

Inductors of plant resistance in the control of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*) trees

Inductores de resistencia vegetal en el control de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón (*Citrus aurantifolia*) mexicano

Jesús Rafael Trinidad-Cruz, Gabriel Rincón-Enríquez, Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar*, Laboratorio de Fitopatología de la línea de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., El Bajío del Arenal, C.P. 45019, Zapopan, Jalisco, México; Ángela Paulina Arce-Leal, Norma Elena Leyva-López, CIIDIR, Unidad Sinaloa, Departamento de Biotecnología Agrícola, Instituto Politécnico Nacional, Bulevar Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, C.P. 81101, San Joaquín, Guasave, Sinaloa, México. *Autor para correspondencia: equinones@ciatej.mx.

Recibido: 11 de Enero, 2019.

Aceptado: 27 de Marzo, 2019.

Trinidad-Cruz JR, Rincón-Enríquez G, Quiñones-Aguilar EE, Arce-Leal AP and Leyva-López NE. 2019. Inductors of plant resistance in the control of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*) trees. Mexican Journal of Phytopathology 37(2): 304-317.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1901-1

Primera publicación DOI: 13 de Abril, 2019.

First DOI publication: April 13, 2019.

Resumen. El Huanglongbing representa un gran reto para su control, por lo que se requiere de alternativas efectivas a la aplicación de insecticidas al insecto vector. La inducción de resistencia sistémica es una alternativa para disminuir el progreso de la enfermedad en árboles infectados. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de inductores

Abstract. The Huanglongbing represents a great challenge for its control, thus, effective alternatives are required to the application of insecticides to the vector insect. The induction of systemic resistance is an alternative to decrease the progress of the disease in infected trees. The objective of this work was to evaluate the effect of inductors of systemic resistance on the concentration of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLAs) in Mexican lemon trees (Lm) under greenhouse conditions. The resistance inductors used were salicylic acid (T1), *Azospirillum brasilense* Cd (T2) and chitosan (T3), applied every 20 days for eight months. The quantification of CLAs was through qPCR. The CLAs concentration was determined at 1, 2, 5 and 8 months after treatment. At 8 months post-treatment, T1 and T3 did not present significant differences in the reduction of CLAs concentration with respect to control without inductor (T4) (6.5×10^3 bacterial

de resistencia sistémica sobre la concentración de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLAs) en árboles de limón mexicano (Lm) en condiciones de invernadero. Los inductores de resistencia utilizados fueron ácido salicílico (T1), *Azospirillum brasilense* Cd (T2) y quitosano (T3), aplicados cada 20 días durante ocho meses. La cuantificación de CLAs fue mediante qPCR. La concentración de CLAs se determinó a los 1, 2, 5 y 8 meses pos-tratamiento. A los 8 meses pos-tratamiento, T1 y T3 no presentaron diferencias postratamiento en la reducción postratamiento de la concentración de CLAs con respecto al control sin inductor (T4) (6.5×10^3 células bacterianas/100 ng de ADN), mientras que T2 disminuyó casi tres veces la concentración de CLAs con respecto al control. La inoculación directa al suelo de *A. brasilense* Cd mostró un efecto significativo en la reducción de la concentración de CLAs en los árboles de Lm en condiciones de invernadero.

Palabras clave: Ácido salicílico, *Azospirillum brasilense*, HLB, quitosano, bacterias promotoras de crecimiento.

México es el segundo productor y exportador a nivel mundial de limón. En el 2017, las exportaciones de limón generaron divisas por 500 millones de dólares (SIAP, 2018). A pesar de lo anterior, las enfermedades debidas a fitopatógenos asociados a los cítricos afectan el rendimiento del cultivo y; por lo tanto, el valor de la producción. El Huanglongbing (HLB), asociada a la α -Proteobacteria *Candidatus Liberibacter* spp., es una enfermedad devastadora de los cítricos y desde su introducción en América ha representado un reto para su control (Wang y Trivedi, 2013). En México, Robles-González *et al.* (2013) reportaron pérdidas en el rendimiento de frutos (kg árbol^{-1}) de hasta el 40%

cells/100 ng of DNA), whereas T2 decreased almost three times the titer of CLAs with respect to control. Direct soil inoculation of *A. brasilense* Cd showed a significant effect in the reduction of CLAs concentration in Lm trees under greenhouse conditions.

Key words: Salicylic acid, *Azospirillum brasilense*, HLB, chitosan, growth promoting bacteria.

Mexico ranks second in lemon production and exportation worldwide. In 2017, lemon exports were valued at US \$500 million (SIAP, 2018). However, diseases caused by phytopathogens associated with citrus affect lemon yield and consequently its production value. Huanglongbing (HLB), associated with α -Proteobacteria *Candidatus Liberibacter* spp., is a devastating citrus disease whose control has posed a challenge since its introduction into the Americas (Wang and Trivedi, 2013). In Mexico, Robles-González *et al.* (2013) reported fruit yield losses (kg tree^{-1}) of up to 40% in Mexican lemon trees showing Huanglongbing symptoms in more than 75% of their treetops compared to asymptomatic trees. The traditional methods for controlling HLB include chemical or biological control of the vector insect, removal of infected trees to reduce inoculum and production of HLB-free patterns and grafts, but these measures have not been completely effective (Hall and Gottwald, 2011). On the other hand, alternative strategies to slow the disease progress and maintain citrus yields have been developed which include improved nutrition programs (Gottwald *et al.*, 2012), antibiotic application (Zhang *et al.*, 2011) and resistance inductors (Hu *et al.*, 2018). Induction of systemic acquired resistance (SAR) or induced systemic resistance (ISR) protects lemon trees against a wide range of phytopathogens or

en árboles de limón mexicano que presentaban síntomas de la enfermedad en más del 75% de su copa con respecto a árboles asintomáticos. El manejo tradicional para el control del HLB consiste en el control químico o biológico del insecto vector, la eliminación de árboles enfermos para reducir el inóculo y la producción de patrones e injertos libres de HLB, sin embargo, estas medidas no han sido completamente efectivas (Hall y Gottwald, 2011). Por otra parte, se han desarrollado estrategias alternativas para retrasar el progreso de la enfermedad y mantener el rendimiento de los cítricos, estas estrategias consisten en programas de nutrición mejorada (Gottwald *et al.*, 2012), la aplicación de antibióticos (Zhang *et al.*, 2011) e inductores de resistencia (Hu *et al.*, 2018). La inducción de resistencia sistémica adquirida (SAR) o inducida (ISR) confieren protección o disminución de la severidad de la enfermedad contra un amplio espectro de fitopatógenos (Walters *et al.*, 2013). El uso de inductores químicos en evaluaciones de campo se ha reportado para el manejo del HLB con efectos significativos en la reducción de la concentración de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLAs) y del progreso de la enfermedad tanto en aspersión foliar (Li *et al.*, 2016) como en inyección directa al tronco (Hu *et al.*, 2018). Hu *et al.* (2018) demostraron en pruebas de campo que la inyección directa al tronco de árboles de naranja dulce 'Hamlin' (*Citrus sinensis*) con ácido salicílico (0.8 g/árbol) disminuyó significativamente la concentración de CLAs en un 65.8% con respecto al control inyectado con agua. El quitosano es bien conocido como un elicitador de la respuesta de los mecanismos de defensa en plantas, tales como, cambios en la acumulación de proteínas PR, enzimas y metabolitos secundarios relacionados con la defensa (Xing *et al.*, 2015). Algam *et al.* (2010) demostraron que el pretratamiento de semillas de tomate cv. Hezou con quitosano (10 mg mL⁻¹), dos semanas antes de la inoculación

reduces the disease severity (Walters *et al.*, 2013). The use of chemical inductors for controlling HLB in field evaluations has been reported to have significant effects on lowering the concentration of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLAs) and slowing the disease progress, both when leaves are sprayed (Li *et al.*, 2016) and when the chemical inductors are directly injected into the trunk of the trees (Hu *et al.*, 2018). In field tests, Hu *et al.* (2018) demonstrated that when salicylic acid (0.8 g/tree) was directly injected into trunks of 'Hamlin' sweet orange trees (*Citrus sinensis*), the CLAs concentration was significantly reduced by 65.8% compared to that of the control injected with water. Chitosan is well known to be a response elicitor of the plants defense mechanisms, such as changes in PR proteins accumulation, enzymes and secondary metabolites associated with defense (Xing *et al.*, 2015). Algam *et al.* (2010) demonstrated that when tomato seeds cv Hezou were pre-treated with chitosan (10 mg mL⁻¹) two weeks before inoculating *Ralstonia solanacearum* Rs-f.91, there was a significant decrease of wilt incidence (31%) compared to that of the control, as well as an increase of PR proteins activity, such as chitinase and β -1,3-glucanase. On the other hand, there are reports on the use of Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) as systemic resistance inductors for controlling HLB. Tang *et al.* (2018) demonstrated that the rate of trees infected with CLAs was reduced by 50% when *C. sinensis* trees roots were irrigated with *Bacillus amyloliquefaciens* GJ1 under greenhouse conditions. The use of salicylic acid, chitosan and PGPB could be a practical alternative for resistance induction in Mexican lemon trees (Lm) in order to control HLB. Based on the above, the objective of this study was to evaluate the use of systemic resistance inductors on the concentration of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Mexican lemon trees under greenhouse conditions.

de *Ralstonia solanacearum* Rs-f.91, redujo significativamente un 31% la incidencia de la marchitez con respecto al control, además del aumento en la actividad de proteínas PR como quitinasa y β -1,3-glucanasa. Por otra parte, el uso de bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP) como inductores de resistencia sistémica para el control del HLB ha sido reportado. Tang *et al.* (2018) demostraron que la tasa de árboles enfermos de CLas disminuyó el 50% cuando se irrigaron las raíces de árboles de *C. sinensis* con *Bacillus amyloliquefaciens* GJ1 en condiciones de invernadero. El uso de ácido salicílico, quitosano y de BPCP puede ser una alternativa práctica para la inducción de resistencia en árboles de limón mexicano para el control del HLB. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de inductores de resistencia sistémica sobre la concentración de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' en árboles de limón mexicano en condiciones de invernadero.

Se utilizaron árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) injertados sobre el portainjerto de limón volkameriano (*Citrus volkameriana*) de nueve meses de edad. Los árboles fueron colocados en macetas de 40 L de capacidad con 25 L de una mezcla de sustrato de turba de esfagno-tierra de río-perlita (3:3:4/v:v). Los árboles permanecieron en condiciones de invernadero con luz natural entre 23-28 °C y 31-45% de HR. Los árboles de limón fueron fertilizados cada 20 días aplicando 3 L de una solución nutritiva que contenía 0.25 g L⁻¹ de sulfato de magnesio, nitrato de calcio y nitrato de potasio, 0.15 mL L⁻¹ de ácido fosfórico y 0.1 g L⁻¹ de micronutrientes (Microfol® Combi P.S.); además cada seis meses se aplicó 40 g de fosfato monoamónico por planta. El control de plagas fue de manera química (AK-20® 2 mL L⁻¹, Muralla Max® 0.5 mL L⁻¹, Oberon® 2 mL L⁻¹ y Talstar® 2 mL L⁻¹) y orgánica previo al experimento (GreenCorp: eBio-luzion® PlusvO 5 mL L⁻¹, Akabrown® 5 mL L⁻¹ y

For the study, Mexican lemon trees (*Citrus aurantifolia*) budded on a 9-month old volkameriana lemon rootstock (*Citrus volkameriana*) were used. The trees were placed in 40 L pots containing 25 L of a mixture of sphagnum peat substrate-silt soil-perlite (3:3:4/v:v). The trees were kept in the greenhouse under natural light at 23-28 °C and 31-45% RH. Fertilizer was applied to the lemon trees every 20 days with 3 L of a nutrient solution containing 0.25 g L⁻¹ of magnesium sulfate, calcium nitrate and potassium nitrate, 0.15 mL L⁻¹ of phosphoric acid and 0.1 g L⁻¹ of micronutrients (Microfol® Combi P.S.); 40 g of monoammonium phosphate per plant were also applied every six months. When necessary, pest control using chemical (AK-20® 2 mL L⁻¹, Muralla Max® 0.5 mL L⁻¹, Oberon® 2 mL L⁻¹ and Talstar® 2 mL L⁻¹) and organic means (GreenCorp: eBio-luzion® PlusvO 5 mL L⁻¹, Akabrown® 5 mL L⁻¹ and Specktron Plus 5 mL L⁻¹) before the experiment was used against insects such as red spiders, leaf miners and aphids. The Mexican lemon trees were inoculated with 2-3 cm long bud graftings (Figures 1A and 1B) obtained from PCR tree twigs positive to CLas showing characteristic HLB symptoms (Bové, 2006), which is considered as an effective pathogen transmission method (Coletta-Filho *et al.*, 2010). The inoculum source was collected in a Mexican lemon tree orchard in Tecmán, Colima, in February 2013.

Before establishing the experiment, the CLas concentration in infected Mexican lemon trees was determined four months after inoculation with bud graftings using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) in order to start the experiment with trees that had a similar concentration and thus homogenize this variable among the different treatments. The fifth mature leaf descending from the apex of seven twigs from each tree was collected. The leaves were frozen with liquid nitrogen, lyophilized for 72 h

Spektron Plus 5 mL L⁻¹) para insectos como araña roja, minador y pulgón cuando fue necesario. Los árboles de limón mexicano fueron inoculados por medio de injertos de yema de 2 a 3 cm de largo (Figuras 1A y 1B) obtenidas de varetas de árboles PCR positivos a CLas con síntomas característicos del HLB (Bové, 2006), considerado como un método eficiente de transmisión del patógeno (Coletta-Filho *et al.*, 2010). La fuente de inóculo se recolectó en febrero de 2013 en una huerta de limón mexicano en Tecomán, Colima.

Previo al establecimiento del experimento, a los árboles de limón mexicano infectados a través de la inoculación con injertos de yema, cuatro meses después se les determinó la concentración de CLas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) del ADN en tiempo real con la finalidad de iniciar el experimento con árboles que presentaran una concentración similar y así homogenizar esta variable entre los diferentes tratamientos. De cada árbol se recolectó la quinta hoja madura descendente del ápice de siete varetas. Las hojas fueron congeladas con nitrógeno líquido, liofilizadas durante 72 h y pulverizadas en un molino TissueLyser II (QIAGEN, Hilden, Germany) durante 1 min a 30 Hz. 20 mg del tejido liofilizado y molido fueron utilizados para la extracción de ADN genómico por el método de CTAB previamente descrito por Zhang *et al.* (1998) con ligeras modificaciones (Arratia-Castro *et al.*, 2014). La concentración y pureza del ADN fue evaluado con un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Las muestras de ADN fueron ajustadas a 20 ng μL^{-1} y almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso. Para la cuantificación de CLas, todos los ensayos de qPCR fueron realizados mediante la combinación de PCR anidado y PCR TaqMan® en un solo tubo (Lin *et al.*, 2010). Todos los ensayos de qPCR fueron realizados en un

and ground in a TissueLyser II mill (QIAGEN, Hilden, Germany) for 1 min at 30 Hz. 20 mg of the lyophilized and ground tissue were used for genomic DNA extraction and the CTAB method was followed as previously described by Zhang *et al.* (1998) with slight modifications (Arratia-Castro *et al.*, 2014). The DNA concentration and purity were evaluated using a NanoDrop ND-2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). The DNA samples were adjusted to 20 ng μL^{-1} and stored at -20 °C until they were used. To quantify CLas, all the qPCR assays were performed using the combination of nested PCR and TaqMan® PCR in a single tube (Lin *et al.*, 2010). All the qPCR assays were performed in a 7500 Fast Real-Time PCR System thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). Two technical replications out of four biological replications were used for the qPCR assays. Each qPCR reaction was carried out in a 25 μL volume containing 12.5 μL of TaqMan® master mixture (ABI, Foster City, CA), 0.5 μL of the initial primers Las O-F and Las O-R (0.5 pmol), 0.2 μL of the internal primers Las I-F and Las I-R (20 pmol), 0.5 μL of the Las-P TaqMan® probe (10 pmol), 5 μL of DNA (100 ng) and 5.6 μL of ultrapure water. The nested PCR was carried out as follows: 50 °C for 2 min and 95 °C for 2 min, followed by 20 cycles of 95 °C for 30 s, 67 °C for 45 s and 72 °C for 45 s, and then 35 cycles of 95 °C for 30 s, 57 °C for 45 s and 72 °C for 45 s. The fluorescence signal was recorded at the end of each 57 °C cycle during the second PCR round (Lin *et al.*, 2010). The Ct values were converted to CLas cell concentration using a standard curve previously described by Lin *et al.* (2010) with the Software 7500 System SDS version 2.0.5. Once the concentration of initial CLas per tree was determined, trees with 610-1700 bacterial cells/100 ng of DNA were selected and randomly distributed among the different

termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). Dos repeticiones técnicas de cuatro repeticiones biológicas fueron utilizadas para los ensayos de qPCR. Cada reacción de qPCR fue realizada en un volumen de 25 µL que consistió en 12.5 µL de TaqMan® master mixture (ABI, Foster City, CA), 0.5 µL de iniciadores externos Las O-F y Las O-R (0.5 pmol), 0.2 µL de iniciadores internos Las I-F y Las I-R (20 pmol), 0.5 µL de la sonda Las-P TaqMan® (10 pmol), 5 µL de ADN (100 ng) y 5.6 µL de agua ultra pura. Las condiciones de la PCR anidada fueron: 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 2 min, seguido de 20 ciclos de 95 °C durante 30 s, 67 °C durante 45 s y 72 °C durante 45 s, posteriormente 35 ciclos de 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 45 s y 72 °C durante 45 s. La señal de fluorescencia se registró al final de cada paso de 57 °C durante la segunda ronda de PCR (Lin *et al.*, 2010). Los valores de Ct fueron convertidos en concentración de células de CLas utilizando una curva estándar descrita previamente por Lin *et al.* (2010) mediante el Software 7500 System SDS versión 2.0.5. Después de determinar la concentración inicial de CLas por árbol, se seleccionaron árboles con concentraciones de entre 610 a 1700 células bacterianas/100 ng de ADN y se distribuyeron aleatoriamente entre los diferentes tratamientos (cuatro árboles por tratamiento). En la Figura 1C, se muestra el experimento en invernadero que se realizó de junio de 2013 a febrero de 2014.

Los inductores de resistencia probados en condiciones de invernadero fueron quitosano (0.01%), ácido salicílico (5 mM) y *Azospirillum brasilense* Cd (2×10^7 ufc g⁻¹ de sustrato). El quitosano (quitosano $\geq 75\%$ desacetilación, Sigma-Aldrich®) fue preparado como stock al 1%: 5 g de quitosano fueron disueltos en 100 mL de ácido acético al 1% y después el volumen fue ajustado a 500 mL con ácido acético al 1%. La solución stock de quitosano fue

treatments (four trees per treatment). Figure 1C shows the experiment conducted in the greenhouse from June 2013 to February 2014.

The resistance inductors tested under greenhouse conditions were chitosan (0.01%), salicylic acid (5 mM) and *Azospirillum brasilense* Cd (2×10^7 cfu g⁻¹ of substrate). Chitosan (chitosan $\geq 75\%$ deacetylation, Sigma-Aldrich®) was prepared as 1% stock: 5 g of chitosan were diluted in 100 mL of 1% acetic acid and then the volume was adjusted to 500 mL with 1% acetic acid. The chitosan stock solution was adjusted to 5.75 pH (NaOH 1M) and sterilized at 121 °C for 20 min. The salicylic acid was prepared as a stock solution at 75 mM. Chitosan and salicylic acid were individually applied on leaves with a 5.5 L manual sprinkler (Swissmex®), 15-20 mL per plant (Figure 1D). *Azospirillum brasilense* Cd was grown in NFb broth (nitrogen-free broth) (Döbereiner *et al.*, 1976) at 30 °C and 200 rpm for 16 h. The solution containing rhizobacteria was adjusted to a concentration of 2×10^7 cfu g⁻¹ substrate and then directly applied to the substrate in the plant's rhizosphere. The inductors were applied every 20 days for eight months. A completely randomized design with four replications per treatment was used for the experiment. The treatments were as follows: T1 salicylic acid; T2 *Azospirillum brasilense* Cd; T3 chitosan, and T4 no inductor. The effect of the resistance inductors to reduce the pathogen level was evaluated by determining the CLas concentration using qPCR, as previously described, at 1, 2, 5 and 8 months after treatment. The CLas concentration variable was analyzed through an analysis of variance (ANOVA), and a means comparison with the least significant difference test (LSD) using the StatGraphics Centurion XV statistical software (StatPoint Inc., 2005).

To evaluate the effect on the decrease of CLas concentration in Mexican lemon trees, two



Figura 1. Inoculación de la bacteria ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLAs) en plantas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) por injerto de yema (A y B). Experimento de inductores de resistencia en la concentración de CLAs en condiciones de invernadero (C) y forma en que se ve la aplicación foliar de las soluciones de inductores (D).
Figure 1. Inoculation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLAs) bacterium in Mexican lemon plants (*Citrus aurantifolia*) using bud graftings (A and B). Resistance inductors experiments in CLAs concentration under greenhouse conditions (C) and leaves showing the application of inductors solutions (D).

ajustada a un pH de 5.75 (NaOH 1M) y esterilizada a 121 °C durante 20 min. El ácido salicílico fue preparado como solución stock a 75 mM. El quitosano y ácido salicílico fueron aplicados de manera foliar con un aspersor manual (Swissmex®) de 5.5 L de capacidad de manera individual de entre 15 a 20 mL por planta (Figura 1D). *Azospirillum brasilense* Cd fue crecida en caldo NFb (nitrogen free broth) (Döbereiner *et al.*, 1976) durante 16 h a 30 °C a 200 rpm. La solución con la rizobacteria fue ajustada a una concentración 2×10^7 ufc g^{-1} de sustrato y se aplicó de manera directa al sustrato en la rizosfera de las plantas. Los inductores fueron

inductores were applied on leaves (salicylic acid and chitosan) and *A. brasilense* Cd to the soil every 20 days during 8 months under greenhouse conditions. No significant statistical differences were found in the CLAs concentration (data not shown) before starting the experiment, so all the treatments started with a similar concentration. However, at the end of the first month after treatment, we observed differences among treatments regarding the rate at which the CLAs concentration had increased (Figure 2). Two months after treatment, T3 chitosan showed the lowest CLAs concentration (643 bacterial cells/100 ng of DNA) compared to T4

aplicados cada 20 días durante ocho meses. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes: T1 ácido salicílico; T2 *Azospirillum brasilense* Cd; T3 quitosano y T4 sin inductor. El efecto de los inductores de resistencia en la disminución del patógeno fue evaluado mediante la determinación de la concentración de CLas por qPCR como se describió anteriormente a los 1, 2, 5 y 8 meses postratamiento. La variable concentración de CLas fue analizada mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) utilizando el paquete estadístico StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005).

Para evaluar el efecto en la disminución de la concentración de CLas en los árboles de limón mexicano, dos inductores fueron aplicados de manera foliar (ácido salicílico y quitosano) y *A. brasilense* Cd al suelo cada 20 días durante 8 meses en condiciones de invernadero. Previo al inicio del experimento, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en la concentración de CLas (datos no mostrados), por lo que, todos los tratamientos iniciaron con concentraciones similares, sin embargo, al concluir el primer mes postratamiento se empezaron a observar diferencias entre los tratamientos en la velocidad de incremento en la concentración de CLas (Figura 2). A los 2 meses postratamiento, el T3 quitosano presentó la menor concentración de CLas (643 células bacterianas/100 ng de ADN) con respecto al T4 sin inductor. A los 5 meses postratamiento, los tres inductores de resistencia aplicados mostraron una reducción significativa (LSD, $p \leq 0.05$) en la concentración de CLas de poco más de dos veces con respecto al T4 sin inductor (Figura 2). Finalmente, a los 8 meses postratamiento el T3 *Azospirillum brasilense* Cd mostró un efecto significativo en la reducción del incremento de la concentración de

without inductor. Five months after treatment, the three resistance inductors that were used showed a significant decrease (LSD, $p \leq 0.05$) in CLas concentration of a little more than twice compared to T4 with no inductor (Figure 2). Finally, at eight months after treatment, T3 *Azospirillum brasilense* Cd showed a significant effect on the decrease of CLas concentration of almost three times less than T4 with no inductor (Figure 2). T3 chitosan showed a decrease effect on CLas concentration at 2 and 5 months after treatment, but at 8 months after treatment, the CLas concentration in this treatment was statistically similar to that of T4 with no inductor. Regarding the treatments with no inductor (T4), the progress of CLas concentration increased over time but no decrease was observed. At the end of the experiment, the average value of CLas concentration was of 6499 bacterial cells/100 ng of DNA for T4 with no inductor, while that for the three treatments with inductors was of 2253-6463 bacterial cells/100 ng of DNA (Figure 2). The application of chemical or biological inductors is known to boost the systemic or local resistance when a plant is confronted by a phytopathogen and this decreases the disease severity (Walters *et al.*, 2013). In an experiment under field conditions, Hu *et al.* (2018) demonstrated that when salicylic acid (0.8 g/tree) was directly injected into sweet orange trees (*C. sinensis*), there was a significant reduction in CLas concentration compared with that of the control treatment injected with water. In this study, applying salicylic acid on leaves reduced the CLas concentration 5 months after treatment; however, 8 months after treatment, even when the concentration continued to decrease, the treatment did not exceed the treatment with *Azospirillum* in the lemon trees rhizosphere, where significant statistical differences were noted compared to those of the control with no inductor (T4). To this regard, Li *et al.* (2017) demonstrated that in CLas, the

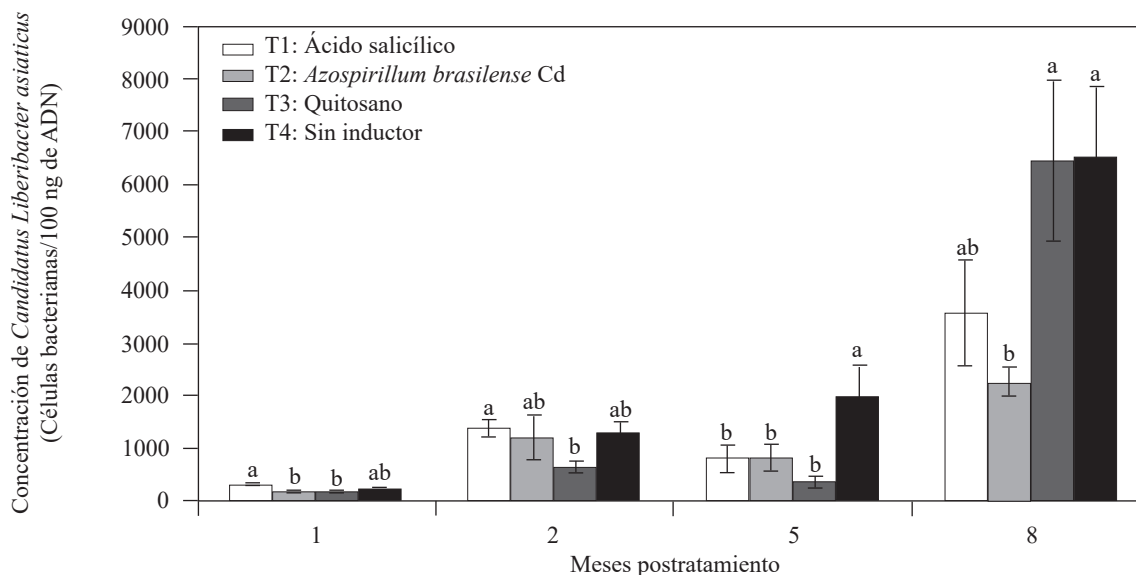


Figura 2. Efecto de inductores de resistencia y *Azospirillum brasilense* en la concentración de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ en arboles de limón mexicano en condiciones de invernadero. Las barras en cada rectángulo indican el error estándar (n=4 repeticiones); valores con la misma letra en cada rectángulo por mes son estadísticamente iguales (LSD, $p \leq 0.05$).

Figure 2. Effect of resistance inductors and *Azospirillum brasilense* in the ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ concentration in Mexican lemon trees under greenhouse conditions. The bars in each rectangle indicate the standard error (n=4 replications); values with the same letter in each rectangle per month are statistically equal (LSD, $p \leq 0.05$).

CLas de casi tres veces menos que el T4 sin inductor (Figura 2). El T3 quitosano presentó un efecto de reducción en la concentración de CLas a los 2 y 5 meses postratamiento, sin embargo, a los 8 meses postratamiento la concentración de CLas en este tratamiento fue estadísticamente similar al T4 sin inductor. Con respecto al tratamiento sin aplicación de inductor (T4), el progreso de la concentración de CLas fue incrementado a través del tiempo sin manifestarse alguna reducción. Al final del experimento, el valor promedio para la concentración de CLas fue de 6499 células bacterianas/100 ng de ADN para el T4 sin inductor, mientras que para los tres tratamientos con inductores fue de entre 2253 a 6463 células bacterianas/100 ng de ADN (Figura 2). Se conoce que la aplicación de inductores químicos o biológicos proveen de un impulso a la resistencia sistémica o local cuando la planta es con-

sahA gene encodes the synthesis of the salicylate hydroxylase enzyme that is able to degrade the salicylic acid and its analogous (Li *et al.*, 2017). Li *et al.* (2017) also demonstrated that when salicylic acid (1 mM) was applied to sweet orange trees, both healthy and infected with CLAs, there was an increase in *PR* gene expression and salicylic acid accumulation. However, the *PR* expression and the salicylic acid accumulation was significantly lower in trees infected with CLAs, while the application of dichloro-isonicotinic and benzothiadiazol (SAR inductors) showed a similar pattern of *PR* expression among trees healthy and infected with CLAs; these molecules are not degraded by the salicylate hydroxylase enzyme (Li *et al.*, 2017). Unlike data reported by Hu *et al.* (2018), the direct injection of salicylic acid into the tree trunk can overcome degradation caused by the salicylate hydroxylase

frontada contra algún fitopatógeno, disminuyendo la severidad de la enfermedad (Walters *et al.*, 2013). En condiciones de campo, Hu *et al.* (2018) demostraron que la aplicación de ácido salicílico (0.8 g/árbol) vía inyección al tronco en árboles de naranja dulce (*C. sinensis*) disminuyó significativamente la concentración de CLas con respecto al tratamiento control (inyección con agua). En este estudio, la aplicación foliar de ácido salicílico redujo la concentración de CLas a los 5 meses postratamiento, sin embargo, a los 8 meses postratamiento, aunque el efecto de reducción de la concentración continuó, este tratamiento no superó al tratamiento con *Azospirillum* en la rizosfera de limón, donde se encontraron diferencias estadísticas significativas con respecto al control sin inductor (T4). Al respecto, Li *et al.* (2017) demostraron que en CLas, el gen *sahA* codifica la síntesis de la enzima salicilato hidroxilasa capaz de degradar el ácido salicílico y sus análogos (Li *et al.*, 2017). Además, Li *et al.* (2017) demostraron que la aplicación foliar de ácido salicílico (1 mM) en árboles de naranja dulce, sanos e infectados con CLas, incrementó la expresión de genes *PR* y la acumulación de ácido salicílico. Sin embargo, la expresión de los genes *PR* y la acumulación de ácido salicílico fue significativamente menor en los árboles infectados con CLas, mientras que la aplicación foliar de ácido 2,6-dicloroisonicotínico y benzotiadiazol (inductores de SAR) mostró un patrón de expresión de los genes *PR* similar entre los árboles sanos e infectados con CLas, estas moléculas no son degradadas por la enzima salicilato hidroxilasa (Li *et al.*, 2017). A diferencia de lo reportado por Hu *et al.* (2018), la inyección directa al tronco del ácido salicílico puede superar la degradación por la enzima salicilato hidroxilasa, esto fue demostrado con el incremento en la expresión de los genes *PR-1* y *PR-2* en árboles de naranja tratados con ácido salicílico con respecto al control inyectado con agua. Al respecto Hu *et al.*

enzyme. This was demonstrated by an increase of the *PR-1* and *PR-2* genes expression in orange trees treated with salicylic acid compared to that of the control injected with water. To this regard, Hu *et al.* (2018) mentioned that the application of salicylic acid has some disadvantages such as degradation and low absorption of salicylic acid by the plant, which could be what occurred in this study.

On the other hand, although chitosan has demonstrated to be able to induce plant defense mechanisms, its action mechanism to induce resistance has not been completely elucidated. It also should be noted that the response may vary depending on the pathosystem and other factors (Orzali *et al.*, 2017) such as the type of chitosan and the way the solution is prepared and stored. In this study, the application *A. brasilense* Cd showed a reduction in the CLas concentration. The induced systemic resistance (ISR) by plant growth-promoting bacteria (PGPB) could be an alternative for controlling HLB. Tang *et al.* (2018) used healthy navel orange leaves (*C. Sinensis*) cv. 'Newhall' to isolate a potential biological control agent for HLB identified as *B. amyloliquefaciens* GJ1. For tests conducted in the greenhouse navel orange plants infected with HLB were irrigated with 1.5 L of *B. amyloliquefaciens* GJ1 ($OD_{600} \approx 1$) solution every week; after seven irrigations, the number of plants infected by the pathogen was reduced by 50% (Tang *et al.*, 2018). It has been demonstrated that the ability to induce plant resistance or tolerance depends on the PGPB (Jain *et al.*, 2014). To this regard, Riera *et al.* (2018) tested the efficiency of seven bacterial isolates inoculated in 'Duncan' grapefruit trees root to control citrus canker, and found that the *Burkholderia territorri* A63, *B. metallica* A53 and *Pseudomonas geniculata* 95 isolates significantly reduced the disease severity compared to that of the control plants. On the other hand, Zhang *et al.* (2017) found that when sweet

(2018) menciona que la aplicación foliar de ácido salicílico presenta algunas desventajas como la degradación y la baja absorción del mismo ácido, por parte de la planta, lo que podría estar ocurriendo en los resultados de este trabajo.

Por otra parte, se ha demostrado que el quitosano tiene la capacidad de inducir los mecanismos de defensa vegetal; sin embargo, su mecanismo de acción en la inducción de resistencia no ha sido completamente elucidado, además de que puede variar la respuesta dependiendo del patosistema, así como de otros factores (Orzali *et al.*, 2017) como el tipo de quitosano y la forma de preparación o almacenamiento de la solución. En este estudio, la aplicación de *A. brasilense* Cd mostró una reducción en la concentración de CLAs. La resistencia sistémica inducida (ISR) por bacterias promotoras de crecimiento de plantas (BPCP) podría proveer una alternativa para el control del HLB. Tang *et al.* (2018) aislaron, a partir de hojas sanas de naranja navel (*C. sinensis*) cv. 'Newhall', un potencial agente de control biológico para el HLB identificado como *B. amyloliquefaciens* GJ1. En pruebas en invernadero, plantas de naranja navel enfermas de HLB fueron irrigadas con 1.5 L de la solución de *B. amyloliquefaciens* GJ1 ($OD_{600} \approx 1$) cada semana, después de siete irrigaciones, *B. amyloliquefaciens* GJ1 redujo el 50% de plantas con presencia del patógeno (Tang *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la capacidad para inducir resistencia o tolerancia en las plantas depende de la BPCP (Jain *et al.*, 2014). Al respecto, Riera *et al.* (2018) probaron la efectividad de siete aislamientos bacterianos inoculados a las raíces de árboles 'Duncan' grapefruit en el control del cancro de los cítricos, encontrando que los aislados *Burkholderia territorri* A63, *B. metallica* A53 y *Pseudomonas geniculata* 95 redujeron significativamente la severidad de la enfermedad con respecto a las plantas control. Por otro lado, Zhang *et al.* (2017) encontraron que, al inocular árboles

orange cv. 'Valencia' trees were inoculated with *B. metallica* A53 and *B. territorri* A63 bacteria, the relative expression of the *PRI*, *PR2* and *SAM* genes increased, depending on the bacterium and the time after inoculation. In this context, to continue this study it would be important to evaluate if the reduction in the CLAs concentration produced by *A. brasilense* Cd in Mexican lemon trees is linked to the expression of genes related to the plant defense mechanisms.

In our experiment, some of the pest control products that were applied, when necessary, to all the lemon trees during the first four months before starting the experiment could have contributed to the induction of resistance. Previous studies have demonstrated that some of the components of those products are able to induce resistance, for example, imidacloprid (Francis *et al.*, 2009), some essential oils (Banani *et al.*, 2018) and plant extracts (Fought and Kuć, 1996; Khoa *et al.*, 2017). Despite the above, in our experiment the treatment with no inductor (T4) did not have a significant effect on the reduction of CLAs after eight months during which these products were not applied.

In conclusion, the salicylic acid and chitosan evaluated as resistance inducers that were applied to leaves were less effective in reducing the increase rate of the 'Candidatus Liberibacter asiaticus' concentration in Mexican lemon trees. The inoculation of *A. brasilense* Cd in Mexican lemon trees had a significant effect on the decrease of the CLAs concentration under greenhouse conditions. The induction of systemic resistance through PGPB as *A. brasilense* in citrus could be an alternative for mitigating the effects of HLB and maintain lemon tress productivity for a longer time by slowing the disease progress. We suggest that *A. brasilense* Cd be inoculated in citrus, under field conditions, in order to evaluate resistance induction through the expression of genes involved in plant defense in

de naranjo dulce cv. Valencia con las bacterias *B. metallica* A53 y *B. territorii* A63 se incrementó la expresión relativa de genes *PR1*, *PR2* y *SAM*, dependiendo de la bacteria y el tiempo después de la inoculación. Bajo este contexto, para la continuación de este estudio sería importante evaluar si la disminución de la concentración de CLas en los árboles de limón mexicano por efecto de *A. brasilense* Cd, está relacionada con la expresión de genes relacionados con los mecanismos de defensa vegetal. En nuestro experimento, algunos productos utilizados para el control de plagas aplicados a todos los árboles de limón durante los primeros cuatro meses cuando fue necesario, previo al inicio del experimento, podrían haber contribuido a la inducción de resistencia. Estudios previos han demostrado que algunos componentes de estos productos son capaces de inducir resistencia como el imidacloprid (Francis *et al.*, 2009), algunos aceites esenciales (Banani *et al.*, 2018) y extractos vegetales (Fought y Kuć, 1996; Khoa *et al.*, 2017). A pesar de lo anterior, en nuestro experimento el tratamiento sin inductor (T4) no mostró un efecto significativo en la disminución de CLas después de 8 meses de no haberse aplicado estos productos.

En conclusión, el ácido salicílico y el quitosano evaluados como inductores de resistencia, aplicados de manera foliar, presentaron menor efectividad en disminuir la velocidad de incremento de la concentración de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ en limón mexicano. La inoculación de *A. brasilense* Cd en la rizosfera de limón mexicano mostró un efecto significativo en la reducción de la concentración de CLas en condiciones de invernadero. La inducción de resistencia sistémica a través de BPCP como *A. brasilense* en cítricos podría ser una alternativa para mitigar los efectos del HLB manteniendo la productividad del árbol por más tiempo al reducir el progreso de la enfermedad. Se sugiere la inoculación de *A. brasilense* Cd en

infected trees and thus show the reduction in CLas concentration.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Fondo Mixto of the state of Michoacan and to CONACYT for funding the project “Efecto de distintos bioprotectores en el desarrollo de la enfermedad del HLB en limón mexicano del estado de Michoacán” (MICH-2012-03-193066) (Effect of different bioprotectors on the HLB disease (HuanLongBing) development in Mexican lemon in the state of Michoacán).

~~~~~ End of the English version ~~~~~

cítricos, en condiciones de campo, para evaluar la inducción de resistencia a través de la expresión de genes implicados en la defensa vegetal en árboles enfermos y mostrar la disminución de la concentración de CLas.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto del gobierno del estado de Michoacán y al CONACYT por el financiamiento del Proyecto: “Efecto de distintos bioprotectores en el desarrollo de la enfermedad del HLB (HuanLongBing) en limón mexicano del estado de Michoacán” (MICH-2012-03-193066).

#### LITERATURA CITADA

- Algam SAE, Xie G, Li B, Yu S, Su T and Larsen J. 2010. Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of Ralstonia wilt in tomato. *Journal of Plant Pathology* 92:593-600. Disponible en línea: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/303>
- Arratia-Castro AA, Santos-Cervantes ME, Fernández-Herrera E, Chávez-Medina JA, Flores-Zamora GL, Camacho-Beltrán E, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE. 2014. Occurrence of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection* 62:144-151. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>

- Banani H, Olivieri L, Santoro K, Garibaldi A, Gullino ML and Spadaro D. 2018. Thyme and savory essential oil efficacy and induction of resistance against *Botrytis cinerea* through priming of defense responses in apple. *Foods* 7:11. <http://dx.doi.org/10.3390/foods7020011>
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37. Disponible en línea: <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/828>
- Coletta-Filho HD, Carlos EF, Alves KCS, Pereira MAR, Boscaroli-Camargo RL, de Souza AA and Machado MA. 2010. *In planta* multiplication and graft transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 126:53-60. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9523-2>
- Döbereiner J, Marriel IE and Nery M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology* 22:1464-1473. <http://dx.doi.org/10.1139/m76-217>
- Fought L and Kuć JA. 1996. Lack of specificity in plant extracts and chemicals as inducers of systemic resistance in cucumber plants to anthracnose. *Journal of Phytopathology* 144:1-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.1996.tb01479.x>
- Francis MI, Redondo A, Burns JK and Graham JH. 2009. Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *European Journal of Plant Pathology* 124:283-292. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-008-9415-x>
- Gottwald TR, Graham JH, Irey MS, McCollum TG and Wood BW. 2012. Inconsequential effect of nutritional treatments on Huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection* 36:73-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.004>
- Hall DG and Gottwald TR. 2011. Pest management practices aimed at curtailing citrus Huanglongbing disease. *Outlooks on Pest Management* 22:189-192. <http://dx.doi.org/10.1564/22aug11>
- Hu J, Jiang J and Wang N. 2018. Control of citrus Huanglongbing via trunk injection of plant defense activators and antibiotics. *Phytopathology* 108:186-195. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0175-R>
- Jain S, Vaishnav A, Kasotia A, Kumari S and Choudhary DK. 2014. Plant growth-promoting bacteria elicited induced systemic resistance and tolerance in plants. Pp:109-132. *In: Ahmad P and Rasool S (eds.). Emerging technologies and management of crop stress tolerance.* Academic Press. San Diego, USA. 514p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800875-1.00005-3>
- Khoa NĐ, Xà TV and Hào LT. 2017. Disease-reducing effects of aqueous leaf extract of *Kalanchoe pinnata* on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* involve induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100:57-66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2017.06.005>
- Li J, Pang Z, Trivedi P, Zhou X, Ying X, Jia H and Wang N. 2017. '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' encodes a functional Salicylic Acid (SA) Hydroxylase that degrades SA to suppress plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30:620-630. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0257-R>
- Li J, Trivedi P and Wang N. 2016. Field evaluation of plant defense inducers for the control of citrus Huanglongbing. *Phytopathology* 106:37-46. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-08-15-0196-R>
- Lin H, Chen C, Doddapaneni H, Duan Y, Civerolo EL, Bai X and Zhao X. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 81:17-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.014>
- Orzali L, Corsi B, Forni C and Riccioni L. 2017. Chitosan in agriculture: A new challenge for managing plant disease. Pp:17-36. *In: Shalaby E (ed.). Biological activities and application of marine polysaccharides.* IntechOpen. Rijeka, Croatia. 318p. <http://dx.doi.org/10.5772/66840>
- Riera N, Wang H, Li Y, Li J, Pelz-Stelinski K and Wang N. 2018. Induced systemic resistance against citrus canker disease by rhizobacteria. *Phytopathology* 108:1038-1045. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-17-0244-R>
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramirez MA, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI and Flores-Virgen R. 2013. Huanglongbing (HLB) disease in mexican lime trees [*Citrus aurantiifolia* (Christm) Swingle] and its dispersion in Colima state, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19:15-31. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Atlas agroalimentario 2012-2018, 1ª Edición. México, Distrito Federal. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018) (consulta, marzo 2019).
- StatPoint Inc. 2005. StatGraphics Centurion XV version 15.02.06. Warrenton, Virginia, USA. [www.statgraphics.com](http://www.statgraphics.com).
- Tang J, Ding Y, Nan J, Yang X, Sun L, Zhao X and Jiang L. 2018. Transcriptome sequencing and ITRAQ reveal the detoxification mechanism of *Bacillus* GJ1, a potential biocontrol agent for Huanglongbing. *PLoS ONE* 13:e0200427. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200427>
- Walters DR, Ratsep J and Havis ND. 2013. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany* 64:1263-1280. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert026>
- Wang N and Trivedi P. 2013. Citrus Huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology* 103:652-665. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>
- Xing K, Zhu X, Peng X and Qin S. 2015. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 35:569-588. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3>
- Zhang MQ, Powell CA, Zhou LJ, He ZL, Stover E and Duan YP. 2011. Chemical compounds effective against the citrus Huanglongbing bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in planta. *Phytopathology* 101:1097-1103. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0262>
- Zhang YP, Uyemoto JK and Kirkpatrick BC. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71:45-50. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)



Zhang Y, Xu J, Riera N, Jin T, Li J and Wang N. 2017. Huanglongbing impairs the rhizosphere-to-rhizoplane enrichment process of the citrus root-associated microbiome. *Microbiome* 5:97. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-017-0304-4>