del 86,9 % (porcentaje de positivos, que se identificaron correctamente), una especificidad del 91,4 % (porcentaje de negativos, que se identificaron correctamente) y una precisión del 89,2 % (proporción de todas las pruebas que son correctas) (Pérez et al., 2016). Las anomalías espectrales en naranjos HLB-positivos, en bandas relacionadas con carbohidratos, fueron 905 cm^{-1} , 1043 cm^{-1} , 1127 cm^{-1} , 1208 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , 1272 cm^{-1} , 1340 cm^{-1} , y $1260\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$.

Imágenes polarizadas

Haciendo uso del principio de acumulación de almidón en las hojas de los cítricos infectadas (Pourreza & Lee, 2014), se utiliza un sensor de visión desarrollado para el propósito de detección en tiempo real del HLB en condiciones de campo. El sensor detecta la infección directamente sobre la copa del árbol mediante una cámara monocromática altamente sensible (Pourreza, Lee, Ehsani, Schueller, & Raveh, 2015).

Espectroscopia del infrarrojo cercano-visible VIS-NIR e imágenes térmicas

Sankaran et al. (2013) demostraron la aplicabilidad de esta técnica, además de imágenes térmicas para la detección de HLB en árboles de cítricos. Tres cámaras (dos multiespectrales de seis bandas y una térmica), montadas sobre el mástil de un vehículo, se utilizaron para adquirir las imágenes. Las cámaras multiespectrales se configuran para obtener imágenes en 12 bandas en el rango de 440 nm a 990 nm. El análisis de datos reveló que los valores promedio de reflectancia de los árboles sanos en la región visible eran más bajos que los de la región del infrarrojo cercano, mientras que lo contrario ocurría con los árboles infectados con HLB (bandas de ondas tales como 560 nm y 710 nm tenían buena separabilidad en regiones espectrales de infrarrojo cercano visible). Se observa también que la reflectancia espectral promedio en la región infrarroja térmica fue mayor en las copas infectadas con HLB que en las copas sanas (Sankaran et al., 2013).

Imágenes multibanda

García-Ruiz, Sankaran, Maja, Lee, Rasmussen y Ehsani (2013) examinaron imágenes aéreas de un área específica de interés, utilizando un vehículo no tripulado o dron y una aeronave equipadas con una cámara de alta resolución, con sensores de imagen multibanda entre 530 y 900 nm, ajustando la resolución deseada de acuerdo con la altitud de vuelo.

Se encontró que la reflectancia de 710 nm y los valores del índice NIR eran significativamente diferentes entre los árboles sanos y los infectados por HLB, por lo que los autores concluyen que la detección aérea de alta resolución tiene buenas perspectivas para la detección de árboles infectados por HLB (García-Ruiz et al., 2013).

Factores de cambio tecnológico en el mediano y corto plazo

Dentro de los factores de cambio, o factores que determinaran la evolución de la tecnología en el futuro cercano en cuanto a los métodos de detección temprana para el HLB, se identificaron cuatro tendencias de interés mediante el análisis a profundidad de los 164 registros obtenidos en la base de datos Scopus para el periodo de 2007-2018: detección electroquímica, detección molecular rápida, tratamiento térmico y prevención mediante películas plásticas de bloqueo UV (tabla 4).

Tabla 4. Referencias consultadas asociadas a cada tendencia

Categoría de las tecnologías	Tendencias asociadas	Referencia
Detección rápida o temprana	Detección electroquímica	Volkov y Brown (2014)
	Detección molecular rápida	Rigano et al. (2014) Russell, McOwen, Bohannon, Amato, y Bohannon (2015)
Prevención	Prevención mediante películas	Miranda, Dos Santos, Felipe, Moreno, y Fereres (2015)
Tratamiento y control	Tratamiento térmico	Al-Jumaili y Ehsani (2015)

Fuente: Elaboración propia

Detección electroquímica

El HLB induce una disminución muy fuerte en la amplitud de la diferencia de potencial eléctrico en un árbol o en una fruta. Volkov y Brown (2014) utilizaron un método no-disruptivo que consistía en un sistema de adquisición de datos interconectado a un computador y electrodos reversibles idénticos no polarizables conectados a los árboles, para la medición del potencial eléctrico y la detección del HLB en el tejido. La amplitud y el tiempo de dependencia de la diferencia de potencial eléctrico registrado en una hoja, tallo o fruta fueron sensibles a la salud del árbol. Aquellos infectados presentan una diferencia de potencial de señal de corriente continua (DC) muy baja en comparación con los sanos. Según Volkov y Brown (2014), este método electrofisiológico permite la detección rápida del HLB y podría utilizarse para la detección de otras enfermedades en plantas.

Detección molecular rápida

Rigano et al. (2014) desarrollaron un estudio en el que se adaptó una técnica de amplificación de ADN conocida como Amplificación Isotérmica Mediada por lazo (LAMP, por sus siglas en inglés) para la detección de *C. L. asiaticus*. Esta metodología se combinó con un dispositivo de varilla de flujo lateral para la detección visual de las ampliaciones resultantes, eliminando la necesidad de realizar la electroforesis en gel de agarosa para la visualización del resultado. El ensayo fue altamente específico para la bacteria de interés. Mediante la dilución en serie del ADN purificado de una planta infectada, se encontró que la sensibilidad del ensayo era de 10 picogramos. Además, se demostró que este nivel de sensibilidad era similar a los valores obtenidos ejecutando una PCR en tiempo real en paralelo (Rigano et al., 2014). Esta metodología fue capaz de detectar *C. L. asiaticus* de diferentes tipos de muestras, incluyendo plantas de cítricos infectados y psíidos (Rigano et al., 2014).

El HLB es una enfermedad que tiene un largo periodo de incubación, durante el cual el patógeno está en baja concentración y no está sistemáticamente distribuido (Gottwald, 2010), por lo que se dificulta el diagnóstico y la erradicación (Bayer, 2015).

Russell et al. (2015), como investigadores de la empresa Agdia, han desarrollado una nueva y rápida técnica molecular, AmplifyRP®, que permite la detección al nivel de la PCR en cuestión de minutos y en campo. AmplifyRP® utiliza una metodología con base en la polimerasa recombinasa para la amplificación del ADN a una sola temperatura. En contraste con la PCR convencional o en tiempo real, AmplifyRP® no

tiene requerimientos de purificación de ADN, ni termociclado. Los resultados se pueden leer usando dispositivos pequeños y fáciles de usar, además de eliminar la necesidad de utilizar equipos costosos de PCR y de personal técnicamente capacitado, y reducir el número de reactivos químicos (Russell et al., 2015).

Dada sus características, AmplifyRP® se potencia como una herramienta ideal para monitorear la progresión de HLB mediante la detección temprana de *C. Liberibacter* spp. en árboles de cítricos o en insectos vectores (Russell et al., 2015).

Tratamiento térmico

Al-Jumaili y Ehsani (2015) desarrollaron un mecanismo móvil de tratamiento térmico que consistió en un sistema de recubrimiento de árboles unido a un camión de transporte de cítricos, un generador de vapor portátil, un tanque de agua, una bomba de suministro de agua y un generador eléctrico. El lote se cubre con una lona de plástico opaco relativamente resistente al calor para cubrir completamente un área de aproximadamente 14 m³ de volumen (Al-Jumaili & Ehsani, 2015). El vapor se suministra desde un generador portátil, que se carga en la parte trasera del camión de transporte y los árboles son vaporizados a diferentes temperaturas y en diferentes duraciones de 0-6 min (Al-Jumaili & Ehsani, 2015). Los autores indican que el aparato es simple en diseño y eficiente para uso en el campo, aunque advierten que el efecto a largo plazo del tratamiento térmico todavía se encuentra en investigación.

Bloqueo de rayos UV

La visión, el comportamiento y el rendimiento de las plagas de insectos pueden manipularse utilizando materiales de bloqueo (UV). Por eso Miranda et al. (2015) desarrollaron un estudio con el objetivo de evaluar cómo las películas plásticas que bloquean los rayos UV podían afectar el despegue y la capacidad de localización de la planta huésped de *D. citri*. Para evaluar dicho efecto, se liberaron psílidos adultos de un vial dentro de un asiento cubierto por una película de bloqueo UV o estándar (control) y el número de insectos restantes en cada vial bajo cada tratamiento fue contabilizado en diferentes intervalos de tiempo (Miranda et al., 2015). Se observó que se interrumpe la capacidad de localización de *D. citri* de la planta huésped en un ambiente de deficiente UV (Miranda et al., 2015). De esta forma, los resultados muestran que los materiales de bloqueo de UV podrían convertirse en una estrategia valiosa para el manejo integrado de *D. citri* y HLB en cítricos cultivados en entornos cerrados (Miranda et al., 2015).

Avances en el desarrollo tecnológico en HLB

Haciendo uso de un formula de búsqueda de la tabla 3, se exploró la base de datos PatentScope, encontrando que se han registrado 234 patentes para todos los años disponibles en esta. La dinámica de registro a través de los años mostró un crecimiento constante, siendo el 2017 el año con mayor número de patentes (58). Estas fueron registradas principalmente en China, Estados Unidos y vía Patent Cooperation Treaty (PCT), siendo Huaichun Li el principal inventor con patentes.

La revisión evidenció que las tres principales instituciones que poseen los derechos sobre las patentes son Bayer Crop Science, la Fundación de investigación de la Universidad de Florida, el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias y La Universidad Agrícola del sur de China (figura 6).

Finalmente, al revisar las distintas familias de patentes (subclases) según la Clasificación Internacional de Patentes (CIP), las principales áreas bajo las cuales se han patentado las invenciones en relación con HLB son los pesticidas, biocidas, compuestos antimicrobianos y la utilización de enzimas y microorganismos (ingeniería genética) para evitar la proliferación de organismos indeseados; las áreas donde se encuentran mayor número de registros son A01N 57/12, A01P 1/00, C12N 15/82.

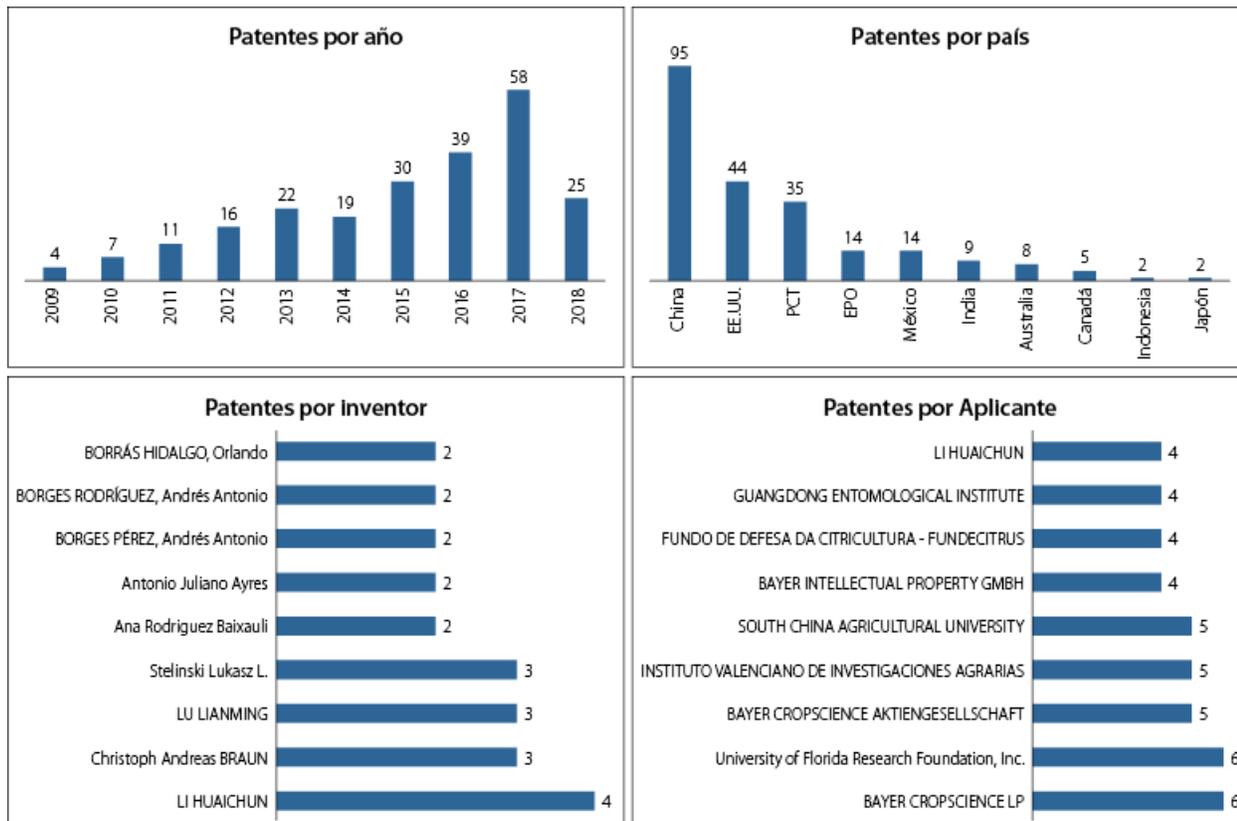


Figura 6. Análisis del desarrollo tecnológico de HLB
Fuente: Elaboración propia

Patentes destacados

Método de detección LAMP para la detección rápida de Candidatus Liberibacter asiaticus

Solicitante: Inspection and Quarantine Comprehensive Technology Center, Jiangxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau.

Inventores: Huang Lili, Li Yin, Zhu Jianxin, Luo Taopeng y Liu Ying.

La invención CN105524986 (2015) describe el método LAMP para la detección rápida de *C. L. asiaticus*. El método comprende los siguientes pasos: (1) diseño de cuatro cebadores específicos de LAMP mediante la adopción de 16S rDNA de *C. L. asiaticus* como gen diana; (2) extracción de ácido nucleico total de la

lámina de cítricos mediante la adopción de una tecnología CTAB; y (3) detección de la especificidad del método LAMP.

El método tiene las ventajas de ser simple, sencillo y económico, dado que requiere pocos dispositivos, además de ser rápido y preciso. Es especialmente adecuado para el cribado primario a gran escala de *C. L. asiaticus*, proporcionando una nueva forma de detección y control.

Método de detección en campo de la enfermedad de brotes amarillos de los cítricos en el espectro infrarrojo cercano

Solicitantes: South China Agricultural University

Inventores: Zeng Xinnian, Chen Dongmei y Wang Huatang

La invención CN106018332 (2016) describe un método de detección en campo del HLB en el espectro infrarrojo cercano. El método incluye los siguientes pasos: (1) se adopta un espectrómetro portátil infrarrojo cercano para detectar y leer directamente datos de espectroscopía del infrarrojo cercano de hojas de plantas de cítricos infectadas con la bacteria y plantas sin la enfermedad en campo; (2) establecimiento de un modelo de juicio de clasificación cualitativa: los datos de espectroscopía de infrarrojo cercano en la etapa 1 se someten a corrección y preprocesamiento y, luego, se extraen los valores característicos de su espectroscopía de infrarrojo cercano y se establece un modelo de evaluación cualitativa de clasificación de cuadrados mínimos parciales (análisis discriminante) (PLS-DA); (3) aplicación del método de clasificación cualitativo a muestras desconocidas: el modelo de A establecido en el paso 2 se utiliza para distinguir si las muestras de hojas de cítricos se infectaron o no con la bacteria en campo. Para el escaneo solo se necesitan entre 3 y 5 hojas, y se puede lograr un diagnóstico rápido en solo 1 o 2 minutos. Además de ser simple, rápido y preciso, este método no produce ningún daño a las muestras y es amigable con el ambiente.

Conclusiones

El primer paso para un control efectivo de la propagación del HLB es la detección temprana y precisa de la enfermedad. Herramientas de la agricultura de precisión como los sistemas de visión automatizados se promulgan como alternativas de gran potencial para el monitoreo permanente de los cultivos desde la siembra hasta la cosecha. Dichos sistemas pueden ser utilizados para detección de árboles de cítricos infectados con HLB, siempre y cuando se tengan en cuenta algunos parámetros como múltiples mediciones por árbol y la selección de la banda espectral adecuada. Sin embargo, la evaluación de síntomas presenta una enorme dificultad en la detección temprana, ya que una planta puede tardar seis meses o más en presentar los síntomas del HLB (Belasque et al., 2010).

Estados Unidos y China son los países que presentan más interés en el tema relacionado, siendo el primero de ellos quien ha aportado el mayor número de documentos científicos (99 artículos científicos). China presenta, por otra parte, el mayor número de patentes (95 patentes). Dentro de la revisión, se destacan la Universidad de Florida y la USDA como instituciones líderes en investigación.

La Universidad de Florida se ha enfocado en temas de detección temprana de la enfermedad, mediante mecanismos de agricultura de precisión en los últimos años, lo que ha permitido realizar detección del HLB de forma no invasiva para el cultivo en campo. Esto refleja el especial interés de esta institución en desarrollar esta área de investigación.

La producción tecnológica de Bayer Crop Science, como líder en desarrollo de patentes para fines comerciales, consiste en productos para reducir infecciones bacterianas en cítricos. En la producción científica de América Latina, se destacan Brasil, México y Argentina con 21, 7 y 4 artículos científicos, respectivamente. Para Colombia se reportan 2 artículos científicos relacionados con métodos de extracción de ADN y validación de PCR en tiempo real para la detección de HLB.

En el área molecular, se desarrollan temas de investigación en detección a través de la amplificación del ADN por PCR, siendo esta la técnica más utilizada en el diagnóstico del HLB. Es a partir de esta que se desarrollan otras investigaciones que permiten tener un resultado confiable, más rápido y que requieren personal altamente capacitado. Algunas de las propuestas son la utilización de sondas moleculares y la amplificación isotérmica mediante AmplifyRP®.

La aplicación de métodos de luz polarizada puede ofrecer una herramienta económica de detección. Sin embargo, ha de considerarse su aplicación en Colombia, dado que se ha determinado la presencia de fisiopatías (Ríos-Rojas, Correa, Rojas-Marín, & Dorado-Guerra, 2018) que muestran como síntoma un moteado en las hojas similar al que se genera por efecto del HLB, dificultando el uso de estas metodologías de teledetección. Por lo tanto, deben definirse claramente los cambios bioquímicos que influyan en la absorbancia, transmitancia y reflectancia de la luz, para plantas con estrés hídrico severo, plantas con la fisiopatía en mención y en su contraste lo reportado en la literatura relacionado con HLB. Esto podrá ser posible en tanto se defina el tipo de sensor y las respuestas espectrales que puedan diferenciar entre estas enfermedades.

Por otra parte, además de las técnicas de diagnóstico temprano se recomienda el desarrollo de estrategias relacionadas con el monitoreo del vector, así como la distribución de hospederos. Esta tarea puede apoyarse en los Sistemas de Información Geográfica que ofrecen, además de instrumentos de geolocalización, herramientas espaciales que correlacionan variables y permiten tomar decisiones en el momento de hacer vigilancia y muestreos.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a los doctores Alma Constanza Plaza Tovar y Simón Harrison Bustos Torres, funcionarios de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Seguridad Alimenticia de la Gobernación del Tolima y Supervisores del proyecto, quienes propusieron la realización del Estudio al Comité Regional Citrícola del Tolima, instancia que permitió su presentación a los productores y, finalmente, a los expertos María Bermúdez Cardona y Angélica Sandoval, docentes de la Universidad del Tolima, y a Jairo García L. Funcionario de AGROSAVIA, a quienes agradecemos sus aportes valiosos. Al Editor en Jefe y los evaluadores anónimos por tomarse el tiempo de revisar el manuscrito y proponer mejoras valiosas en el mismo.

Descargos de responsabilidad

Todos los autores realizaron aportes significativos al documento, están de acuerdo con su publicación y manifiestan que no existen conflictos de interés en este estudio.

Referencias

- Abdullah, T. L., Shokrollah, H., Sijam, K., & Akmar, S. N. (2009). Control of Huanglongbing (HLB) disease with reference to its occurrence in Malaysia. *Journal of Biotechnology*, 8(17), 4007-4015. <https://doi.org/10.5897/AJB09.678>
- Al-Jumaili, A., & Ehsani, R. (2015). Mobile batch heat treatment system for treating HLB-infected citrus trees. En *2015 asabe International Meeting*, 152190319. <https://doi.org/10.13031/aim.20152190319>.
- Alemán, J., Baños, H., & Ravelo, J. (2007). *Diaphorina citri* y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Revista de Protección Vegetal*, 22(3), 154-165.
- Andrade-Navia, M., Ramírez-Plazas, E., & Orjuela-Garzón, W. A. (2018). Vigilancia tecnológica aplicada a la cadena productiva de cacao. *Espacios*, 39(9), 1-11.
- Augier, L., Gastaminza, G., Lizondo, M., Argañaraz, M., & Willink, E. (2006). Presencia de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) en el noroeste argentino (noa). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 65(3-4), 67-68. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0373-56802006000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- Badaracco, A., Redes, F. J., Preussler, C. A., & Agostini, J. P. (2017). Citrus Huanglongbing in Argentina: detection and phylogenetic studies of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Australasian Plant Pathology*, 46(2), 171-175. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0473-4>.
- Bayer. (2015). Yellow dragon in the orange grove: Dangerous bacterial infection is destroying entire citrus plantations. *Research The Bayer Scientific Magazine*, 28, 44-47.
- Belasque, J., Bassanezi, R. B., Yamamoto, P. T., Ayres, A. J., Tachibana, A., Violante, A. R., Tank, A., Di Giorgi, F., Tersí, F. E. A., Menezes, G. M., Dragone, J., Jank, J. Bové, J. M. (2010). Lessons from huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 285-302. <https://doi.org/10.4454/jpp.v92i2.171>.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7-37. <http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/828/615>
- Cermeli, M., Morales, P., Perozo, J., & Godoy, F. (2007). Distribución del psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera, Psyllidae) y presencia de *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera, Eulophidae) en Venezuela. *Entomotropica*, 22(3), 181-184. <http://entomotropica.org/index.php/entomotropica/article/viewFile/213/247>
- Chávez, Y., Chirinos, D. T., González, G., Lemos, N., Fuentes, A., Castro, R., & Kondo, T. (2017). *Tamarixia radiata* (Waterston) and *Cheilomenes sexmaculata* (Fabricius) as biological control agents of *Diaphorina citri* Kuwayama in Ecuador. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77(2), 180-184. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000200180>.
- Cortez-Mondaca, E., Lugo-Angulo, N. E., Pérez-Márquez, J., & Apodaca-Sánchez, M. Á. (2009). Primer reporte de enemigos naturales y parasitismo sobre *Diaphorina citri* Kuwayama en Sinaloa, México. *Southwestern Entomologist*, 35(1), 113-116. <https://doi.org/10.3958/059.035.0113>
- Cubero, S., Lee, W. S., Aleixos, N., Albert, F., & Blasco, J. (2016). Automated systems based on machine vision for inspecting citrus fruits from the field to postharvest-a Review. *Food and Bioprocess Technology*, 9(10), 1623-1639. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1767-1>

- Curran, P. J. (1989). Remote sensing of foliar chemistry. *Remote Sensing of Environment*, 30(3), 271-278. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(89\)90069-2](https://doi.org/10.1016/0034-4257(89)90069-2)
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2006). *Data Sheets on Quarantine Pests: Diaphorina citri*. https://www.eppo.int/QUARANTINE/data_sheets/insects/DIAACI_ds.pdf
- Fonseca, O., Valera, N., & Vásquez, C. (2007). Registro y ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera#: Psyllidae) en tres hospederos en el estado Lara, Venezuela. *Entomotropica*, 22(3), 145-152.
- Gandolfo, D. S., Mortimer, H., Woodhall, J. W., & Boonham, N. (2016). Fourier transform infra-red spectroscopy using an attenuated total reflection probe to distinguish between Japanese larch, pine and citrus plants in healthy and diseased states. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 163, 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.03.022>
- Garcés-Giraldo, L. F. (Ed.). (2012). *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*. http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_211_Publicacion-CitricosCultivoPoscosechaeIndustrializacion.pdf
- García, Y., Ramos, Y. P., Sotelo, P. A., & Kondo, T. (2016). Biología de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) bajo condiciones de invernadero en Palmira, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 42(1), 36-42.
- García-Ruiz, F., Sankaran, S., Maja, J. M., Lee, W. S., Rasmussen, J., & Ehsani, R. (2013). Comparison of two aerial imaging platforms for identification of Huanglongbing-infected citrus trees. *Computers and Electronics in Agriculture*, 91, 106-115. <http://doi.org/10.1016/j.compag.2012.12.002>
- Gottwald, T. R., Graça, J. V. da, & Bassanezi, R. B. (2007). Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 8(1), 31. <https://doi.org/10.1094/PHP-2007-0906-01-RV>
- Gottwald, T. R. (2010). Current epidemiological understanding on citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 119-139. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114418>
- Halbert, S., & Manjunath, K. L. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *The 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)
- Hall, D. G. (2006). A closer look at the vector: controlling the asian citrus psyllid is a key to managing citrus greening. *Citrus & Vegetable Magazine*, 70(5), 24-46.
- Hall, D. G. (2008). Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. In *Proceedings of the 1 taller international sobre Huanglongbing de los cítricos (Candidatus Liberibacter spp.) y el psílido Asiático de los cítricos (Diaphorina citri)* (pp. 1-11). Sonora.
- Hernández-Fuentes, L. M., Urías-López, M. A., Gómez-Jaimes, R., López-Arroyo, J. I., Velázquez-Monreal, J. J., & Orozco-Santos, M. (2014). *El Huanglongbing y su vector Diaphorina citri en limón persa en Nayarit: Recomendaciones para su manejo. Libro Técnico 3*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Inifap), Centro de Investigación Regional Pacífico Centro, Campo Experimental Santiago Ixcuintla.
- Hemmungs-Wirtén, E. (2015). The Patent and the Paper: A few thoughts on late modern science and intellectual property. *Culture Unbound*, 7, 600-609. <https://doi.org/10.3384/cu.2000.1525.1573600>
- Huang, L., Li, Y., Zhu, J., Luo, T., & Liu, Y. (2015). *CN105524986*. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=CN173419212>
- Iftikhar, Y., Rauf, S., Shahzad, U., & Zahid, M. A. (2016). Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management – A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.04.006>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2010). *Situación actual de HLB (Huanglongbing) y su vector el psílido asiático de los cítricos (Diaphorina citri Kuwayama) en Colombia*. http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-Agricola/BOLETINES/Nacionales/2010/BN_Diaphorina_2010.aspx
- Knapp, J. L., Halbert, S., Lee, R., Hoy, M., Clark, R., & Kesinger, M. (2004). *Asian citrus psyllid and citrus greening disease*. http://ipm.ifas.ufl.edu/Agricultural_IPM/asian.shtml

- Kondo, T., Gonzales, G., & Guzman-Sarmiento, Y. C. (2017). Enemigos naturales de *Diaphorina citri*. En *Protocolo de cría y liberación de Tamarixia radiata Waterston (Hymenoptera: Eulophidae)*. (pp. 23–32). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Kondo, T., González F., G., Tauber, C., Guzmán-Sarmiento, Y. C., Vinasco Mondragon, A. F., & Forero, D. (2015). A checklist of natural enemies of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in the department of Valle del Cauca, Colombia and the world. *Insecta Mundi*, 0457, 1-14.
- Kondo, T., Quintero, E. M., Campuzano, M., Wyckhuys, K. A. G., & Heraty, J. (2012). First report of *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) in the department of Valle del Cauca, Colombia. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 13(1), 48-51.
- Lafèche, D., & Bové, J. M. (1970). Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences de Paris*, 270, 1915-1917.
- León M., G., & Kondo, T. (2017). *Insectos y ácaros de los cítricos. Compendio ilustrado de especies dañinas y benéficas, con técnicas para el manejo integrado de plagas* (2.ª ed.) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (agrosavia).
- Manjunath, K. L., Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S., & Lee, R. F. (2008). Detection of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology*, 98(4), 387-396. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0387>.
- Martínez-Carrillo, J. L. (2016). *Ficha Técnica: Diaphorina citri Kuwayama Psílido asiático de los cítricos*. <http://lan gif.uaslp.mx/plagasdevastadoras/documentos/fichas/Diaphorinacitri.pdf>
- Miranda, M. P., Dos Santos, F. L., Felipe, M. R., Moreno, A., & Fereres, A. (2015). Effect of UV-blocking plastic films on take-off and host plant finding ability of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Journal of Economic Entomology*, 108(1), 245-251. <https://doi.org/10.1093/jee/tou036>
- Orjuela-Garzon, W. A., Perilla Maluche, R. B., Andrade Navia, M., & Quintero Bonilla, A. (2019). Technological surveillance for the identification of business models for internet of things IoT. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 14(17), 6406-6414. <https://doi.org/10.3923/jeasci.2019.6406.6414>
- Orjuela, A., Andrade, J. M., Cardona, E. A., Peralta, R., & Mendez, J. J. (2019). Methodological Proposal for the Identification of Incremental Innovations in SMEs. *European Research Studies Journal*, 22(4), 199-214. <http://doi.org/10.11214/thalassinos.22.04.014>
- Orjuela-Garzón, W. A., Méndez-Arteaga, J. J., & Castro, J. A. (2017). *Análisis prospectivo del sector agroindustrial en el sur del Tolima al año 2025*. <https://goo.gl/T4u6Yv>
- Pérez, M. R. V., Mendoza, M. G. G., Elías, M. G. R., González, F. J., Contreras, H. R. N., & Servín, C. C. (2016). Raman spectroscopy an option for the early detection of citrus Huanglongbing. *Applied Spectroscopy*, 70(5), 829-839. <https://doi.org/10.1177/0003702816638229>.
- Ponce, L., Etxeberria, E., Gonzalez, P., Ponce, A., & Flores, T. (2018). Rapid identification of Huanglongbing-infected citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy of phloem samples. *Applied Optics*, 57(30), 8841. <https://doi.org/10.1364/AO.57.008841>.
- Pourreza, A., & Lee, W. S. (2014). *Effect of starch accumulation in Huanglongbing symptomatic leaves on reflecting polarized light* [Conference paper]. 12th International Conference on Precision Agriculture, Sacramento, California.
- Pourreza, A., Lee, W. S., Ehsani, R., Schueller, J. K., & Raveh, E. (2015). An optimum method for real-time in-field detection of Huanglongbing disease using a vision sensor. *Computers and Electronics in Agriculture*, 110(1), 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2014.11.021>
- Ranulfi, A. C., Cardinali, M. C. B., Kubota, T. M. K., Freitas-Astúa, J., Ferreira, E. J., Belleto, B. S., da Silva, M. F. G. F., Villas Boas, P. R., Magalhães, A. B., & Milori, D. M. B. P. (2016). Laser-induced fluorescence spectroscopy

- applied to early diagnosis of citrus Huanglongbing. *Biosystems Engineering*, 144, 133-144. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.02.010>.
- Rao, G., Huang, L., Liu, M., Chen, T., Chen, J., Luo, Z., Xu, F., Xu, X., & Yao, M. (2018). Identification of Huanglongbing-infected navel oranges based on laser-induced breakdown spectroscopy combined with different chemometric methods. *Applied Optics*, 57(29), 8738-8742. <https://doi.org/10.1364/AO.57.008738>
- Rigano, L. A., Malamud, F., Orce, I. G., Filippone, M. P., Marano, M. R., do Amaral, A., Castagnaro, A. P., & Vojnov, A. A. (2014). Rapid and sensitive detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *BMC Microbiology*, 14(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-86>
- Ríos-Rojas, L., Correa, J. F., Rojas-Marin, C. A., & Dorado-Guerra, D. Y. (2018). Caracterización edafoclimática de la zona productora de lima ácida Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) en el Tolima (Colombia), afectada por una fisiopatía. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 19(3). https://doi.org/10.21930/rcta.vol19_num3_art:862
- Russell, P. F., McOwen, N., Bohannon, S., Amato, M. A., & Bohannon, R. (2015). Rapid on-site detection of the huanglongbing/citrus greening causal agent “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” by AmplifyRP, a novel rapid isothermal nucleic acid amplification platform. *Acta Horticulturae*, 1065, 905-912. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.112>
- Sánchez-González, J. A., Mellín-Rosas, M. A., Arredondo-Bernal, H. C., Vizcarra-Valdez, N. I., González-Hernández, A., & Montesinos-Matías, R. (2015). Psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). In H. C. Arredondo-Bernal, & L. A. Rodríguez del Bosque (Eds.), *Casos de control biológico en México* (Vol. 2, pp. 339-372). Biblioteca Básica de Agricultura.
- Sankaran, S., Maja, J. M., Buchanon, S., & Ehsani, R. (2013). Huanglongbing (Citrus Greening) detection using visible, near infrared and thermal imaging techniques. *Sensors*, 13(2), 2117-2130. <https://doi.org/10.3390/s130202117>
- Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas (Senave). (2013). *Manual técnico de identificación a campo del huanglongbing (HLB) de los cítricos y el insecto vector 'Diaphorina citri'*. Dirección de Protección Vegetal, Departamento de Vigilancia Fitosanitaria.
- Shibata, N., Kajikawa, Y., & Sakata, I. (2011). Detecting potential technological fronts by comparing scientific papers and patents. *Foresight*, 13(5), 51-60. <https://doi.org/10.1108/14636681111170211>
- Tsai, C. H., Hung, T. H., Su, H. J., & Liao, Y.-C. (2006). First report of the causal agent of Huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) infecting kumquat in Taiwan. *Plant Disease*, 90(10), 1360. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1360C>
- Tsai, J. H. & Liu, Y. H. (2000). Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology*, 93(6), 1721-1725. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.6.1721>.
- Valdés, R. A., Ortiz, J. C. D., Beache, M. B., Cabello, J. A., Chávez, E. C., Pagaza, Y. R., & Ochoa Fuentes, Y. M. (2016). A review of techniques for detecting huanglongbing (Greening) in citrus. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(10), 803-811. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0022>
- Vojnov, A. A., Do Amaral, A. M., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., & Marano, M. R. (2010). Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 467-477. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2631-2>
- Volkov, A. G., & Brown, C. R. (2014). Citrus greening (Huanglongbing): Fast electrochemical detection and phytomonitoring of the trees diseases. *ECS Transactions*, 58(23), 9-17. <https://doi.org/10.1149/05823.0009ecst>
- Wang, B., Pan, S. Y., Ke, R. Y., Wang, K., & Wei, Y. M. (2014). An overview of climate change vulnerability: A bibliometric analysis based on Web of Science database. *Natural Hazards*, 74(3), 1649-1666. <https://doi.org/10.1007/s11069-014-1260-y>

Zeng, X., Chen, D., & Wang, H. (2016). *CN106018332 - Near-infrared-spectrum citrus yellow shoot disease field detection method*. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=CN178701017>