



© Dr. Sóstenes Varela Fuentes

Métodos para la detección presuntiva de Huanglongbing (HLB) en cítricos

Methods for presumptive detection of Huanglongbing (HLB) in Citrus

Juan José Garza-Saldaña^{1*}
Sóstenes Varela-Fuentes¹
Wilfrido Gómez-Flores²

¹Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Centro Universitario Victoria, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, C.P. 87149.

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Tamaulipas, Parque Científico y Tecnológico TECNOTAM, km 5.5 carretera Ciudad Victoria-Soto La Marina, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, C.P. 87130.

*Autor para correspondencia:
jjgarza@docentes.uat.edu.mx

Fecha de recepción:
27 de noviembre de 2015

Fecha de aceptación:
23 de junio de 2016

RESUMEN

Huanglongbing (HLB) es considerada mundialmente como la enfermedad más amenazadora para la citricultura, y ha impactado principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil. A la fecha, no se cuenta con un tratamiento efectivo para la detección de esta enfermedad, que pueda ayudar a disminuir su propagación y la consecuente eliminación de árboles infectados. El método más confiable hasta ahora, para la identificación del HLB, es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (qrt-PCR), la cual es costosa y tardada. Esta es la primera revisión de los diferentes métodos existentes o en desarrollo para la detección e identificación del HLB; clasificados en métodos de análisis y reconocimiento de patrones en imágenes, espectrofotométricos, cromatográficos y moleculares a través del insecto vec-

tor. Algunos de estos métodos representan alternativas innovadoras con diferente nivel de eficiencia en tiempo, costo y confiabilidad en la detección de árboles enfermos de HLB o en el manejo de la enfermedad, con relación a los tradicionalmente utilizados.

PALABRAS CLAVE: detección, Huanglongbing, HLB.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is considered worldwide as the most threatening disease for citrus and has impacted mainly in Asia, South Africa and Brazil. Until now, no effective treatment for the detection of this disease (is available, which can help diminish its spread and the consequent removal of infected trees). The most reliable identification HLB test method to date is the polymerase chain reaction (qrt-PCR),

which is costly and time-consuming. This is the first review of the different existing or developing methods for HLB detection and identification, classified into analysis and pattern recognition in images, spectrophotometric, chromatographic and molecular through the insect vector. Some of these methods represent innovative alternatives with different levels of efficiency in time, cost and reliability in detecting diseased trees or in managing the disease, compared to those traditionally used.

KEYWORDS: detection, Huanglongbing, HLB.

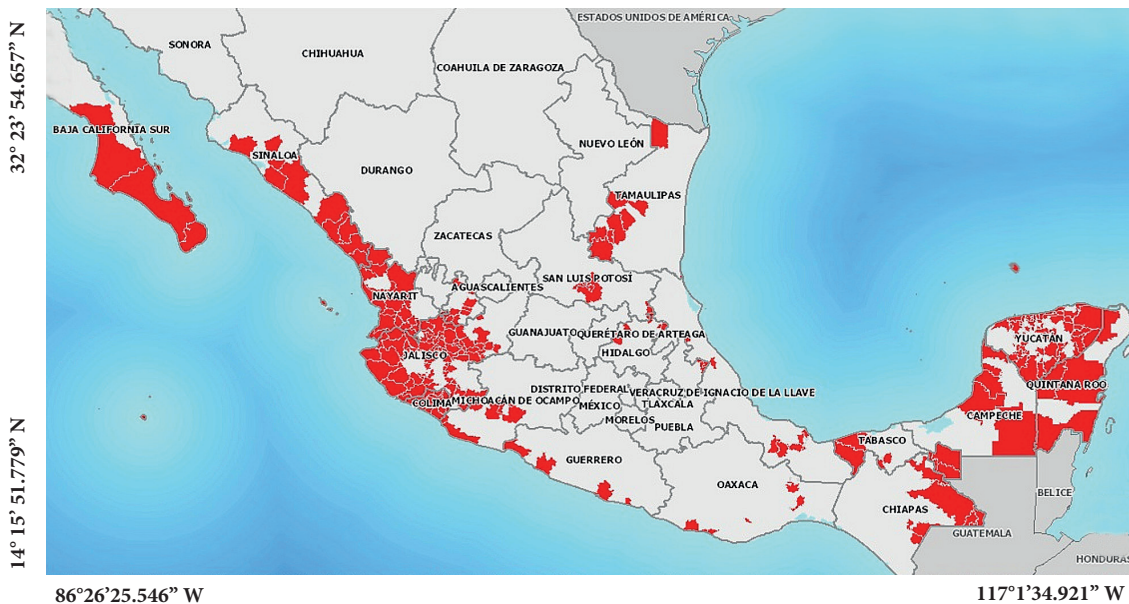
INTRODUCCIÓN

La enfermedad más devastadora para los cítricos a nivel mundial es el Huanglongbing (HLB); se estima que ha causado la muerte de más de 63 millones de árboles, principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil (Robles-González y col., 2013; Santivañez y col., 2013). Es una enfermedad de rápida diseminación, detectada por primera vez en el hemisferio Occidental en 2004, en Brasil (Texeira y col., 2005); en agosto de 2005 se reportó el primer brote en Florida, Estados Unidos (Halbert, 2005), y desde entonces se extendió a todos los condados de dicho estado y a algunos condados productores de California y

Texas (Choi y col., 2013). Se considera que entre 2004 y 2011 disminuyó en un 28 % la superficie citrícola comercial de Florida, y con ella el número de árboles en producción, siendo el HLB una de las principales razones (Pourreza y col., 2015).

En México, la enfermedad se detectó por primera vez en julio de 2009, en árboles de limón mexicano, en áreas urbanas de la península de Yucatán. Posteriormente, se reportó en árboles de la misma especie en los estados de Nayarit y Jalisco, y en 2010 en Colima (SENASICA, 2015a); en este último estado, hasta diciembre de 2010, se habían detectado 164 359 árboles de limón mexicano con síntomas atribuibles al HLB, en 1 062 plantaciones ubicadas en diferentes zonas productoras (Robles-González y col., 2013). En noviembre de 2015, el HLB se encontraba presente en 347 municipios, pertenecientes a 18 de los 24 estados que cultivan cítricos en México (Figura 1) (SENASICA, 2015b).

El HLB es causado por bacterias gram-negativas del género *Candidatus Liberibacter*: denominado *Candidatus*, por pertenecer al tipo de microorganismos que no es posible cultivar en el laboratorio con las técnicas tradicionales, lo que



■ Figura 1. Mapa de distribución del HLB en México (SENASICA, 2015b).
Figure 1. Distribution map of HLB in Mexico (SENASICA, 2015b).

dificulta su caracterización y clasificación. El nombre Liberibacter es una palabra compuesta, proveniente de dos vocablos del latín *liber* (corteza) y *bacter* (bacteria). Se reconocen tres tipos causantes de esta enfermedad: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* y *Candidatus Liberibacter americanus* (Bové, 2006; Santivañez y col., 2013). Estas bacterias son introducidas por un organismo vector en el floema de la planta hospedera, y al moverse, a través del sistema vascular, la contaminan en su totalidad, causando su muerte después de 2 a 3 años (Robles-González y col., 2013).

Los árboles gravemente afectados tienen manchas moteadas en hojas, hojas más pequeñas con algunos síntomas de deficiencia de nutrientes, así como venas de color amarillo. Además, las frutas infectadas con HLB muestran colores anormales, formas irregulares, sabor amargo y presentan semillas abortadas. Estos síntomas pueden utilizarse para el diagnóstico de la enfermedad, pero son imprecisos, por lo que se requiere su confirmación (Gonzalez y col., 2012; Pourreza y col., 2015). Las bacterias asiática y americana, que causan el HLB, se transmiten a través de un vector común, el psílido *Diaphorina citri* (Kuwayama); en tanto que la bacteria africana

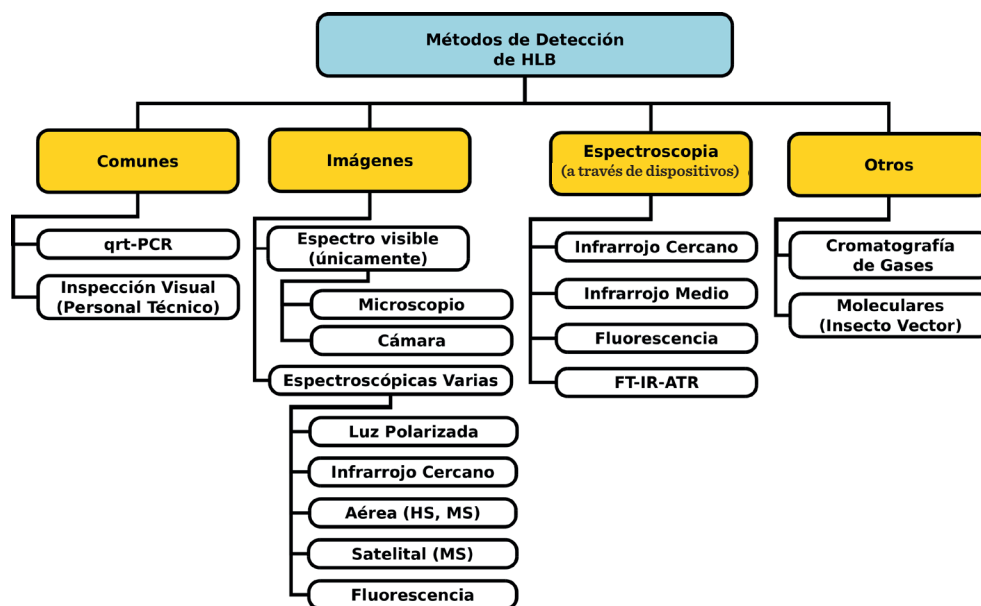
es transmitida por el psílido *Trioza erythrae* (Del Guercio) (Albrecht y Bowman, 2008; Santivañez y col., 2013).

Actualmente, no existe un tratamiento efectivo para el HLB, por lo que se requiere su detección temprana, para proceder a la eliminación de los árboles infectados, lo que puede ayudar a minimizar y controlar la propagación de la enfermedad a otros árboles en el huerto y la región en general (Pourreza y col., 2015).

En el presente documento se analizan los métodos comúnmente utilizados y los métodos innovadores propuestos para la detección del HLB en cítricos (Figura 2), clasificándolos en: métodos de análisis y reconocimiento de patrones de la enfermedad en imágenes a través de cámaras, métodos que adquieren información espectroscópica a través de dispositivos y otros basados en cromatografía y de detección molecular a través del insecto vector.

Métodos comunes para la detección del HLB

Para la detección de HLB se utilizan dos métodos comunes: la inspección visual de los síntomas y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (qrt-PCR, por sus siglas en inglés:



■ **Figura 2. Clasificación de métodos de detección de HLB.**
 Figure 2. Classification of methods for HLB detection.

Polymerase Chain Reaction); ambos métodos son costosos, por la cantidad de recursos que utilizan, y consumen tiempo. Con relación a la eficiencia del diagnóstico (Futch y col., 2009), en un estudio realizado por inspectores profesionales en el condado de DeSoto, Florida, Estados Unidos, mostraron que la exactitud de la identificación de un árbol infectado con HLB mediante inspección visual es entre 47 % y 61 %. Por otra parte, la prueba de reacción cuantitativa en tiempo real de la cadena de la polimerasa (qRT-PCR) puede identificar el estado de HLB con mayor precisión, ya que es una prueba de diagnóstico basada en métodos de laboratorio (Pourreza y col., 2015).

Métodos basados en otras técnicas para la detección del HLB

La existencia de métodos rápidos y fáciles para detección de enfermedades de las plantas, mejoran indirectamente la productividad de la agricultura e impiden importantes pérdidas en el sector agrícola. Una de las principales herramientas para la detección de enfermedades es el empleo del espectro electromagnético, que es el conjunto de longitudes de onda de todas las radiaciones electromagnéticas, incluyendo los rayos gamma, los rayos X, la radiación ultravioleta (UV), la luz visible (espectro visible), la radiación infrarroja (IR) y las ondas radioeléctricas (Gonzalez y Woods, 2008).

Sankaran y col. (2010b), mostraron diferentes métodos para la detección de varias enfermedades como: espectroscopia fluorescente para la detección de canker en cítricos, espectroscopia visible e infrarroja, para la detección de infestación de chicharrita de color marrón (*Nilaparvata lugens*) en plantas de arroz, e imágenes hiperespectrales, para la detección de sarna del trigo (*Fusarium head blight*), entre otros.

El empleo del espectro electromagnético, apoyado de visión artificial, es uno de los enfoques de mayor éxito en el control y detección de enfermedades, tanto para árboles como para cultivos herbáceos. Se muestran dos clases de técnicas para la detección de HLB que utilizan imá-

genes de hojas o árboles de cítricos: la primera hace uso de imágenes adquiridas en el espacio de color visible, específicamente imágenes en color (RGB, del inglés Red, Green, Blue); en la segunda, algunos trabajos utilizan combinaciones de imágenes del espectro electromagnético visible y no visible al ojo humano y son adquiridas por cámaras especiales. El HLB también se detecta utilizando diferentes dispositivos electrónicos que adquieren datos del espectro electromagnético, sin el empleo de imágenes, en función del objeto al cual son dirigidos (hojas o árboles). Los métodos que no utilizan las técnicas anteriores fueron clasificados en este trabajo como otros métodos de detección (Figura 2).

Análisis de imágenes y reconocimiento de patrones por computadora

En esta sección se revisaron métodos que utilizan imágenes de cámaras digitales y cámaras espectroscópicas.

Imágenes dentro del espectro visible

Microscopio

Kim y col. (2009), evaluaron con imágenes extraídas a través de un microscopio digital (VHX-600K con lentes OP-51479, Keyence, Japón) la capacidad de co-ocurrencia de características de hojas de cítricos, utilizando una selección de 420 imágenes de hojas con dimensiones de 1 600 píxeles por 1 200 píxeles, adquiridas en el espacio de color RGB y convertidas al espacio HSI (del inglés *Hue, Saturation, Intensity*); las imágenes fueron clasificadas por personal experto en siete clases sintomáticas: reverdecimiento moteado con manchas, con islas verdes, deficiencia de hierro, deficiencia de magnesio, deficiencia de zinc, hojas de brotes jóvenes y hojas maduras normales. También emplearon un análisis discriminante por pasos, con fines de selección y clasificación de características de las imágenes. Se originaron tres funciones de clasificación, que al utilizarlas generaron algoritmos clasificadores, los cuales permitieron una precisión de clasificación de 86.7 %, cuando se consideraron todas las clases; sin embargo, la exactitud aumentó a 97.3 %, cuando se omitieron en el algoritmo de clasi-

ficación las clases de hojas de brotes jóvenes y de color moteado con manchas.

Cámara

Deng y col. (2014), propusieron un método para reconocer el HLB, basado en el análisis de RGB. Utilizaron una base de datos de 216 imágenes de hojas, clasificadas por expertos, en: sanas, enfermas con HLB, con síntomas atenuados de HLB por tratamientos, amarillas y con deficiencia de zinc. Las imágenes fueron obtenidas con diferentes cámaras, iluminación, resolución y ángulo. En la etapa de entrenamiento se obtuvieron imágenes de las diferentes hojas, pertenecientes a cada una de las clases mencionadas y se analizaron sus características. Estas se colocaron en una estructura de datos denominada árbol ponderado de vocabulario escalable (WSVT, por sus siglas en inglés: Weighted Scalable Vocabulary Tree). Posteriormente, en la etapa de reconocimiento de la imagen de la hoja a clasificar se extrajo también un WSVT, que se comparó con la base de datos obtenida en la fase de entrenamiento y se identificó la clase a la que pertenecía la imagen. Los resultados mostraron una exactitud entre 95 % y 100 %, con tiempos inferiores a 1 s.

Imágenes espectroscópicas

Las técnicas espectroscópicas permiten identificar moléculas desconocidas, ya que pueden medir las longitudes de enlace y determinar las constantes de fuerza asociadas a los enlaces químicos. Están basadas en determinar las transiciones que tienen lugar entre diferentes estados de energía de las moléculas, cuando interactúan con la radiación electromagnética (Engel y Reid, 2006).

Se han probado diferentes métodos que utilizan la visión por computadora para detectar HLB, en los que se aprovechan las características que proveen las imágenes espectroscópicas, como se muestra a continuación.

Luz polarizada

Las hojas infectadas con HLB presentan un alto contenido de almidón (Ettxeberria y col., 2009), lo

cual ha sido utilizado para diagnosticar la presencia de esta enfermedad (Gonzalez y col., 2012). Pourreza y col. (2014), mostraron los resultados del estudio de acumulación de almidón en hojas de cítricos HLB-sintomáticas, donde esta acumulación hizo girar el plano de polarización de la luz a 591 nm, capturando esta reflectancia con cámaras monocromáticas. Siete algoritmos clasificadores fueron evaluados y se consideraron tres clases de muestras (deficiencia de magnesio, HLB-positivo con deficiencia de zinc y HLB-negativo con deficiencia de zinc), en el proceso de clasificación, para confirmar la capacidad de detección de almidón en el sistema; se obtuvieron precisiones de 93.1 % y 89.6 % en promedio, para las variedades “Hamlin” y “Valencia” respectivamente.

Pourreza y col. (2015), haciendo uso del mismo principio de acumulación de almidón en las hojas de los cítricos, utilizaron un sensor de visión desarrollado para el propósito de detección en tiempo real del HLB en condiciones de campo; el sensor pudo detectar la infección directamente sobre la copa del árbol e incluyó una cámara monocromática altamente sensible, LEDs de alta potencia de banda-estrecha y filtros polarizados. Los resultados detectaron HLB en el rango de 95.5 % a 98.5 % en pruebas de campo y laboratorio, y las muestras HLB-negativas fueron clasificadas con 100 % de precisión en los conjuntos probados.

Infrarrojo cercano

El infrarrojo cercano es la radiación del espectro luminoso que se extiende desde el extremo del rojo visible hacia frecuencias mayores (Gonzalez y Woods, 2008). Mishra y col. (2007), reportaron que las regiones de longitudes de onda en el espectro visible, de 530 nm a 564 nm (pico verde) y las del rango 710 nm a 715 nm (borde rojo), así como dos longitudes de onda de la región del infrarrojo cercano (1 041 nm y 2 014 nm), tuvieron la capacidad de discriminar entre árboles sintomáticos de HLB y sanos.

Sankaran y col. (2013), demostraron también la aplicabilidad de espectroscopia del infrarrojo

cercano visible, además de imágenes térmicas para la detección de HLB en árboles de cítricos. Tres cámaras (dos multiespectrales de 6 bandas y una térmica), montadas sobre el mástil de un vehículo, se utilizaron para adquirir las imágenes. Las cámaras multiespectrales se configuraron para obtener imágenes en 12 bandas en el rango de 440 nm a 990 nm. Los algoritmos de clasificación utilizando valores promedio de la reflectancia espectral visible y las bandas térmicas como características de entrada, con el método de Máquinas de Soporte Vectorial (SVM, por sus siglas en inglés: Support Vector Machine), indicaron una precisión global de clasificación positiva media alrededor del 87 % para árboles con hojas sintomáticas. Las SVM son conjuntos de algoritmos de aprendizaje supervisado, que construyen un modelo que predice si un elemento nuevo, cuya categoría se desconoce, pertenece a una categoría o a la otra.

Fotografía aérea

Estos métodos son capaces de detectar áreas infectadas, abarcando grandes superficies de cultivo; pero dependen de la precisión en la verificación por tierra del área muestreada y los algoritmos clasificadores implementados. Algunos de ellos utilizan imágenes de cámaras multiespectrales (MS), que permiten capturar la información de varias bandas del espectro (típicamente de 4 a 7); o hiperespectrales (HS), que se obtienen al capturar un mayor número de bandas (Amro y col., 2011).

La detección del HLB, utilizando imágenes obtenidas desde un aeroplano, ha sido reportada en varios trabajos. Kumar y col. (2010), emplearon imágenes aéreas HS y MS, y realizaron la prueba de PCR en muestras vegetales, para comprobar la presencia de HLB en árboles infectados en una zona bajo análisis. Se registraron las coordenadas de latitud y longitud a través de un dispositivo receptor de GPS y se generó una librería derivada de las imágenes espectrales y las coordenadas. Se logró una precisión en la detección de 80 %, utilizando *Mixture Tuned Match Filtering* (MTMF, por sus siglas en inglés) con la imagen HS; para el filtro de mapeo

de ángulo espectral (SAM, por sus siglas en inglés: Spectral Angle Mapping): con imagen MS la precisión fue de 87 %.

Li y col. (2012), emplearon imágenes aéreas HS y MS, de plantaciones de cítricos, en Florida, Estados Unidos, obtenidas durante el 2007 y 2010. La precisión de detección para HLB fue mayor a 90 %, con un método sencillo de umbral de posición de borde rojo (REP, por sus siglas en inglés: Red Edge Position). Años más tarde, Li y col. (2014), propusieron un algoritmo denominado mapeo de ángulos espectrales extendido (ESAM, por sus siglas en inglés: Spectral Angle Mapping), en el cual, el algoritmo SVM fue utilizado para separar las copas de los árboles del fondo, y el método ESAM logró una precisión de detección del 86 %, utilizando imágenes HS.

García-Ruiz y col. (2013), obtuvieron imágenes aéreas de un área de interés específica, utilizando un vehículo aéreo no tripulado (UAV, por sus siglas en inglés: Unmanned Aerial Vehicle), o dron equipado con una cámara de alta resolución, con sensores de imagen multi-banda, ajustando la resolución deseada de acuerdo a la altitud de vuelo. Los resultados obtenidos se compararon con resultados de imágenes adquiridas desde un aeroplano y que tienen una resolución inferior. Previo a la adquisición de imágenes, se identificaron y ubicaron con GPS en el área de interés, 19 árboles sanos y 19 árboles con HLB (detectados por PCR). Durante el proceso de clasificación se separó o segmentó el suelo con respecto a la copa de los árboles. En el análisis se comparó la eficiencia de cuatro algoritmos: análisis lineal, de discriminante cuadrática, SVM con ajuste lineal y no lineal (de kernel); con este último se obtuvo una precisión mayor, en el rango del 67 % a 85 % con datos del UAV y 61 % a 74 % con datos del aeroplano.

Fotografía satelital

Li y col. (2015), utilizaron el análisis de imágenes satelitales MS con una resolución de 2 m, adquiridas por el satélite WorldView-2, como una forma rápida para monitorear HLB en grandes ex-

tensiones. A la vez, realizaron una exploración por tierra, y se construyeron dos bibliotecas espectrales: la Biblioteca 1 con ubicaciones *Real Time Kinematic* (RTK, por sus siglas en inglés), GPS para obtener exactitud submétrica; y la Biblioteca 2 con el conocimiento previo de las características espectrales de la exploración por tierra, con el fin de comparar la precisión de detección del HLB de trabajos previos que utilizan imágenes espectrales aéreas (con los mismos algoritmos de clasificación). La distancia de Mahalanobis tuvo la mayor precisión con un 81 %, utilizando la Biblioteca 2. Lo que indica que la imagen satelital MS, con una resolución espacial adecuada, presenta potencial para la detección del HLB.

Espectroscopia de imágenes fluorescentes

Fluorescencia es la propiedad que tienen algunas sustancias de reflejar luz con mayor longitud de onda que la recibida cuando están expuestas a ciertos rayos del espectro (Engel y Reid, 2006). Wetterich y col. (2012), desarrollaron y evaluaron un método de visión por computadora y técnicas de aprendizaje automático para la clasificación de hojas con HLB y hojas sanas, utilizando un dispositivo personalizado de espectroscopia de imágenes fluorescentes con una cámara monocromática. Las características extraídas de las imágenes fueron utilizadas como entradas de diferentes algoritmos clasificadores, y encontraron que el algoritmo SVM puede clasificar intensidades de fluorescencia de hojas infectadas de HLB hasta con 90 % de precisión. Por otro lado, al comparar la intensidad de fluorescencia de hojas de cítricos recolectadas en Brasil y los Estados Unidos esta fue diferente.

Pereira y col. (2011), estudiaron el uso potencial de imágenes de fluorescencia inducida por láser (LIFI, por sus siglas en inglés: Laser-Induced Fluorescence Imaging), para detección de HLB en naranja dulce (*Citrus sinensis*), a través de un experimento, en el que verificaron la respuesta de fluorescencia, durante un periodo de ocho meses después de la inoculación bacteriana de 60 árboles. Utilizaron el sistema de LIFI, a 473 nm de longitud de onda de excitación, para tomar fo-

tografías de fluorescencia de hojas de la planta y encontraron que el método propuesto fue capaz de identificar el 95 % de las plantas con HLB, aun en etapas tempranas de la enfermedad (primeros meses), antes de la aparición de los síntomas visuales.

Espectroscopia

En esta sección se muestra la utilización de datos de espectroscopia capturados a través de varios dispositivos electrónicos y que no emplean procesamiento de imágenes durante su análisis.

Infrarrojo cercano

Al analizar las hojas de los árboles de cítricos para la detección del HLB, Sankaran y col. (2011), utilizaron un espectroradiómetro portátil, donde extrajeron 86 características espectrales en el rango visible y del infrarrojo cercano, entre 350 nm y 2 500 nm con intervalos de 25 nm. Obtuvieron un conjunto de datos combinados mediante el análisis de componentes principales (PCA), que se utilizaron en varios clasificadores, alcanzando un 95 % de precisión, cuando se empleó el conjunto de datos de la segunda derivada, y el clasificador denominado análisis de discriminante cuadrático (QDA). En otro estudio, Sankaran y Ehsani (2011), evaluaron las características de los mismos espectros, incluyendo además reflectancia espectral e índices de vegetación en condiciones de laboratorio y de campo, encontrando que el uso de ambos tipos de características puede resultar en una precisión de clasificación mayor al 80 %.

Mishra y col. (2011), evaluaron un sensor óptico activo, multibanda, de bajo costo y portátil, conectado a una PDA (Personal Digital Assistant), para identificar los árboles infectados con HLB de los árboles sanos. El sensor medía la reflectancia de las copas de los árboles en cuatro bandas: dos bandas visibles a 570 nm y 670 nm, y dos bandas de infrarrojo cercano a 870 nm y 970 nm; con esta información calcularon 11 diferentes índices y se utilizaron como entradas de manera combinada en cinco algoritmos clasificadores: árboles de decisión (KNN, por sus

siglas en inglés: K-Nearest Neighbours), regresión logística, redes neuronales y SVM. Se obtuvo una precisión de 97 % para la detección de HLB usando algoritmos basados en SVM y árboles de toma de decisiones. En un estudio separado, Mishra y col. (2012), utilizando dos espectroradiómetros portátiles y una computadora, lograron una precisión de detección de HLB mayor a 90 %, usando múltiples observaciones y un algoritmo clasificador SVM o KNN ponderado.

Infrarrojo medio

La espectroscopia del infrarrojo medio fue empleada por Sankaran y col. (2010a), para identificar la presencia de infección de HLB en hojas de cítricos, contrastando sus espectros con los de hojas con deficiencia de nutrientes y hojas sanas. Las hojas enfermas fueron detectadas a través del análisis de PCR, las sanas y con deficiencia de nutrientes fueron determinadas por un grupo de expertos entrenados. Con este método demostraron que con la firma espectral adquirida en el rango de 5.15 μm a 10.72 μm , el algoritmo KNN es capaz de identificar la infección de HLB en hojas con una exactitud de más del 90 %.

Fluorescencia

Sankaran y Ehsani (2013), utilizaron un sensor de fluorescencia de mano para identificar HLB en etapas sintomáticas y asintomáticas de las hojas de cítricos de diferentes variedades. Los resultados indicaron que el algoritmo *bagged decision tree* (BDT), clasificó con 97 % de precisión las hojas sanas y sintomáticas. Aunque las muestras asintomáticas de los árboles infectados con HLB (en los resultados del análisis de PCR), no pudieron ser clasificadas, el clasificador Naïve-Bayes agrupó la mayor parte de las muestras asintomáticas como HLB.

Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier

Hawkins y col. (2010), emplearon un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier y como accesorio un cristal de diamante ATR (FT-IR-ATR, por sus siglas en inglés: Fourier

Transform Infrared Attenuated Total Reflection) para detectar hojas infectadas con HLB. Con este método, la hoja debe estar seca y triturada antes del análisis. Más del 95 % de las 179 muestras en este estudio fueron correctamente identificadas. Contrario a la prueba de PCR, que puede tardar horas, los resultados a través de este método son obtenidos en minutos.

Otros métodos de detección

En esta sección se describen los métodos de detección que utilizan técnicas diferentes al análisis y reconocimiento de patrones y la espectroscopia.

Cromatografía de gases

Los organismos vivos producen compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés: Volatile Organic Compounds), de manera natural y específica, lo que puede ser aprovechado para detectar diferentes enfermedades, incluso en etapas tempranas en las que aún no aparecen los síntomas visuales, y usualmente se realizan a bajo costo comparado con los métodos comunes. Aksenov y col. (2014), establecieron un método de detección de la enfermedad del HLB basado en el análisis químico de VOCs, liberados por los árboles infectados; encontrando biomarcadores o “huellas digitales” específicas para el patógeno que causa la enfermedad, y que pueden interpretarse utilizando métodos analíticos, tales como cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés: Gas Chromatography/Mass Spectrometry) y cromatografía de gases/espectrometría diferencial de movilidad (GC/DMS, por sus siglas en inglés: Gas Chromatography/Differential Mobility Spectrometer). Este método de detección tiene una exactitud cercana al 90 % durante todo el año, acercándose al 100 % bajo condiciones de laboratorio óptimas, incluso en etapas muy tempranas de la infección donde otros métodos no son adecuados.

Detección a través del insecto vector

La bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), asociada con el HLB, se transmite por *Diaphorina citri* Kuwayama, el psílido asiático de los cítricos. Keremane y col. (2015), emplea-

ron psílidos para evaluar la presencia de CLas en una población de insectos, como una herramienta para la detección temprana del HLB en nuevas áreas invadidas por el psílido. Los autores reportaron el desarrollo de un kit de detección molecular de campo para diagnosticar psílidos con CLas, utilizando tecnología de amplificación cíclica (LAMP, por sus siglas en inglés: Loop Mediated Amplification Technology), que permite analizar seis muestras con grupos de 1 a 10 psílidos, además de un control positivo y negativo en aproximadamente 30 min. Los ensayos de LAMP se realizan en una unidad de detección Smart-DARTTM, que es operado desde un dispositivo móvil con sistema operativo Android. El método de detección de LAMP para CLas es aproximadamente 100 veces más sensible que el método tradicional de PCR en tiempo real, por lo que puede ser útil en áreas donde la epidemia está en las etapas iniciales.

El HLB y su detección

La mayoría de los diferentes métodos empleados para la detección de HLB, que fueron mostrados en este trabajo, proveen detección basada en algoritmos de aprendizaje de máquina (Machine Learning) o aprendizaje automático, debido a la complejidad del problema de detección. En general, se utilizan dos enfoques: el primero es el aprendizaje supervisado, que corresponde a algoritmos que tienen como meta aproximar a una función objetivo, y que describen cómo los elementos del problema deben ser clasificados de acuerdo a una clasificación previa (usualmente realizada por personal experto en el área), por medio de una función llamada clasificador, por lo tanto requieren una colección inicial de ejemplares clasificados. Por otro lado, el aprendizaje no supervisado incluye algoritmos en los que no se dispone de ejemplares previamente clasificados, sino que a partir de las propiedades de los mismos ejemplares se intenta dar una clasificación según su similitud. En este tipo se incluyen los algoritmos de agrupamiento (clustering).

En la Tabla 1 se muestran los métodos para detección de HLB, con su respectivo porcentaje de

precisión en la detección, así como su clasificación. En los métodos revisados, la enfermedad fue detectada en la planta a través de los síntomas que mostraba, excepto en el trabajo desarrollado por Keremane y col. (2015), que identificaron la bacteria en los psílidos; y en el de Aksenov y col. (2014), quienes también la detectaron en los VOCs. Por otro lado, los métodos de detección basados únicamente en imágenes a color de cámaras digitales (Deng y col., 2014), así como de microscopio (Kim y col., 2009), tienen la desventaja de ofrecer resultados sólo cuando los síntomas de la enfermedad son evidentes en las hojas, sin embargo, debido a la dificultad que presenta la detección de la enfermedad, aún para personal experto (Futch y col., 2009), son una opción viable cuando los recursos de equipo adicional no están disponibles. Aksenov y col. (2014), quienes detectaron la enfermedad a través de análisis de gases, proveen buenos resultados, pero tienen la desventaja de las condiciones meteorológicas, particularmente el viento, al utilizarse en campo, que influyen en un análisis preciso. Por otra parte, los métodos que requieren recolectar muestras de follaje y la detección a través del insecto vector (Keremane y col., 2015), no consideran el tiempo de captura de las muestras para realizar el análisis, lo cual incrementa el tiempo para obtener el resultado por cada muestra, por lo que al aplicarse en campo pueden consumir grandes cantidades de tiempo.

Los métodos que no requieren hacer contacto con el área afectada ofrecen mayor rapidez en la detección. Pourreza y col. (2015) y Sankaran y Ehsani (2013), mostraron dispositivos que pueden ser colocados sobre un vehículo terrestre y detectar el HLB a cierta distancia del árbol, con una eficiencia de detección superior al 95.5 %. Por otro lado, la utilización de imágenes aéreas o satelitales (Kumar y col. 2010; Li y col., 2014; Li y col., 2015), proveen la ventaja de localizar la enfermedad en grandes extensiones de plantaciones. En cuanto a resolución o grado de detalle de las imágenes, los UAV o drones, adquieren imágenes con resolución mayor, seguidas por las obtenidas a través de un aeroplano y finalmente las satelitales, sin embargo, la diferencia en los

■ **Tabla 1. Métodos de detección de HLB, porcentaje de precisión en la detección y clasificación.**
Table 1. HLB detection methods, detection accuracy rate and classification.

Núm.	Referencia del trabajo de investigación	% Precisión en la detección del HLB	Tipo de imagen	Tecnología utilizada para la detección			
				Análisis de imágenes	Análisis de gases	Espectroscopia	Moleculares (Insecto Vector)
1	Aksenov y col. (2014)	≈ 90 a 100	---		X		
2	Deng y col. (2014)	95 a 100	RGB	X			
3	Futch y col. (2009)	47 a 61	---				
4	Garcia-Ruiz y col. (2013)	74 (avión), 85 (UAV)	ES, Aérea	X		X	
5	Hawkins y col. (2010)	> 95	ES			X	
6	Keremane y col. (2015)	---	---				X
7	Kim y col. (2009)	86.7 a 97.3	RGB	X			
8	Kumar y col. (2010)	80 (HS), 87 (MS)	ES, Aérea	X		X	
9	Li y col. (2012)	> 90	ES	X		X	
10	Li y col. (2014)	86 (HS)	ES, Aérea	X		X	
11	Li y col. (2015)	81 (MS)	ES, Satelital	X		X	
12	Mishra y col. (2011)	97	---			X	
13	Mishra y col. (2012)	> 90	---			X	
14	Pereira y col. (2011)	95	ES	X		X	
15	Pourreza y col. (2014)	89.6 Valencia, 93.1 Hamlin	ES	X		X	
16	Pourreza y col. (2015)	95.5 a 98.5	ES	X		X	
17	Sankaran y Ehsani (2011)	> 80	---			X	
18	Sankaran y Ehsani (2013)	97	---			X	
19	Sankaran y col. (2010a)	> 90	---			X	
20	Sankaran y col. (2011)	95	---			X	
21	Sankaran y col. (2013)	87	ES	X		X	
22	Wetterich y col. (2012)	≈ 90	ES	X		X	
				12	1	17	1

ES: Espectral no visible; HS: Hiperespectral; MS: Multiespectral; RGB: Espectro visible; UAV: *Unmanned Aerial Vehicle*.

resultados de detección para HLB de 85 % para imágenes de UAV (Garcia-Ruiz y col., 2013), 86 % aéreas (Li y col., 2014) y 81 % satelitales (Li y col., 2015) no es significativa.

CONCLUSIONES

Ante el riesgo sanitario que representa el Huanglongbing (HLB), a la citricultura mundial, y al no existir por el momento un método que elimine por completo la enfermedad, su detección rápida y oportuna con consecuente eliminación del árbol,

son actualmente la única forma de evitar el establecimiento y dispersión de la enfermedad. Los métodos para la detección de HLB que utilizan fotografía aérea o satelital, permiten el monitoreo de grandes superficies, sin embargo, su precisión actual no es suficiente para adoptarlos como métodos oficiales y son costosos en función del número de bandas del espectro que utilizan. Por otro lado, los métodos que alcanzan precisiones similares a la prueba de PCR obtienen resultados en corto tiempo, pero requieren la cercanía

con el objeto de estudio, lo cual es un gran inconveniente, ya que los huertos tienen grandes extensiones. Por lo tanto, un sistema que considere el alcance amplio de los métodos de fotografía

aérea o satelital, con la validación a través de un método de detección de corto alcance, representa la mejor opción para una detección oportuna.

REFERENCIAS

- Aksenov, A. A., Pasamontes, A., Peirano, D. J., Zhao, W., Dandekar, A. M., Fiehn, O., ..., and Davis, C. E. (2014). Detection of Huanglongbing Disease Using Differential Mobility Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 86(5): 2481-2488.
- Albrecht, U. and Bowman, K. D. (2008). Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science*. 175(3): 291-306.
- Amro, I., Mateos, J., Vega, M., Molina, R., and Katsaggelos, A. K. (2011). A survey of classical methods and new trends in pansharpening of multispectral images. *EURASIP Journal on Advances in Signal Processing*. 2011(1): 1.
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology*. 88: 7-37.
- Choi, D., Lee, W. S., and Ehsani, R. (2013). Detecting and counting citrus fruit on the ground using machine vision, in *ASABE*. [En línea]. Disponible en: <http://abe.ufl.edu/precag/pdf/2013DaeunASABE.pdf>. Fecha de consulta: 4 de noviembre de 2015.
- Deng, X. L., Li, Z., Deng, X. L., and Hong, T. S. (2014). Citrus disease recognition based on weighted scalable vocabulary tree. *Precision Agriculture*. 15(3): 321-330.
- Engel, T. and Reid, P. (2006). *Química física*. Madrid, España: Pearson Educación S.A. 1090 Pp.
- Etxeberria, E., Gonzalez, P., Achor, D., and Albrigo, G. (2009). Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 74(1): 76-83.
- Futch, S., Weingarten, S., and Irely, M. (2009). Determining HLB infection levels using multiple survey methods in Florida citrus. In *Proceedings Florida State Horticultural Society*. 122: 152-157.
- García-Ruiz, F., Sankaran, S., Maja, J. M., Lee, W. S., Rasmussen, J., and Ehsani, R. (2013). Comparison of two aerial imaging platforms for identification of Huanglongbing-infected citrus trees. *Computers and Electronics in Agriculture*. 91: 106-115.
- Gonzalez, P., Reyes-De-Corcuera, J., and Etxeberria, E. (2012). Characterization of leaf starch from HLB-affected and unaffected-girdled citrus trees. *Physiological and molecular plant pathology*. 79: 71-78.
- Gonzalez, R. and Woods, R. (2008). *Digital Image Processing*. Estados Unidos: Pearson/Prentice Hall. 976 Pp.
- Halbert, S. E. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida, in *Proceedings of the 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Work-shop*. [En línea]. Disponible en: http://freshfromflorida.s3.amazonaws.com/2nd_International_Canker_Huanglongbing_Research_Workshop_2005.pdf. Fecha de consulta: 4 de noviembre de 2015.
- Hawkins, S. A., Park, B., Poole, G. H., Gottwald, T., Windham, W. R., and Lawrence, K. C. (2010). Detection of Citrus huanglongbing by Fourier transform infrared-attenuated total reflection spectroscopy. *Applied spectroscopy*. 64(1): 100-103.
- Keremane, M. L., Ramadugu, C., Rodriguez, E., Kubota, R., Shibata, S., Hall, D. G., ..., and Lee, R. F. (2015). A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated "Candidatus Liberibacter asiaticus" from the psyllid vector. *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management. *Crop Protection*. 68: 41-48.
- Kim, D. G., Burks, T. F., Schumann, A. W., Zekri, M., Zhao, X., and Qin, J. (2009). Detection of citrus greening using microscopic imaging, in *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*. [En línea]. Disponible en: <http://www.cigrjournal.org/index.php/Ejournal/article/view/1194/1226>. Fecha de consulta: 4 de noviembre de 2015.
- Kumar, A., Lee, W., Ehsani, R., Albrigo, L., Yang, C., and Mangan, R. (2010). Citrus greening disease detection using airborne multispectral and hyperspectral imaging, in *International Conference on Precision Agriculture*. [En línea]. Disponible en: http://128.227.177.113/pa/Publications/Kumar_Lee_Ehsani_Albrigo_Yang_Mangan_2010.pdf. Fecha de consulta: 4 de noviembre de 2015.
- Li, X., Lee, W. S., Li, M., Ehsani, R., Mishra, A. R., Yang, C., and Mangan, R. L. (2012). Spectral Difference Analysis and Airborne Imaging Classification for Citrus Greening Infected Trees. *Computers and Electronics in Agriculture*. 83(1): 32-46.
- Li, H., Lee, W. S., Wang, K., Ehsani, R., and Yang, C. (2014). Extended spectral angle mapping (ESAM) for citrus greening disease detection using airborne hyperspectral

imaging. *Precision Agriculture*. 15(2): 162-183.

Li, X., Lee, W. S., Li, M., Ehsani, R., Mishra, A. R., Yang, C., and Mangan, R. L. (2015). Feasibility study on Huanglongbing (citrus greening) detection based on WorldView-2 satellite imagery. *Biosystems Engineering*. 132: 28-38.

Mishra, A., Ehsani, R., Albrigo, G., and Lee, W. S. (2007). Spectral characteristics of citrus greening (Huanglongbing), in *Proceedings 2007 ASABE Annual Meeting*. [En línea]. Disponible en: <http://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=24163>. Fecha de consulta: 4 de noviembre de 2015.

Mishra, A., Karimi, D., Ehsani, R., and Albrigo, L. G. (2011). Evaluation of an active optical sensor for detection of Huanglongbing (HLB) disease. *Biosystems Engineering*. 110(3): 302-309.

Mishra, A. R., Karimi, D., Ehsani, R., and Lee, W. S. (2012). Identification of citrus greening (HLB) using a VIS-NIR spectroscopy technique. *Transactions of the ASABE*. 55(2): 711-720.

Pereira, F. M. V., Milori, D. M. B. P., Pereira-Filho, E. R., Venâncio, A. L., Russo, M. D. S. T., do Brasil-Cardinali, M. C., ..., and Freitas-Astúa, J. (2011). Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. *Computers and electronics in agriculture*. 79(1): 90-93.

Pourreza, A., Lee, W., Raveh, E., Ehsani, R., and Etxeberria, E. (2014). Citrus Huanglongbing detection using narrow-band imaging and polarized illumination. *Transactions of the ASABE*. 57(1): 259-272.

Pourreza, A., Lee, W. S., Ehsani, R., Schueller, J. K., and 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: 221-232.

Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. Á., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., López-Arroyo, J. I., and Flores-Virgen, R. (2013). Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*. 19(1): 15-31.

Sankaran, S., Ehsani, R., and Etxeberria, E. (2010a). Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (greening) in citrus leaves. *Talanta*. 83(2): 574-581.

Sankaran, S., Mishra, A., Ehsani, R., and Davis, C. (2010b). A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture*. 72(1): 1-13.

Sankaran, S. and Ehsani, R. (2011). Visible-near infrared spectroscopy based citrus greening detection: Evaluation of spectral feature extraction techniques. *Crop Protection*. 30(11): 1508-1513.

Sankaran, S., Mishra, A., Maja, J. M., and Ehsani, R. (2011). Visible-near infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing in citrus orchards. *Computers and Electronics in Agriculture*. 77(2): 127-134.

Sankaran, S. and Ehsani, R. (2013). Detection of Huanglongbing-Infected Citrus Leaves Using Statistical Models with a Fluorescence Sensor. *Applied spectroscopy*. 67(4): 463-469.

Sankaran, S., Maja, J. M., Buchanon, S., and Ehsani, R. (2013). Huanglongbing (Citrus Greening) Detection Using Visible, Near Infrared and Thermal Imaging Techniques. *Sensors*. 13(2): 2117-2130.

Santivañez, T., Mora-Aguilera, G., Díaz-Padilla, G., López-Arrollo, J. I. y Vernal-Hurtado, P. (2013). *CITRUS. Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe*. Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 60 Pp.

SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2015a). Situación fitosanitaria actual de HLB en México. SENASICA, en *Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. [En línea]. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4608>. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2015.

SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2015b). Mapa de distribución de HLB en México. SENASICA, en *Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. [En línea]. Disponible en: <http://www.sinavef.gob.mx/MDF/>. Fecha de consulta: 25 de noviembre de 2015.

Texeira, D. D. C., Ayres, J., Kitajima, E. W., Danet, L., Jagoueix-Eveillard, S., Saillard, C., and Bové, J. M. (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.

Wetterich, C. B., Kumar, R., Sankaran, S., Belasque Junior, J., Ehsani, R., and Marcassa, L. G. (2012). A comparative study on application of computer vision and fluorescence imaging spectroscopy for detection of Huanglongbing citrus disease in the USA and Brazil, in *Journal of Spectroscopy*. [En línea]. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/jspec/2013/841738/>. Fecha de consulta: 4 de noviembre de 2015.