

# REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

*MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY*

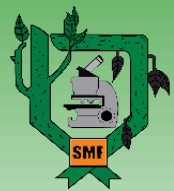
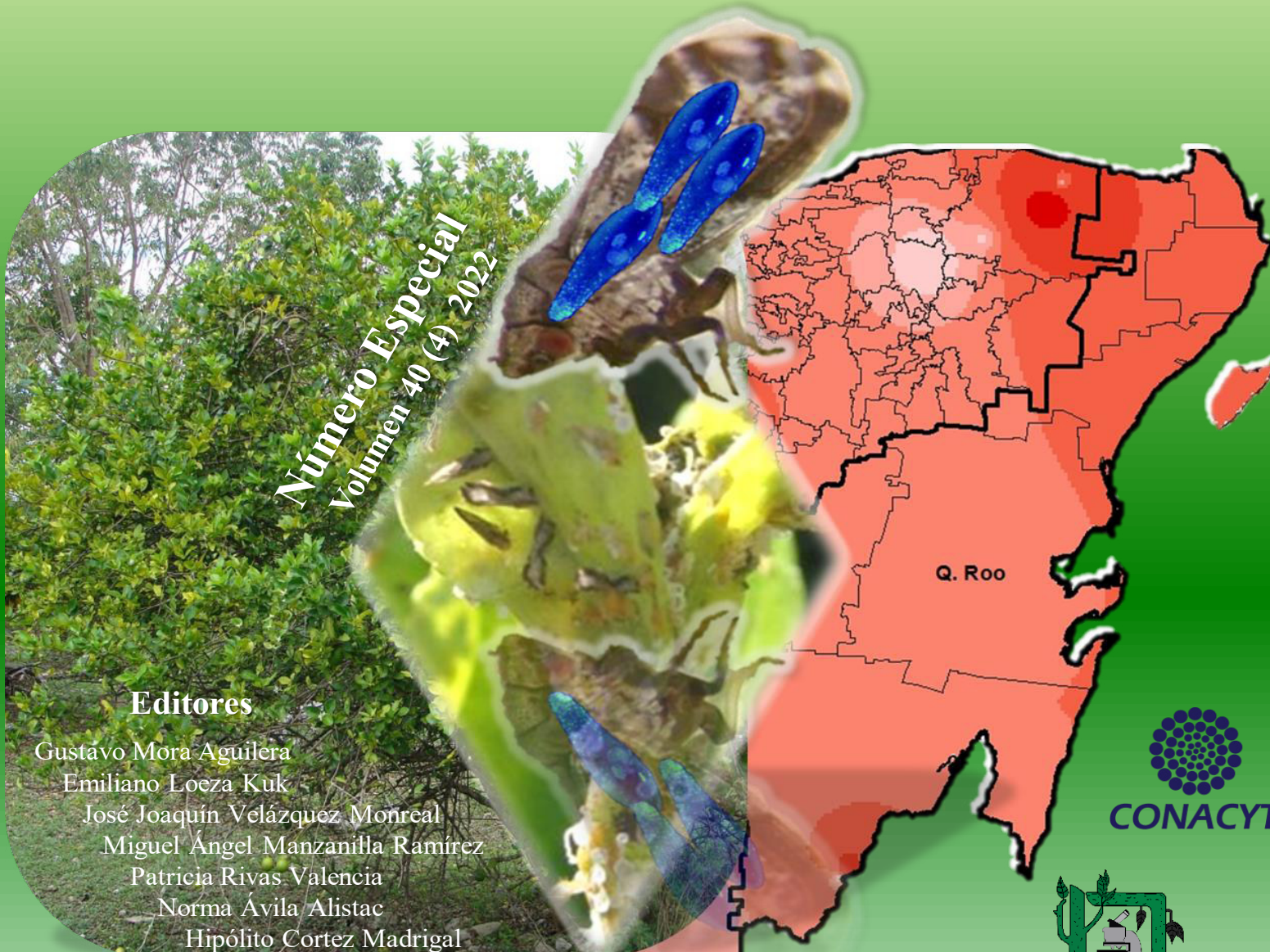
*Fully Bilingual*

## HLB DE LOS CÍTRICOS: EL PATÓGENO, EPIDEMIOLOGÍA Y MANEJO

*Número Especial  
Volumen 40 (4) 2022*

### Editores

Gustavo Mora Aguilera  
Emiliano Loeza Kuk  
José Joaquín Velázquez Monreal  
Miguel Ángel Manzanilla Ramírez  
Patricia Rivas Valencia  
Norma Ávila Alistac  
Hipólito Cortez Madrigal



**Editoras(es) de Número Especial \* Editors the Special Number**

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS  
Dr. Emiliano Loeza Kuk, INIFAP  
Dr. José Joaquín Velázquez Monreal, INIFAP  
Dr. Miguel Ángel Manzanilla Ramírez, INIFAP  
Dra. Patricia Rivas Valencia, INIFAP  
Dra. Norma Ávila Alistac, UACH  
Dr. Hipólito Cortez Madrigal, IPN

**Editoras(es) Extenos del Número Especial \* External Editors of the Special Number**

Dra. Laura Izascum Pérez Valencia, TECMM  
Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa, COLPOS  
M.C. Sergio Alberto Curti Díaz, INIFAP  
Dr. Juan Antonio Villanueva Jiménez, COLPOS

**Editor en Jefe \* Editor in Chief**

Dr. Gustavo Mora Aguilera, COLPOS

**Editora Técnica \* Technical Editor**

Dra. Norma Ávila Alistac, UACH

**Composición Web y RMFito \* Web and RMFito Composition**

M.C. Oscar Eder Flores Colorado, LANREF, COLPOS

**Editoras Adjuntas \* Senior Editors**

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada, UACH  
Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía, UMSNH  
Dra. Irasema del Carmen Vargas Arispuro, CIAD

**Comité Editorial Internacional \* International Editorial Advisory Board**

Dr. Rodrigo Valverde, LSU AgCenter, USA  
Dr. Sami Jorge Micheref, UFCA, Brasil  
Dr. Miguel Dita Rodríguez, EMBRAPA, Br.  
Dr. Vicente Febres, UF, USA

---

**Diseño portada:** Árbol de limón Mexicano con amarillamiento por HLB (izquierda), adultos e inmaduros de *Diaphorina citri* en brote de cítrico y adulto vector emulando carga de inóculo de CLas (centro), e intensidad epidémica del HLB mediante índice multivariado en la Península de Yucatán (izquierda). Ver secciones del Patógeno y Epidemiología en este Número Especial.

**Créditos de diseño:** Acevedo-Sánchez, Mora-Aguilera G y Ávila-Alistac N.

- Identification of salicylic acid binding proteins in the *Candidatus Liberibacter asiaticus* infected *Citrus latifolia* transcriptome** \* Identificación de proteínas de unión al ácido salicílico en el transcriptoma de *Citrus latifolia* infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. 1  
Santillán-Mendoza R, Rodríguez-Peralta ED, Estrella-Maldonado HJ, Rodríguez-Quibrera CG, Matilde-Hernández C, Adame-García J, González-Oviedo NA and Flores-de la Rosa FR.
- Elicitor and plant nutrition effects on *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime** \* Efecto de elicitores y nutrición sobre *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón mexicano. 13  
Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, Mendoza-Hernández CS and Pérez-Valencia LI.
- HLB vector control with plant extracts and biorational products in Mexican lemon** \* Control del vector del HLB con extractos vegetales y productos biorracionales en limón mexicano. 20  
Miranda-Salcedo MA, Miranda-Ramírez JM, Perales-Segovia C and Miranda-Medina D.
- Genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strains from the pacific center in Mexico** \* Diversidad genética de cepas de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ en cítricos del Pacífico centro de México. 29  
Manzo-Sánchez G, Romero-Parra F, Guzmán-González S, Buenrostro-Nava MT, Orozco-Santos M, Velázquez-Monreal JJ and Manzanilla-Ramírez MA.
- Candidatus Liberibacter solanacearum*-tomato as an experimental system for the study of genes associated with Huanglongbing in Mexican lime** \* *Candidatus Liberibacter solanacearum*-tomate como modelo experimental para el estudio de genes asociados al Huanglongbing en limón mexicano. 43  
Hernández-Peraza MC, Arce APL, Bojórquez-Orozco AM, Rodríguez-Negrete EA, Santos-Cervantes ME, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE.
- Rootstock implication on quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime** \* Implicación del patrón en la distribución cuantitativa de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón Mexicano. 57  
Esquivel-Chávez F, Mora-Aguilera G, Velázquez-Monreal JJ, Gutiérrez-Espinosa MA and Loeza-Kuk E.

- Implications of crop management and infection chronicity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime production** \* Implicaciones del manejo de cultivo y cronicidad de infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en la producción de limón Mexicano. 69  
Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez JL, Loeza-Kuk E, Acevedo-Sánchez G, López-Arroyo JJ, Velázquez-Monreal JJ, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa MA and Reyes-González B.
- Mechanisms involved in the pathogenesis of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and possible molecular bases of tolerance in citrus** \* Mecanismos involucrados en la patogénesis de *Candidatus Liberibacter asiaticus* y posibles bases moleculares de la tolerancia en cítricos. 86  
Pérez-Zarate LA, Villanueva-Jiménez JA, Osorio-Acosta F, García-Pérez E, Flores-de la Rosa FR and Martínez-Hernández A.
- Huanglongbing and branch dieback in sour limes in Colima, Mexico** \* Huanglongbing y muerte de ramas en limas ácidas in Colima, México. 125  
Velázquez-Monreal JJ, Bermúdez-Guzmán MdeJ, Orozco-Santos M, García-Mariscal KP and Leyva-López NE.
- Huanglongbing and CLAs in *Diaphorina citri* from wide area management from the Southeast Mexico** \* Huanglongbing y CLAs en *Diaphorina citri* en áreas regionales de control del sureste de México. 137  
Loeza-Kuk E and Lomas-Barrié CT.
- Differentiation of the Mexican population of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by double-locus genomic with short tandem repeats** \* Diferenciación de la población Mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por doble-locus genómico con repeticiones cortas en tándem. 150  
Ahumada-Rodríguez JS, Cervantes-Santos JA, Rivera-Villanueva B, Leyva-López NE, Sandoval-Castro E, Méndez-Lozano J, Santos-Cervantes ME and Velázquez-Monreal JJ.
- Quantitative procedure to estimate area-wide pest preventive-management with application to Huanglongbing - *Diaphorina citri* on citrus crops** \* Procedimiento cuantitativo para estimar áreas regionales de manejo preventivo de plagas con aplicación al Huanglongbing - *Diaphorina citri* en cultivos cítricos. 162  
Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P.

- Identification of Mexican lime hybrids (*Citrus aurantifolia*) with greater tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*** \* Identificación de híbridos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con mayor tolerancia a *Candidatus Liberibacter asiaticus*.  
Robles-González MM, Carrillo-Medrano SH, Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ, Orozco-Santos M and Medina-Urrutia VM. 183
- Resistance inducers and amino acids in orange, lemon and grapefruit inoculated with *Candidatus Liberibacter asiaticus*** \* Inductores de resistencia y aminoácidos en naranja, limón y toronja inoculados con *Candidatus Liberibacter asiaticus*  
Zapata-Contreras YG, Osorio-Hernández E, de los Santos-Villalobos S, Ascacio-Valdes JA, López-Badillo CM, Campos-Múzquiz LG and Rodríguez-Herrera R. 197
- Physiological effects of Huanglongbing on Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) grafted on *Macrophylla* (*C. macrophylla*)** \* Efectos fisiológicos de Huanglongbing en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) injertado en *Macrophylla* (*C. macrophylla*).  
Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ, Robles-González MM, Murillo-Hernández JE and Villegas-Montier A. 211
- Comparative epidemiology of Huanglongbing disease in two regional citrus production scenarios in Mexico** \* Epidemiología comparativa del Huanglongbing en dos escenarios citrícolas regionales de México.  
Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Sánchez J, Loeza-Kuk E, Gutiérrez-Espinosa MA, Domínguez-Monge S, Velázquez-Monreal JJ, Santana-Peñaloza B and Munguía-Rosales R. 224
- Physiological and nutrimental effect of HLB chronicity in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*)** \* Efecto fisiológico y nutrimental de la cronicidad HLB en Limón mexicano (*Citrus aurantifolia*)  
Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Hernández-Chan EC, Loeza-Kuk E, Velázquez-Monreal JJ, Cano-Medrano R, López-Arroyo JI. 244

# Identification of salicylic acid binding proteins in the *Candidatus Liberibacter asiaticus* infected *Citrus latifolia* transcriptome

## Identificación de proteínas de unión al ácido salicílico en el transcriptoma de *Citrus latifolia* infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus*

**Ricardo Santillán-Mendoza**, <sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. CIR Golfo Centro. Campo Experimental Ixtacuaco. Km. 4.5 carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, CP. 93650, Tlapacoyan, Veracruz, México; **Erick Daniel Rodríguez-Peralta**, <sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México. Campus Úrsulo Galván. A El Paraíso S/N, Campeste, CP. 91667, Úrsulo Galván, Veracruz, México; **Humberto José Estrella-Maldonado**<sup>1</sup>, **Cynthia Guadalupe Rodríguez-Quibrera**<sup>1</sup>, **Cristian Matilde-Hernández**<sup>1</sup>, **Jacel Adame-García**<sup>2</sup>, **Nelly Abigail González-Oviedo**, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo, CP. 97205, Mérida, Yucatán, México; **Felipe Roberto Flores-de la Rosa**<sup>1\*</sup>.

\*Corresponding author: flores.felipe@inifap.gob.mx.

Received: June 02, 2022.

Accepted: October 27, 2022.

Santillán-Mendoza R, Rodríguez-Peralta ED, Estrella-Maldonado HJ, Rodríguez-Quibrera CG, Matilde-Hernández C, Adame-García J, González-Oviedo NA and Flores-de la Rosa FR. 2022. Identification of salicylic acid binding proteins in the *Candidatus Liberibacter asiaticus* infected *Citrus latifolia* transcriptome. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 1-12.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-1>

**Resumen.** La producción de limón persa (LP) es importante para el estado de Veracruz, México. Sin embargo, se ve afectada por el Huanglongbing (HLB), causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), un patógeno biotrófico obligado. LP presenta un cierto nivel de tolerancia al HLB, por

tanto, resulta relevante estudiar su respuesta de defensa mediada por ácido salicílico (SA). Tres genes con capacidad de participar en la ruta de respuesta por SA, conocidos como *NtSABP*, han sido identificados en *Nicotiana tabacum*; sin embargo, se desconoce la presencia y actividad de dichos genes en LP en respuesta al HLB. En este trabajo se identificaron proteínas homólogas tipo SABP en el transcriptoma de LP y se determinó su grado de expresión diferencial durante la infección con CLas. Se realizó un tBLASTn en el transcriptoma de LP usando como modelo secuencias de las proteínas SABP de cinco diferentes especies, incluyendo *N. tabacum*. Se reconstruyó y comparó el modelo 3D de las proteínas SABP de *N. tabacum* y *C. latifolia*. Con los análisis de tBLASTn, la reconstrucción

filogenética y la estructura tridimensional se logró identificar el homólogo directo de cada gen *NtSABP* en LP. Interesantemente, los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* mostraron represión en plantas infectadas con CLas. En LP hay al menos un homólogo para cada gen *NtSABP*. Durante la infección por CLas, estos genes se encuentran ligeramente reprimidos.

**Palabras clave:** Limón persa, Huanglongbing, Respuesta molecular.

El limón persa (*Citrus latifolia*) es uno de los cítricos de mayor importancia económica en México, especialmente para el estado de Veracruz, el cual es el principal exportador de este fruto a nivel internacional (Fernández-Lambert *et al.*, 2015). Sin embargo, en años recientes se ha reportado la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), como agente causal del HLB en las principales zonas productoras de limón persa en Veracruz (Rodríguez-Quibrera y Mendoza-Herrera, 2014; Rodríguez-Quibrera *et al.*, 2019). Esto resulta de gran importancia, debido a que la enfermedad es considerada la más destructiva para la citricultura mundial (Mora-Aguilera *et al.*, 2014).

Se ha documentado que las diferentes especies de cítricos tienen una respuesta diferencial ante la infección con CLas. Por ejemplo, las especies de cítricos ácidos, como el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), presentan un mayor nivel de tolerancia al HLB respecto a aquellos considerados dulces, como la naranja, la mandarina o la toronja (McCollum *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2021). Evidencia empírica sugiere que el nivel de tolerancia que el limón persa muestra ante la infección por CLas también es mayor que en las especies de cítricos dulces, sin embargo, algunas afectaciones fisiológicas como la acumulación de almidón y baja

concentración de clorofila total siguen ocurriendo (Flores-de la Rosa *et al.*, 2021). Por lo anterior, resulta muy importante comprender la respuesta molecular del limón persa ante la infección.

La principal ruta de defensa que las plantas tienen ante organismos biotróficos, tal como CLas, es la mediada por ácido salicílico (SA) (Gao *et al.*, 2015). Esta ruta activa numerosas respuestas moleculares en la planta, la mayoría de ellas como resultado de la sobreexpresión del gen *NPR1* (Non-expressor of Pathogenesis-related protein 1) (Backer *et al.*, 2019). El SA interactúa directamente con *NPR1* al modificar el potencial redox en el citoplasma, lo que ocasiona la monomerización de *NPR1* y su posterior ingreso al núcleo celular (Zhang *et al.*, 2019) y también uniéndose directamente a *NPR1* (Wu *et al.*, 2012). Para la infección de CLas en cítricos, se ha determinado que la señalización por SA es interrumpida por ese patógeno, debido a la presencia de una enzima salicilato hidroxilasa funcional que limita la movilización del SA al metabolizarlo y suprimir las defensas de la planta (Li *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha observado que la aplicación exógena de concentraciones altas de SA en cítricos enfermos de HLB coadyuva a que la planta mantenga las respuestas de defensa y la expresión de genes antioxidantes durante la infección (Flores-de la Rosa *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021). Asimismo, se ha reportado que la inserción y la sobreexpresión del gen *AtNPR1* en cítricos susceptibles genera un mayor grado de tolerancia al HLB en comparación a genotipos silvestres (Dutt *et al.*, 2015; Qiu *et al.*, 2020), lo que sugiere el papel fundamental del SA en respuesta a la tolerancia contra el HLB.

A pesar de su papel importante en la respuesta al estrés biótico, plantas mutantes  $\Delta$ *NPR1* siguen presentando reacciones de defensa mediadas por SA, lo que indica que *NPR1* y sus parálogos no son los únicos genes relacionados con la unión al SA (Backer *et al.*, 2019; Pokotylo *et al.*, 2019). En

tabaco (*Nicotiana tabacum*), se han identificado, purificado y caracterizado al menos tres proteínas de unión al SA (SABP), con diferentes niveles de afinidad a esa fitohormona y con actividad durante la respuesta ante patógenos biotróficos (Pokotylo *et al.*, 2019). Asimismo, se han determinado homólogos a los genes *NtSABP1*, *NtSABP2* y *NtSABP3* en otras plantas como *Arabidopsis thaliana* (Manohar *et al.*, 2015; Pokotylo *et al.*, 2019), sin embargo, a la fecha no existen reportes de genes homólogos en limón persa, ni de su participación durante la infección con CLAs. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de homólogos a las proteínas de unión al ácido salicílico (SABP) en el transcriptoma de limón persa y determinar su expresión relativa durante la infección con CLAs.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención de material biológico, generación y secuenciación del transcriptoma.** El material utilizado en este estudio se obtuvo de una plantación de limón persa comercial de cinco años de edad, infectada naturalmente con CLAs. Se identificaron hojas en etapa de madurez fisiológica V6 de acuerdo con la escala de Ribeiro *et al.* (2021), las cuales presentaban síntomas característicos de HLB. Asimismo, se localizaron árboles sin síntomas aparentes de la enfermedad. Las muestras se obtuvieron en campo e inmediatamente almacenadas en nitrógeno líquido y posteriormente maceradas, tras lo cual se dividió la hoja para extracción de ADN y ARN. Para confirmar si las muestras de los árboles presentaban al patógeno se extrajo ADN con el método CTAB (Rodríguez-Quibrera *et al.*, 2019) y la detección de CLAs se realizó mediante el protocolo de PCR anidada descrito por Lin *et al.* (2010). Además, se corroboró la homogeneidad genética del patógeno mediante cinco regiones microsate-

lites (datos no mostrados). La descripción de la secuenciación, ensamblado y análisis general del transcriptoma se resumen en Estrella-Maldonado *et al.* (en preparación).

**Aislamiento de secuencias de los genes *SABP1*, *SABP2* y *SABP3* a partir de las especies de referencia.** Usando como modelo las secuencias de las proteínas SABP1, SABP2 y SABP3 de *Nicotiana tabacum*, se procedió a realizar un análisis tBLASTn contra las bases de datos de proteínas de *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Citrus sinensis*, obtenidas de la base de datos del NCBI. Con las secuencias de aminoácidos de las cuatro especies, se construyó un archivo por cada gen y se hizo un análisis tBLASTn contra el transcriptoma de limón persa ensamblado. Todas las secuencias de transcritos identificados en el transcriptoma para cada proteína fueron identificadas y utilizadas para los análisis posteriores. Asimismo, se determinó el porcentaje de similitud entre cada secuencia proteica SABP con las secuencias de *N. tabacum* mediante el software MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>) (Kumar *et al.* 2016).

**Alineamiento, filogenia y estructura tridimensional de las proteínas SABP de limón persa.** Una vez recuperados los transcritos del transcriptoma ensamblado, se realizó la búsqueda de los marcos de lectura abierto (ORF), de los cuales se utilizó el más grande disponible y fue traducido a proteínas mediante las herramientas disponibles en el servidor del NCBI. Posteriormente, se hizo el alineamiento para cada proteína de las cinco especies, usando el algoritmo Clustal W con las opciones establecidas por default. Posteriormente, se efectuó una reconstrucción filogenética mediante Máxima Parsimonia (1000 bootstrap), tanto el alineamiento como el análisis filogenético fue ejecutado en el software MEGA7 (<http://www.megasoftware.net/>)



(Kumar *et al.*, 2016). La secuencia de aminoácidos de cada proteína SABP de *N. tabacum* y *C. latifolia* fue utilizada para construir un modelo 3D de la estructura proteica, para lo cual se empleó el software Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) y el resultado fue visualizado en el servidor de EzMol (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/ezmol/>).

## RESULTADOS

### Aislamiento de secuencias y filogenia de SABP.

A partir de las secuencias de las proteínas SABP de *N. tabacum*, se identificaron diferentes secuencias homólogas de las especies *M. polymorpha*, *A. thaliana* y *C. sinensis*. Con estas secuencias se realizó un tBLASTn contra el transcriptoma ensamblado de limón persa, del cual se identificaron transcritos potencialmente homólogos a los genes *NtSABP*. Las secuencias utilizadas por cada gen para cada especie y los transcritos recuperados en el transcriptoma de limón persa se resumen en el Cuadro 1. Con base en la reconstrucción filogenética, se determinó la relación de homología de los genes *SABP* entre los transcritos de limón persa y las identificadas en las demás especies evaluadas. Con respecto al gen *NtSABP1* se precisó que el transcrito DN42\_c0\_g2\_i4 es el homólogo correspondiente, por lo cual fue nombrado como *CISABP1* (Figura 1). Para el gen *NtSABP2*, resultó que el transcrito DN10091\_c0\_g2\_i1 es el homólogo directo, por lo cual fue nombrado como *CISABP2* (Figura 2). Por último, para el gen *NtSABP3*, se concluyó que el homólogo es el transcrito DN3559\_c0\_g1\_i1, ahora nombrado como *CISABP3* (Figura 3). La secuencia de los transcritos fue depositada en el Genbank del NCBI con los siguientes números de acceso: *CISABP1* (OM719611), *CISABP2* (OM719612) y *CISABP3* (OM719613).

**Expresión diferencial de los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* en el transcriptoma de limón persa infectado con CLAs.** El análisis de expresión DESeq2 mostró que los genes *SABP1*, *SABP2* y *SABP3* reprimen su expresión relativa cuando las plantas están infectadas por CLAs; sin embargo, ninguno de los tres genes presenta diferencia estadísticamente significativa (Figura 4). De los tres genes identificados, *CISABP1* y *CISABP2* causaron una mayor represión con valores de tasa de cambio (Fold Change Log2) superiores a -0.5, sin embargo, *CISABP3* indujo una menor represión con una tasa de cambio cercano a -0.3.

### Análisis de estructura tridimensional de las proteínas CISABP.

Con base en la secuencia de aminoácidos traducidos se reconstruyó el modelo 3D de cada proteína SABP para *N. tabacum* y *C. latifolia*, los resultados se resumen en la Figura 5. Se puede observar claramente que existe una alta similitud estructural entre las proteínas SABP1 y SABP2 de ambas especies, lo que apoya la hipótesis de que los genes codificantes de las mismas son homólogos. Sin embargo, para la proteína SABP3, la semejanza estructural es menor, aunque se conservan la mayoría de las regiones entre ambas especies. A partir de 457 residuos de la secuencia de la proteína CISABP1, ésta fue modelada con un 100% de confianza como una catalasa, de la cual, 38% de la secuencia formó  $\alpha$ -hélices y el 22% integró  $\beta$ -láminas. Para la secuencia CISABP2, 258 residuos fueron modelados al 100% de confianza como perteneciente a la súper familia de las hidrolasas, con un 42% de  $\alpha$ -hélices y el 11% formó  $\beta$ -láminas. Por último, la secuencia CISABP3 fue modelada al 100% de confianza considerando 210 residuos y asociada con la súper familia de las  $\beta$ -anhidrasas carbónicas, con 42% de  $\alpha$ -hélices y 20% de  $\beta$ -láminas. Los modelos 3D de las tres secuencias proteicas se presentan en la figura 5.

**Cuadro 1. Porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos SABP de *N. tabacum* y secuencias homólogas identificadas en cinco diferentes especies. Se señala con un asterisco la secuencia obtenida de *Citrus latifolia* con mayor porcentaje de identidad con las secuencias de *N. tabacum*.**

Especies	<i>N. tabacum</i>		<i>N. tabacum</i>		<i>N. tabacum</i>	
	SABP1 homólogos	SABP1 Catalasa	SABP2 homólogos	SABP2 MeSA esterase	SABP3 Homólogos	SABP3 $\beta$ -Carbonic anhydrase
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q96528 Catalasa 1	77.73	Q8S8S9 MeSA1	56.75	P27140 $\beta$ Carbonic anhydrase 1	73.75
	P25819 Catalasa 2	78.36	O80476 MeSA2	52.51	P42737 $\beta$ Carbonic anhydrase 2	64.85
	Q42547 Catalasa 3	76.47	O80474 MeSA4	51.15		
<i>Marchantia polymorpha</i>			O80472 MeSA7	48.63		
			O23171 MeSA9	46.48		
	OAE31579.1	74.16	OAE21631.1	33.98	OAE34792.1	45.61
	OAE35247.1	69.95	PTQ33879.1	33.06	PTQ38106.1	44.32
<i>Citrus sinensis</i>	PTQ30274.1	69.95				
	PTQ30353.1	74.16				
	KDO85095.1	75.94	KDO79350.1	57.91	KDO66162.1	76.97
	KDO85096.1	78.99	KDO79351.1	58.68	KDO66164.1	77.12
	XP_006473789.1	77.10	KDO79352.1	58.68	KDO66166.1	76.97
	XP_006473790.1	77.10	NP_001275858.1	58.68	KDO66167.1	76.97
	XP_006473792.1	78.78	XP_006466659.1	58.30	KDO66170.1	76.89
XP_006473794.1	78.78	XP_006466663.1	59.07	XP_006470326.1	76.97	
<i>Citrus latifolia</i>			XP_006485914.1	56.92		
			XP_024957411.1	55.76		
	DN42 c0 g2 i4	77.31*	DN10091 c0 g2 i1	59.07*	DN502 c0 g1 i2	63.92
	DN42 c0 g2 i3	76.21	DN1788 c0 g1 i8	9.31	DN3559 c0 g1 i1	76.02*
			DN1788 c0 g1 i1	9.69		
		DN1788 c0 g1 i9	9.69			

## DISCUSIÓN

Debido a la naturaleza sésil de las plantas, los mecanismos de respuesta a diferentes fuentes de estrés son muy complejos y recién comienzan a entenderse a profundidad (Zhang *et al.*, 2022). Un caso especial de estos mecanismos de respuesta es la defensa al ataque de organismos causantes de enfermedades, ya que las plantas no cuentan con sistemas inmunes especializados como los animales (Jones y Dangl, 2006). La ruta de respuesta a patógenos mediada por SA ha sido demostrada

como la de mayor importancia ante la infección por organismos biotróficos (Yang *et al.*, 2015), sin embargo, estudios recientes han revelado que esta ruta que activa las defensas a través del SA es mucho más compleja de lo que se pensaba (Huang *et al.*, 2020). Esto incluye las proteínas que tienen una posible interacción directa con el SA, tal como son las proteínas SABP (Pokotylo *et al.*, 2019).

Las proteínas SABP han sido identificadas en especies modelos como *N. tabacum* y *A. thaliana* (Pokotylo *et al.*, 2019), sin embargo, poco se conoce respecto a genes homólogos codificantes de

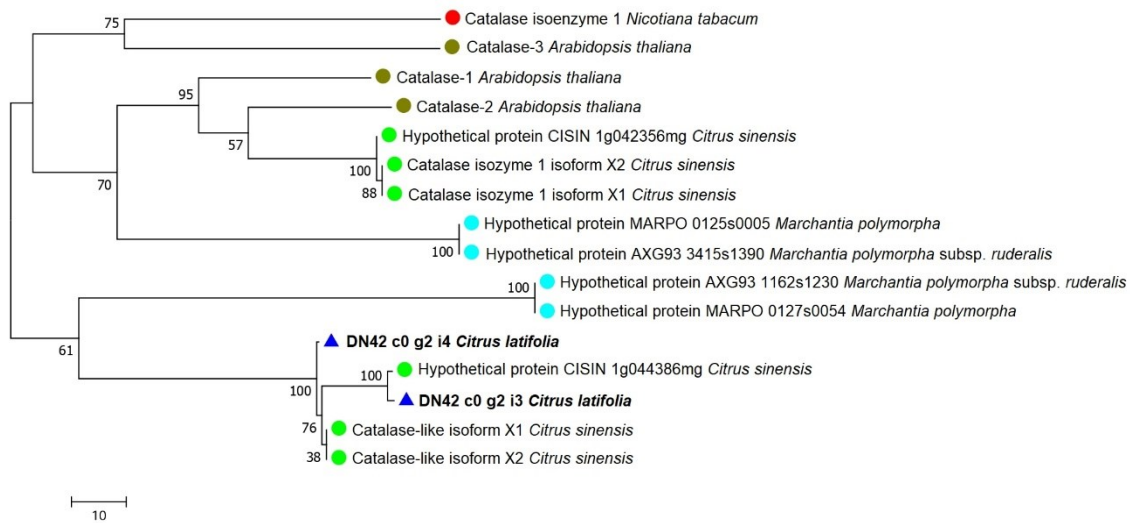


Figura 1. Filogenia basada en Máxima Parsimonia (1000 bootstraps) del resultado de tBLASTn de las secuencias homólogas al gen *SABP1*. Las secuencias de los transcritos recuperados del transcriptoma de limón persa se resaltan en negritas.

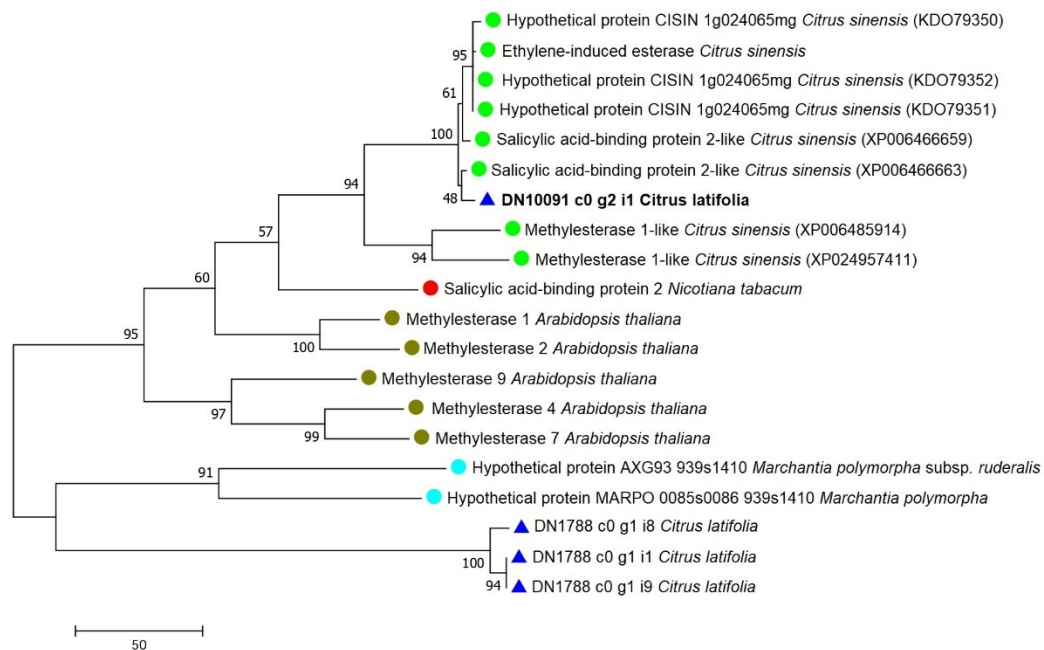
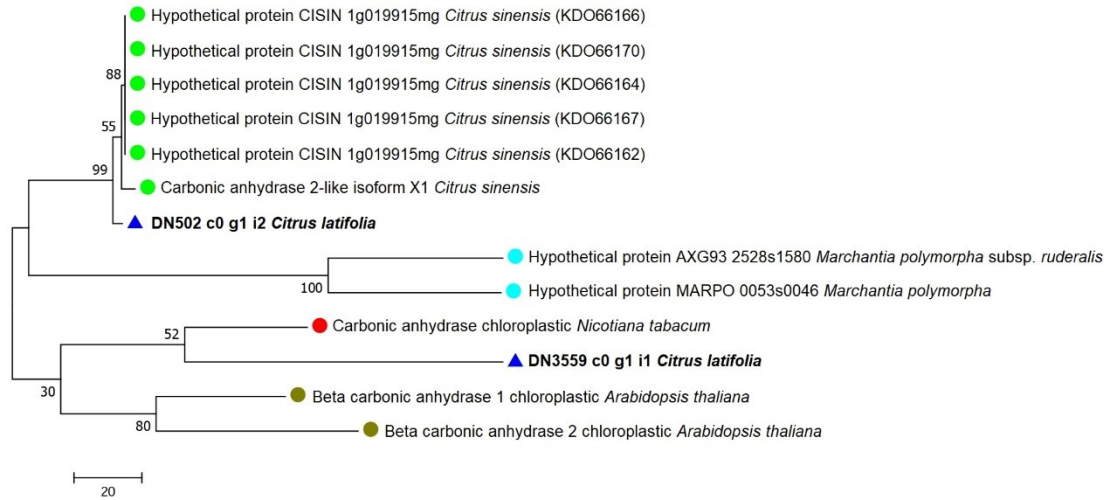
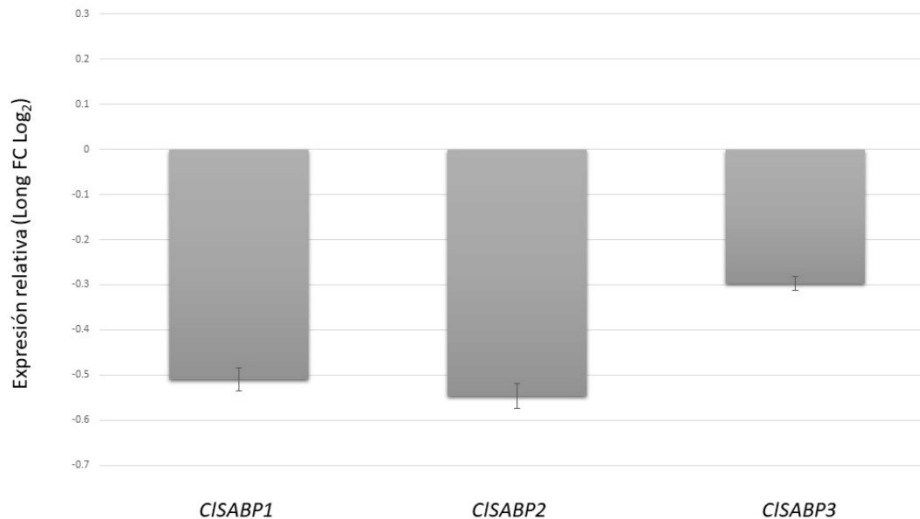


Figura 2. Filogenia basada en Máxima Parsimonia (1000 bootstraps) del resultado de tBLASTn de las secuencias homólogas al gen *SABP2*. Las secuencias de los transcritos recuperados del transcriptoma de limón persa se resaltan en negritas.



**Figura 3.** Filogenia basada en Máxima Parsimonia (1000 bootstraps) del resultado de tBLASTn de las secuencias homólogas al gen *SABP3*. Las secuencias de los transcritos recuperados del transcriptoma de limón persa se resaltan en negritas.



**Figura 4.** Expresión relativa de los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* en limón persa infectado con CLAs en comparación a una planta sana.

estas proteínas en especies de importancia agrícola, como los cítricos. En el presente trabajo de investigación se identificaron homólogos a los genes *NtSABP1*, *NtSABP2* y *NtSABP3* en el transcriptoma de limón persa infectado con CLAs. Los resultados

sugieren que existe al menos un homólogo directo a cada gen presente en este frutal.

El análisis filogenético y la comparación de las estructuras 3D sugieren que el gen nombrado en este trabajo como *CISABP1* tiene una alta homología

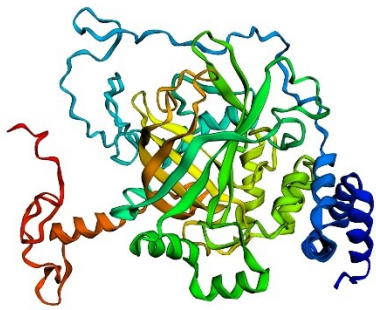
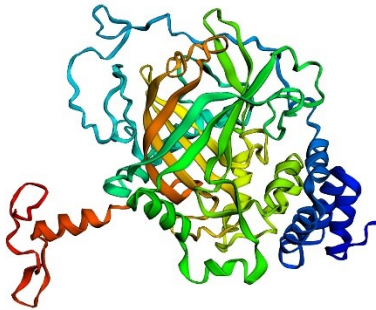
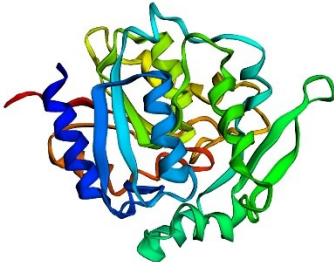
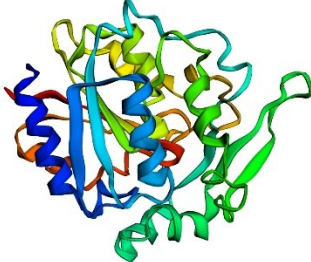
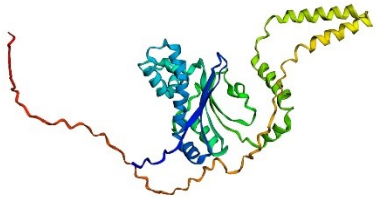
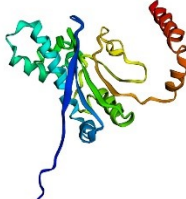
Proteína	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Citrus latifolia</i>
SABP1		
SABP2		
SABP3		

Figura 5. Comparación estructural de los modelos 3D de las proteínas SABP identificadas en el transcriptoma de limón persa respecto a las reportadas en *N. tabacum*.

con *NtSABP1*. Este gen ha sido caracterizado como una catalasa 2 (CAT2) en *A. thaliana* (Chen *et al.*, 1993; Klessin *et al.*, 2018), la cual se relaciona con la respuesta de defensa, ya que a mayor concentración de SA se inhibe la actividad de CAT2, luego se incrementan los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se detiene la síntesis de ácido jasmónico y la acumulación de auxinas, lo que a su vez eleva la respuesta de defensa contra patógenos biotróficos, mientras que aumenta la susceptibilidad ante necrotrofos (Yuan *et al.*, 2017). En nuestros resultados, se observó que el

gen *CISABP1* mostró una represión de su expresión relativa en plantas de limón persa infectadas con CLas, aunque dicha represión no fue significativa. Ésta podría ser explicada por la capacidad de metabolizar el SA por parte de CLas (Li *et al.*, 2017), lo cual no permite alcanzar los niveles de SA necesarios para ampliar la respuesta de defensa de la planta utilizando la vía CAT2, tal como se ha observado en *A. thaliana* (Yuan *et al.*, 2017). Sin embargo, se ha encontrado que durante la infección por CLas, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se incrementan y la

actividad catalasa es ligeramente reprimida en cítricos (Pitino *et al.*, 2017). Por lo tanto, no es posible determinar si la represión del gen *CAT2* (*CISABP1*) es dada por la supresión de CLas o por la respuesta de la planta mediada por SA; no obstante, el gen *CISABP1* podría jugar un papel primordial durante la infección por CLas en limón persa.

Igualmente se observó una alta similitud estructural entre las proteínas SABP2 de *N. tabacum* y *C. latifolia*. Esta proteína ha sido caracterizada como una metil-salicilato esterasa relacionada con la defensa vegetal, debido a que convierte el metil salicilato en SA (Forouhar *et al.*, 2005). En un estudio reciente, la sobreexpresión de un gen codificante de una carboxil transferasa en *C. sinensis*, demostró conducir a una mayor acumulación de SA y por tanto a la inhibición de los síntomas generados por CLas (Zou *et al.*, 2021). En el presente trabajo de investigación se identificó al gen *CISABP2* como un homólogo directo al gen *NtSABP2*, por lo cual, se puede inferir con base en la homología funcional que es un gen prioritario para el incremento de SA en limón persa. Sin embargo, la represión de la expresión relativa del gen *CISABP2*, sugiere que la infección por CLas inhibe la ruta de respuesta de defensa no solo mediante la metabolización del SA, sino también suprimiendo su biosíntesis a través de la represión de genes como *CISABP2*. Y por ello se necesitan más estudios para determinar el efecto que tiene la expresión del gen *CISABP2* sobre los mecanismos de defensa del limón persa ante la infección por CLas.

Por último, para *CISABP3*, el análisis estructural mostró regiones altamente conservadas en el plegamiento de la proteína, características del gen homólogo, aunque la secuencia proteica codificada por el gen *CISABP3* no presenta una cadena aminoácídica en el C-terminal en *NtSABP3* (Figura 3).

Esta proteína ha sido descrita como una anhidrasa carbónica localizada en el cloroplasto, con actividad antioxidante e importante en la respuesta hipersensible (Slaymaker *et al.*, 2002). Se ha corroborado que dicha proteína se acumula en menor medida como resultado de la infección por CLas en *C. paradisi*, lo que podría estar relacionado con la deficiencia en la capacidad fotosintética, pues participa activamente de la fijación de CO<sub>2</sub> (Nwugo *et al.*, 2013). También se ha observado que este gen se reprime en cítricos susceptibles al HLB durante la infección (Mafrá *et al.*, 2013), lo que viene a ser de interés, pues en los resultados encontrados en este trabajo, el gen *CISABP3*, si bien se ve ligeramente reprimido, dicha represión no es significativa respecto a una planta sana, lo cual podría estar relacionado con la mayor tolerancia del limón persa ante la infección por CLas. Además, es importante destacar que el gen *CLIBASIA05315*, presente en el genoma del patógeno, contiene un dominio conservado relacionado con las anhidrasas carbónicas (Flores-de la Rosa *et al.*, 2020), el cual produce una proteína que se une a los cloroplastos durante la infección en *N. benthamiana* y causa muerte celular (Pitino *et al.*, 2016). Por tanto, planteamos la hipótesis de que la similitud de las secuencias de SABP3 entre *N. tabacum* y *C. latifolia*, podría estar asociada a la semejanza de los síntomas observables en estas dos especies al infectarse con CLas.

El análisis mostrado en el presente trabajo de investigación sienta las bases para profundizar en el estudio de la respuesta de defensa mediada por SA en limón persa contra el HLB, a través de los genes *CISABP*, ya que, al ocurrir una represión de su expresión relativa durante la infección, un análisis funcional de los mismos podría ayudar a comprender por qué el limón persa muestra una respuesta de más tolerancia hacia el HLB en comparación con cítricos dulces.

## CONCLUSIONES

El transcriptoma de limón persa sano e infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus* contiene los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3*, homólogos a los genes *NtSABP1*, *NtSABP2* y *NtSABP3* de *Nicotiana tabacum*, los cuales codifican para proteínas de unión a ácido salicílico.

Los genes *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* se encuentran ligeramente reprimidos en el transcriptoma de plantas de limón persa enfermas de HLB.

Las proteínas *CISABP1*, *CISABP2* y *CISABP3* comparten una alta similitud estructural con respecto a *NtSABP1*, *NtSABP2* y *NtSABP3* de *N. tabacum*.

## AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por el Consejo Veracruzano de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (COVEICYDET) a través del financiamiento al proyecto “Transcriptómica de limón persa infectado con HLB y caracterización genómica del agente causal, *Candidatus Liberibacter asiaticus*” (número de proyecto: 15 1906/2021). RPED agradece por la beca otorgada para la realización del presente trabajo (número de beca 15 1906/2021-01). Asimismo, se agradece el apoyo técnico de Carlos González Cruz para el análisis de datos.

## LITERATURA CITADA

- Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P and Peña L. 2021. Resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ the Huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible *Citrus* relatives. *Frontiers in Plant Science* 11:617664. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617664>
- Backer R, Naidoo S and van den Berg N. 2019. The nonexpression of pathogenesis-related genes 1 (NPR1) and Related Family: Mechanistic Insights in Plant Disease Resistance. *Frontiers in Plant Science* 10:102. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00102>
- Chen Z, Silva H and Klessig DF. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262(5141):1883-1885. <https://doi.org/10.1126/science.8266079>

- Dutt M, Barthe G, Irey M and Grosser J. 2015. Transgenic Citrus Expressing an *Arabidopsis* NPR1 Gene Exhibit Enhanced Resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *Plos One* 10(9):e0137134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>
- Fernández-Lambert G, Aguilar-Lasserre AA, Martínez-Castellanos G, Ruvalcaba-Sánchez MLG, Correa-Medina JG and Martínez-Flores JL. 2015. Context and characterization of Persian lime supply chain (*Citrus latifolia* Tanaka) of state Veracruz-Mexico. *Conciencia Tecnológica* 50:21-31. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=94443423004>
- Flores-de la Rosa FR, Rodríguez-Quibarrera CG, Matilde-Hernández C and Santillán-Mendoza R. 2020. Bioinformatic Analysis of Potential Pathogenicity Effectors of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Causal Agent of Citrus Huanglongbing. *American Journal of Plant Science* 11:1319-1330. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.118094>
- Flores-de la Rosa FR, Santillán-Mendoza R, Rodríguez-Quibarrera CG, Martínez-Ruiz A, Adame-García J and Luna-Rodríguez M. 2021. Antioxidant gene expression, chlorophyll, and starch content in Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka Ex Q. Jiménez) trees with HLB by application of elicitors of plant resistance. *Mexican Journal of Biotechnology* 6(2):86-102. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2021.6.2.86>
- Forouhar F, Yang Y, Kumar D, Chen Y, Fridman E, Wook-Park S, Chiang Y, Acton TB, Montelione GT, Pichersky E, Klessig DF and Tong L. 2005. Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 102(5):1773-1778. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409227102>
- Gao Z, Li Y, Wu G, Li G, Sun H, Deng S, Shen Y, Chen G, Zhang R, Meng C and Zhang X. 2015. Transcriptome analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by Salicylic Acid (SA) and Jasmonic Acid (JA). *Plos One* 10(10):e0140609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140609>
- Huang W, Wang Y, Li X and Zhang Y. 2020. Biosynthesis and regulation of salicylic acid and N-hydroxypipicolinic acid in plant immunity. *Molecular Plant* 13:31-41. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.12.008>
- Jones JDG and Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Klessig DF, Choi HW and Dempsey DMA. 2018. Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Past, Present, and Future. *Molecular Plant Microbe Interactions* 31(9):871-888. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0067-CR>
- Kumar S, Stecher G and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- 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(8):620-630. <https://doi.org/10.1094/MP-MI-12-16-0257-R>
- Li L, Dou N, Zhang H and Wu C. 2021. The versatile GABA in plants. *Plant Signaling and Behavior* 16(3):1862565. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1862565>
- 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(1):17-25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.014>
- Mafra V, Martins PK, Francisco CS, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J and Machado MA. 2013. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC Genomics* 14:247. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-247>
- Manohar M, Tian M, Moreau M, Park SW, Woo-Choi S, Fei Z, Friso G, Asif M, Manosalva P, von Dahl CC, Shi K, Ma S, Dinesh-Kumar SP, O'Doherty I, Schroeder FC, van Wijk KJ and Klessig DF. 2015. Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Frontiers in Plant Science* 5:777. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00777>
- McCollum G, Hilf M, Irey M, Luo W and Gottwald T. 2016. Susceptibility of sixteen citrus genotypes to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Plant Disease* 100:1080-1086. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0940-RE>
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JI, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa A and Loeza-Kuk E. 2014. Current situation and Prospects for Management of Citrus HLB. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2):108-119. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092014000200108&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092014000200108&script=sci_arttext&tlng=en)
- Nwugo CC, Duan Y and Lin H. 2013. Study on Citrus Response to Huanglongbing Highlights a Down-Regulation of Defense-Related Proteins in Lemon Plants Upon '*Ca. Liberibacter asiaticus*' Infection. *Plos One* 8(6):e67442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067442>
- Pitino M, Armstrong CM, Cano LM and Duan Y. 2016. Transient expression of *Candidatus Liberibacter Asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* 7:982. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00982>
- Pitino M, Armstrong CM and Duan Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrus plants in response to "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" infection. *Horticultural Research* 4:17040. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40>
- Pokotylo I, Kravets V and Ruelland E. 2019. Salicylic Acid Binding Proteins (SABPs): The Hidden Forefront of Salicylic Acid Signalling. *International Journal of Molecular Sciences* 20(18):4377. <https://doi.org/10.3390/ijms20184377>
- Qiu W, Soares J, Pang Z, Huang Y, Sun Z, Wang N, Gresser J and Dutt M. 2020. Potential Mechanisms of *AtNPR1* Mediated Resistance against Huanglongbing (HLB) in *Citrus*. *International Journal of Molecular Sciences* 21(6):2009. <https://doi.org/10.3390/ijms21062009>
- Ribeiro C, Xu J, Teper D, Lee D and Wang N. 2021. The transcriptome landscapes of citrus leaf in different developmental stages. *Plant Molecular Biology* 106(4-5):349-366. <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01154-8>
- Rodríguez-Quibrera CG y Mendoza-Herrera A. 2014. Una amenaza para la citricultura mexicana. La ciencia y el Hombre 27(1). <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol27num1/contenido.html>
- Rodríguez-Quibrera CG, Flores-de la Rosa FR, López-Sosa CG, Adame-García J y Hernández-Guerra C. 2019. Detección de Clas mediante la evaluación de iniciadores específicos en árboles de limón Persa en Veracruz. Pp:2438-2454. In: Vinay VJC *et al.* (eds.). *Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuicola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático*. INIFAP, CP, UACH, INAPESCA, UV, TecNM. Medellín de Bravo, Ver., México. 3(1). 2488p. <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://rctveracruz.org/descargarlibro/libros/Bio33.pdf>
- Slaymaker DH, Navarre DA, Clark D, del Pozo O, Martin GB and Klessig DF. 2002. The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99(18):11640-11645. <https://doi.org/10.1073/pnas.182427699>
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, de Luca V and Despres C. 2012. The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone Salicylic Acid. *Cell Reports* 1:639-647. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.008>
- Yang L, Li B, Zheng X, Li J, Yang M, Dong X, He GCA and Deng XW. 2015. Salicylic acid biosynthesis is enhanced and contributes to increased biotrophic pathogen resistance in *Arabidopsis* hybrids. *Nature Communications* 6:7309. <https://doi.org/10.1038/ncomms8309>
- Yuan HM, Liu WC and Lu YT. 2017. CATALASE2 Coordinates SA-Mediated Repression of Both Auxin Accumulation and JA Biosynthesis in Plant Defenses. *Cell Host and Microbe* 21(2):143-155. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.007>
- Zhang D, Zhu Z, Gao J, Zhou X, Zhu S, Wang X, Wang X, Ren G and Kuai B. 2019. The NPR1-WRKY46-WRKY6 signaling cascade mediates probenazole/salicylic acid-elicited leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* 63(5):924-936. <https://doi.org/10.1111/jipb.13044>
- Zhang H, Zhu J, Gong Z and Zhu JK. 2022. Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics* 23:104-119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>



Zou X, Zhao K, Liu Y, Du M, Zheng L, Wang S, Xu L, Peng A, He Y, Long Q and Chen S. 2021. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase (*CsSAMT1*) enhances tolerance to huanglongbing disease in Wanjincheng orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). International Journal of Molecular Sciences 22:2803. <https://doi.org/10.3390/ijms22062803>

# Elicitor and plant nutrition effects on *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime

## Efecto de elicitors y nutrición sobre *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón mexicano

**Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar, Gabriel Rincón-Enríquez\***, 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; **Christian Salvador Mendoza-Hernández**, Departamento de Ingeniería en Agrotecnología, Universidad Politécnica del Bicentenario, carretera libre Silao-Romita Km. 2, San Juan de los Duran, C.P. 36283, Silao de la Victoria, Guanajuato; **Laura Izascum Pérez-Valencia**, Instituto Tecnológico José Mario Molina Pasquel y Henríquez-Unidad Arandas. José Guadalupe Tejeda Vázquez S/N, col. Santa Bárbara, C.P. 47184, Arandas, Jalisco, México.

\*Autor de correspondencia: grincon@ciatej.mx

Received: July 30, 2022.

Accepted: October 27, 2022.

Quiñones-Aguilar EE, Rincón-Enríquez G, Mendoza-Hernández CS and Pérez-Valencia LI. 2022. Elicitor and plant nutrition effects on *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 13-19.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-2>

**Resumen.** La enfermedad Huanglongbing (HLB), causada por la bacteria '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (CLas), afecta a la industria cítrica del mundo. Una alternativa que se ha propuesto para su manejo ha sido la inducción de resistencia sistémica a través del uso de elicitors y de la nutrición. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes elicitors (biológicos, químico y de origen orgánico) con una fertilización química y orgánica en la concentración CLas presente en árboles de limón mexicano bajo condiciones de invernadero. Los elicitors

utilizados fueron: *Bacillus subtilis* y *Funneliformis mosseae* (biológico); ácido salicílico (químico) y Plasmitox<sup>®</sup>, Virus-Stop<sup>®</sup> y Blindax<sup>®</sup> (de origen orgánico). La fertilización química se aplicó trimestralmente, mientras que la orgánica, así como los elicitors, se aplicaron mensualmente, excepto, *F. mosseae* que se aplicó en las raíces durante el trasplante una sola vez. A los dos años se determinó la concentración de CLas mediante qPCR. Ninguno de los elicitors evaluados redujo la concentración CLas, sin embargo, *B. subtilis* presentó una concentración significativamente mayor al resto de los elicitors. Estos resultados podrían indicar que la nutrición química es un factor importante por evaluar y que se debe considerar cuando se aplican en conjunto con elicitors como *B. subtilis*.

**Palabras clave:** Inductor, Ácido salicílico, *Bacillus subtilis*, *Funneliformis mosseae*

La enfermedad Huanglongbing (HLB), cuyo agente causal es la bacteria ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLAs), es una de las principales enfermedades que afecta a la industria cítrica alrededor del mundo (Bové, 2006). En México, la presencia de *Diaphorina citri*, insecto vector de la bacteria, se reportó en los estados de Campeche y Yucatán en 2002 (Halbert y Nuñez, 2004), cinco años después (2009), se detectaron síntomas de la enfermedad en Yucatán. La principal estrategia para evitar la diseminación de la enfermedad ha sido el uso intensivo de insecticidas para controlar el crecimiento poblacional y la dispersión del vector *D. citri*, la eliminación de árboles enfermos y la producción de plantas libres de HLB (Hall y Gottwald, 2011), así como, la aplicación intensiva de fertilizantes y antibióticos (Gottwald *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011), sin embargo, en general, el uso excesivo de agroquímicos ocasiona daños al ambiente y en otros organismos (Thakur y Singh Sohal, 2013), por lo que, se han realizado diversos estudios para evaluar alternativas más eficientes para controlar enfermedades en plantas y disminuir el uso de agroquímicos.

Una de estas alternativas es la aplicación de elicitors, que son compuestos que estimulan cualquier tipo de defensa en la planta. Los elicitors pueden ser químicos, bióticos, abióticos y complejos, dependiendo de su origen y estructura molecular (Thakur y Singh Sohal, 2013). Algunos elicitors biológicos como la bacteria *Bacillus subtilis* o algunos hongos micorrízicos arbusculares (HMA), han sido utilizados para inducir resistencia sistémica en especies del género *Citrus* ante diversas enfermedades incluyendo al HLB (Graham, 1986; Chen *et al.*, 2020; Munir *et al.*, 2020; Asad *et al.*, 2021). Dentro de los elicitors abióticos (químicos) utilizados, el ácido salicílico ha mostrado buenos resultados reduciendo de la concentración de CLAs y del progreso del HLB en algunas especies de

cítricos (Olivera-Coqueiro *et al.*, 2015; Hu *et al.* 2018; Trinidad *et al.*, 2019). Resulta importante destacar que la condición nutricional de los árboles es un factor relevante que puede influir en la tolerancia hacia una enfermedad. Al respecto, Shen *et al.* (2013) destacan que la fertilización en combinación con ácido salicílico fue eficiente en la reducción de la concentración de CLAs y mitigó los síntomas de la enfermedad en árboles de *C. sinensis*.

Particularmente, los estudios sobre inductores de resistencia sistémica en *Citrus aurantifolia*, son escasos, por lo que es necesario, no solo la evaluación de inductores ya conocidos, sino la búsqueda de más compuestos o sustancias que induzcan resistencia sistémica, como serían los productos comerciales de origen orgánico. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de los inductores de resistencia sistémica (biológico, químico y de origen orgánico) en combinación con una fertilización química, sobre la concentración de CLAs en árboles de *C. aurantifolia* en condiciones de invernadero.

Se utilizaron árboles certificados (Sanidad Vegetal-SENASICA) de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) injertados sobre *C. macrophylla* de 18 meses provenientes de Tecomán, Colima. Los árboles de limón mexicano (Lm), fueron inoculados con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) vía injerto de yema utilizando varetas de árboles sintomáticos con HLB provenientes de huertos de Tecomán, Colima de acuerdo con lo propuesto por Coletta-Filho *et al.* (2010). El injerto se hizo ocho meses previo al trasplante a macetas de 20 L (16 kg de sustrato). Los árboles se regaron a capacidad de campo una vez por semana. Posteriormente fueron trasplantados en sustrato a base de suelo: arena: agrolita: turba (Sunshine Mix® No. 3) (50:30:10, v/v/v) esterilizado (120 °C, 1.05 kg cm<sup>-2</sup>, 6 h). El experimento se colocó en condiciones de invernadero en las instalaciones de la Unidad Zapopan de CIATEJ en Jalisco. Los microorganismos *Funne-*

*liformis mosseae* y *Bacillus subtilis* se obtuvieron del cepario del laboratorio de Fitopatología del CIATEJ, mientras que el ácido salicílico se adquirió de Sigma-Aldrich (cat. 105910) y los productos de origen orgánico, Plasmitox®, Blindax® y Virus-Stop® a través de un proveedor comercial de la empresa Fagro® (fagro.com.mx). Para la fertilización química se aplicó triple 16 (16-16-16% de N-P-K) y urea (46% N) (Agrícola DASAM, México, <http://agricoladasam.com.mx/>), mientras para la fertilización orgánica se utilizó la lombricomposta líquida Biojal® (<https://hidroflora.mx/producto/03OR-HUMUS20LTS>) (Cuadro 1).

Se empleó un diseño completamente al azar con 10 tratamientos y cinco repeticiones de acuerdo con el Cuadro 1. La unidad experimental fue una maceta con un árbol de Lm. El tratamiento con el hongo micorrízico arbuscular (HMA) *F. mosseae* se aplicó en las raíces una sola vez durante el trasplante. El resto de los tratamientos con elicitores, así como la fertilización química y orgánica comenzaron a aplicarse 30 días después del trasplante. Los elicitores y la fertilización orgánica se aplicaron mensualmente mientras que la fertilización química trimestralmente (cuatro veces al año). Los tratamientos que recibieron agentes de control quí-

mico se aplicaron a la filosfera mediante aspersión de acuerdo con las concentraciones y volúmenes indicados en el Cuadro 1. La variable de respuesta que se analizó fue la concentración bacteriana de CLas mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa del ADN en tiempo real (qPCR). El qPCR se realizó dos años después de la primera aplicación de los elicitores, ya que, Coletta-Filho *et al.* (2010) reportan que las concentraciones de CLas no se detectan antes de este tiempo en árboles adultos. La edad de las plantas fue de 4 años 2 meses al momento de la toma de muestras.

Para la extracción de ADN de cada unidad experimental, se muestreó la quinta hoja descendente del ápice de cuatro ramas ubicadas en los puntos cardinales de aproximadamente 4-5 meses de edad. Estas hojas se congelaron a -80 °C, liofilizaron (72 h; TFD5503 IIShinBioBase, Korea), molieron (60 s, 25 Hz, MM400 Retsch, Alemania) y almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso para la extracción de ADN. Mediante el protocolo de CTAB al 3% propuesto por Zhang *et al.* (1998). La concentración y la pureza del ADN se determinó a 260 y 280 nm (Nano-Drop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

**Cuadro 1. Tratamientos para determinar el efecto de elicitores y nutrientes para el manejo de CLas en plantas de limón mexicano en invernadero.**

Tratamiento (T)		Condiciones de la aplicación			
Tipo de agente	(T) Agente de control	CLas	Concentración	Total / árbol	Periodicidad
Biológico	(1) <i>Funneliformis mosseae</i> + FQ	(+)	5 esporas g <sup>-1</sup> sustrato	500 esporas	Inicio experimento
	(2) <i>Bacillus subtilis</i> + FQ	(+)	2.5x10 <sup>8</sup> UFC mL <sup>-1</sup>	100 mL	Mensual
Químico	(3) Ácido salicílico + FQ	(+)	500 µg L <sup>-1</sup>	50 mL	Mensual
	(4) Plasmitox® + FQ	(+)	12 mL L <sup>-1</sup>	62.5 mL	Mensual
Orgánico	(5) Blindax® + FQ	(+)	1.5 mL L <sup>-1</sup>	62.5 mL	Mensual
	(6) Virus-Stop® + FQ	(+)	2.5 mL L <sup>-1</sup>	72.5 mL	Mensual
Nutrición vegetal	(7, 8) Fertilización química (FQ)	(+)	Triple 17 + urea	37.5-4.5-4.5 g	Trimestral
		(-)	(46 % N)		
	(9, 10) Fertilización orgánica	(+)	Lombricomposta líquida	100 mL	Mensual
		(-)			

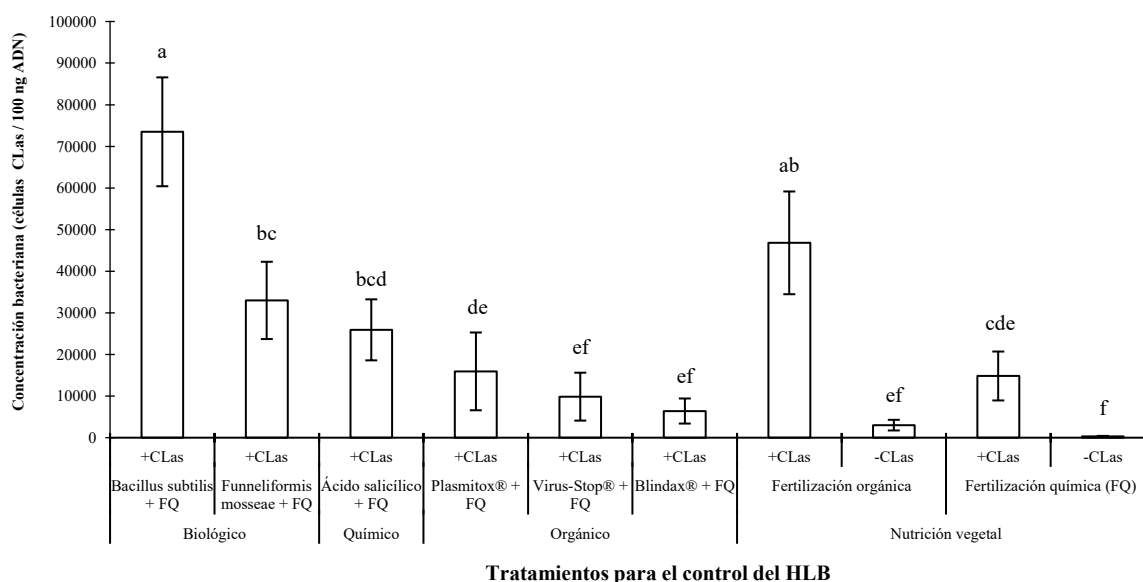
Para determinar el título de CLas se realizó un análisis por PCR en tiempo real (StepOne Applied Biosystems, USA) siguiendo lo descrito por Li y Levy (2006). Los valores de Ct fueron convertidos en concentración de células de CLas mediante una curva estándar descrita previamente por Lin *et al.* (2010) y usando el Software 7500 System SDS versión 2.0.5. Los datos de la concentración bacteriana fueron tratados mediante un análisis de varianza de una vía y comparación múltiple de medias LSD, ambos a un nivel de significancia del 5 % ( $p \leq 0.05$ ). Los datos fueron transformados con raíz cuadrada ( $\sqrt{x}$ ) con el fin de alcanzar la normalidad y homocedasticidad. Estos análisis fueron realizados con el programa estadístico Statgraphics® Centurion XV versión 15.2.06 (StatPoint, 2005).

Los resultados indicaron que el tratamiento biológico con *Bacillus subtilis* presentó la mayor concentración de CLas (73,494.2 células/100 ng ADN) (Figura 1) y fue diferente estadísticamente al resto de los tratamientos con elicitores ( $p \leq 0.05$ ). Este resultado difiere de otros estudios en los que se ha observado que las especies del género *Bacillus* actúan como inductores de resistencia sistémica ante patógenos presentes en especies de cítricos (Chen *et al.* 2020). Recientemente Adsad *et al.* (2021) reportaron que, 60 días después de la aplicación, la cepa *B. subtilis* L1-21 en combinación con la solución Hoagland al 50%, redujo considerablemente la concentración de CLas en árboles de *C. lemon* asintomáticos, mientras que, en árboles sintomáticos, la cepa sin solución Hoagland tuvo mejores resultados, lo que sugiere que, el estado de avance de la enfermedad influye en la función elicitora de *B. subtilis*. En el presente estudio, los árboles de Lm, con el tratamiento de *B. subtilis* y fertilización química, no disminuyó la concentración de CLas en comparación con los otros tratamientos, lo que puede indicar que, no solo el estado de avance de la enfermedad, sino el tipo de cepa y fertilización

influye en la capacidad de *B. subtilis* para inducir resistencia sistémica.

La concentración de CLas en el tratamiento biológico con *F. mosseae* (32,987.2 células/100 ng ADN) (Figura 1) mostró diferencias significativas con todos los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) excepto con el tratamiento de ácido salicílico. Los HMA como *F. mosseae*, son microorganismos benéficos que no solo son estudiados para ayudar a las plantas a obtener nutrientes y agua, sino por incrementar la resistencia de las plantas ante enfermedades y organismos patógenos (Ortas, 2012). En especies de importancia económica como el tomate, se ha estudiado su capacidad para inducir resistencia local y sistémica ante patógenos como *Phytophthora parasitica*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y *Alternaria solani* (Pozo *et al.*, 2002, HoNg-Duc y Posta, 2018; Song *et al.*, 2015), sin embargo, dentro del género *Citrus* ha sido poco estudiada (Graham, 1986; Sikora, 1992; Calvet *et al.*, 1995; y Michelini *et al.*, 1993, mencionados en Ortas, 2012), por lo que, los resultados encontrados en este estudio podrían ser distintos dado que se trata de especies vegetales con ciclos de vida diferentes, el tomate es anual mientras que el Lm es una planta perenne, lo cual podría influir en el efecto elicitor del HMA sobre el sistema de defensa del árbol de limón, sin embargo se requieren mayores estudios para confirmar esta posible hipótesis.

La concentración de CLas con ácido salicílico (25,910.7 células/100 ng ADN) (Figura 1) fue significativamente mayor a los tratamientos VirusStop y Blindax ( $p \leq 0.05$ ) y no tuvo diferencias respecto al tratamiento con fertilización química (control). En este sentido, otros autores han reportado que, si bien el ácido salicílico promueve la resistencia sistémica en especies de cítricos, existen elicitores biológicos como *Azospirillum brasilense* Cd o algunos antibióticos que son inductores de resistencia más eficientes (Hu *et al.*, 2018; Trinidad *et*



**Figura 1.** Efecto de la aplicación de distintos elicitores (biológico, químico, de origen orgánico) y nutrición vegetal en la concentración de CLAs en plantas de limón mexicano en condiciones de invernadero después de 2 años 8 meses de la infección. Las barras representan  $\pm$  el error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba estadística LSD ( $p \leq 0.05$ ).

*al.*, 2019). En contra parte, Olivera-Coqueiro *et al.* (2015) señalan que el tratamiento con ácido salicílico aplicado a árboles de *C. sinensis* activó genes (1,425 genes) involucrados con los procesos metabólicos asociados con resistencia sistémica que los activados por quitosano (640 genes).

Las concentraciones de CLAs en los tratamientos de origen orgánico Plasmitox® (insecticida), Virus-Stop® (antiviral) y Blindax® (fungicida) (15,931.5; 9,856.95 y 6,410.26 células/100 ng ADN respectivamente) fueron significativamente diferentes respecto a los tratamientos biológicos *B. subtilis* y *F. mosseae* ( $p \leq 0.05$ ), pero no mostraron diferencia entre ellos, ni con los tratamiento de fertilización química y orgánica sin CLAs (Figura 1), lo que sugiere que la nutrición química impacta en la disminución de las concentraciones de CLAs. Una posibilidad para comprender este resultado es que la activación del sistema por elicitores de tipo insecticida, viral o fúngico puedan estar interfiriendo

con la colonización de CLAs en el floema de los árboles de limón, sin embargo, para corroborar esta explicación es necesario una investigación más detallada sobre los procesos de inducción de resistencia sistémica que supuestamente tienen estos productos.

Por último, la concentración de CLAs en la fertilización química con y sin CLAs fueron significativamente menores que en la fertilización orgánica con CLAs (14,826.1 y 4,6812.9 células/100 ng ADN respectivamente) ( $p \leq 0.05$ ); esto indica el potencial efecto benéfico de la fertilización química dado que la aparición del HLB fue tardía. Existe controversia sobre el potencial de la nutrición para reducir los efectos del HLB. Algunos autores mencionan que diferentes tipos de programas de nutrición mejorados en *C. sinensis*, no han disminuido los síntomas de la enfermedad ni la concentración de CLAs (Gottwald *et al.*, 2012; Bassanezi *et al.*, 2021), mientras que otros han demostrado, en la misma especie

y en *C. reticulata*, que la nutrición química, reduce los síntomas de la enfermedad (Pustika *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2013). Los resultados de este trabajo son similares a estos últimos autores, ya que, se observa que la fertilización química por sí sola presenta una concentración de CLas significativamente menor comparada con la fertilización orgánica con CLas e incluso respecto al tratamiento biológico con *B. subtilis*. Cabe mencionar que se detectó CLas tanto en los tratamientos con fertilización orgánica como química y “sin CLas”, esto indica que a pesar del cuidado que se tuvo con los árboles de Lm, hubo contaminación probablemente por la presencia del vector (*D. citri*), lo cual evidencia la problemática de esta enfermedad a nivel de campo e incluso a nivel de condiciones controladas como lo es en invernadero, esto evidencia el nivel de bioseguridad que debe generarse en la producción de cítricos bajo invernadero.

En conclusión, el tratamiento biológico con *B. subtilis* mostró ser el menos eficiente en la reducción de concentración de CLas en Lm. El resto de los tratamientos presentaron menores concentraciones de CLas en comparación con *B. subtilis*, sin embargo, ninguno de estos fue diferente del tratamiento con fertilización química. Se recomienda evaluar a profundidad la capacidad para inducir resistencia sistémica sin este tipo de fertilización. El tratamiento con fertilización química (sin elicitor y +CLas) mostró reducir la concentración de CLas en árboles de Lm bajo condiciones de invernadero.

### Agradecimientos

Se agradece al proyecto 2012-03-193066 de Fondo Mixto de Fomento Científico y Tecnológico CONACYT-Gobierno del estado de Michoacán.

### LITERATURA CITADA

Asad S, He P, He P, Li Y, Wu Y, Ahmed A, Wang Y, Munir S and He Y. 2021. Interactions between indigenous en-

- dophyte *Bacillus subtilis* 11-21 and nutrients inside citrus in reducing huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Pathogens* 10 (10): 1–14. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101304>
- Bassanezi RB, Primiano IV and Vescove HV. 2021. Effect of enhanced nutritional programs and exogenous auxin spraying on huanglongbing severity, fruit drop, yield and economic profitability of orange orchards. *Crop Protection* 145: 105609 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105609>
- Bove JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathology* 88: 7–37.
- Calvet C, Pinochet J, Camprubi A and Fernandez C. 1995. Increased tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* in mycorrhizal micropropagated ba-29 quince rootstock. *Mycorrhiza* 5(4): 253–258. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00204958>
- Chen K, Tian Z, He H, Long C and Jiang F. 2020. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biological Control* 151: 104419. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104419>
- Coletta-Filho HD, Carlos EF, Alves KCS, Pereira MAR, Boscariol-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>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.004>
- Graham JH, 1986. Citrus mycorrhizae - potential benefits and interactions with pathogens. *Hortscience* 21(6): 1302–1306.
- Halbert SE and Núñez CA. 2004. Distribution of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchotha: Psyllidae) in the Caribbean Basin. *Florida Entomologist* 87(3): 401–402. [http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0401:DOTACP\]2.0.CHall](http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0401:DOTACP]2.0.CHall)
- 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>
- HoNg Duc, NN and Posta K. 2018. Mycorrhiza-induced alleviation of plant disease caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and role of ethylene in mycorrhiza-induced resistance in tomato. *Acta Biologica Hungarica* 69(2):170–181. <https://doi.org/10.1556/018.69.2018.2.6>
- Hu J, Jiang J and Wang N. 2018. Control of citrus huanglongbing via trunk injection of plant defense activators and antibiotics. *Phytopathology* 108(2): 186–195. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0175-R>
- Li W, Hartung J and Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>

- Lin H, Chen C, Doddapaneni H, Duan Y, Civerolo EL, Bai X and Zhao X. 2010. A new diagnostic system for ultrasensitive 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>
- Michellini S, Nemeč S and Chinnery LE. 1993. Relationships between environmental-factors and levels of mycorrhizal infection of citrus on 4 islands in the eastern Caribbean. *Tropical Agriculture* 70(2): 135–140.
- Munir S, Li Y, He P, He P, Ahmed A, Wu Y and He Y. 2020. Unraveling the metabolite signature of citrus showing defense response towards *Candidatus Liberibacter asiaticus* after application of endophyte *Bacillus subtilis* L1-21. *Microbiological Research* 234: 126425. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126425>
- Olivera-Coqueiro DSO, de Souza AA, Takita MA, Rodrigues CM, Kishi LT and Machado MA. 2015. Transcriptional profile of sweet orange in response to chitosan and salicylic acid. *BMC Genomics* 16(1): 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1440-5>
- Ortas I. 2012. Mycorrhiza in citrus: growth and nutrition. Pp 1–35: *In*: Srivastava AK (ed.). *Advances in Citrus Nutrition*. The Netherlands: Springer Verlag [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3\\_23](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3_23).
- Pozo MJ, Cordier C, Dumas-Gaudot E, Gianinazzi S, Barea JM and Azcón-Aguilar C. 2002. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 53(368): 525–534. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.368.525>
- Pustaka AB, Subandiyah S, Holford P, Beattie GAC, Iwanami T and Masaoka Y. 2008. Interactions between plant nutrition and symptom expression in mandarin trees infected with the disease huanglongbing. *Australasian Plant Disease Notes* 3(1): 112–115. <https://doi.org/10.1007/bf03211261>
- Shen W, Cevallos-Cevallos JM, Nunes da Rocha U, Arevalo HA, Stansly PA, Roberts PD and van Bruggen AHC. 2013. Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus Liberibacter Ct* values in citrus trees infected with Huanglongbing. *European Journal of Plant Pathology* 137(4): 727–742. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0283-7>
- Sikora RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological-control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30: 245–270. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.001333>
- Song Y, Chen D, Lu K, Sun Z and Zeng R. 2015. Enhanced tomato disease resistance primed by arbuscular mycorrhizal fungus. *Frontiers in Plant Science* 6: 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00786>
- StatPoint, Inc. StatGraphics Centurion XV version 15.02.06, 2005. Warrenton, Virginia, USA. [www.statgraphics.com](http://www.statgraphics.com)
- Thakur M and Sohal BS. 2013. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *ISRN Biochemistry* 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>
- Trinidad-Cruz JR, Rincón-Enríquez G, Quiñones-Aguilar EE, Arce-Leal AP y Leyva-López NE. 2019. Inductores de resistencia vegetal en el control de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón (*Citrus aurantifolia*) mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(2): 304–317. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1901-1>
- Zhang Y, Uyemoto J and Kirkpatrick B. 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)



# HLB vector control with plant extracts and biorational products in Mexican lemon

## Control del vector del HLB con extractos vegetales y productos biorracionales en limón mexicano

**Mario Alberto Miranda-Salcedo**, Campo Experimental Valle de Apatzingán-CIRPAC-INIFAP, km 17 carretera Apatzingán-Cuatro Caminos, municipio de Parácuaro Michoacán, C.P. 60781, México; **José Mario Miranda-Ramírez\***, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Apatzingán, Innovación Agrícola Sustentable, Apatzingán, Michoacán México. km 3.5 carretera Apatzingán-Aguililla, Apatzingán Michoacán, C.P. 60710, México; **Catarino Perales-Segovia**, Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, km 18 carretera Ags-S.L.P., Aguascalientes, Aguascalientes, C.P. 20330, México; **Diana Miranda-Medina**, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-Facultad de Ciencias Agropecuarias, Av. Mariano Jiménez s/n, Apatzingán Michoacán, C.P. 60660, México.

\*Corresponding author: jose@itsa.edu.mx

Received: August 15, 2022.

Accepted: October 27, 2022.

Miranda-Salcedo MA, Miranda-Ramírez JM, Perales-Segovia C and Miranda-Medina D. 2022. HLB vector control with plant extracts and biorational products in Mexican lemon. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 20-28.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-3>

**Resumen.** En México hoy en día el Huanglongbing HLB se ha vuelto endémico en todas las áreas productoras de limón mexicano. Esta enfermedad se transmite por el insecto *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae). Con el objetivo de evaluar diferentes extractos vegetales y productos biorracionales para el control de *D. citri* en limón mexicano. Se realizaron dos evaluaciones de insecticidas en campo para el control de *D. citri* en un huerto de limón mexicano, la primera se inclu-

yeron cinco tratamientos, con muestreo previo y a los 8, 20 y 27 días después de la aplicación de los tratamientos. En la segunda se evaluaron ocho tratamientos, con muestreo previo y a los 6, 21 y 27 días, una sola variable para ambas pruebas 1) número de *D. citri*, con un diseño experimental completamente al azar, diez repeticiones. Se efectuó la prueba de normalidad y homogeneidad de las varianzas de los datos, ANDEVA ( $p \leq 0.05$ ) y Tukey ( $p \leq 0.05$ ). El extracto de meliloto ( $6.0 \text{ mL L}^{-1}$ ) a los 20 días disminuyó la densidad poblacional de los insectos en un 59.2% y el Pyrifluquinazon ( $0.58 \text{ mL L}^{-1}$ ) a los 6 días la disminución fue de 31.3%. Todos los extractos mostraron ser una alternativa sustentable para el manejo de *D. citri*.

**Palabras claves:** *Diaphorina citri*, Fitosanidad, Huanglongbing, concentrados botánicos.

La enfermedad conocida como dragón amarillo de los cítricos o “Huanglongbing” HLB, ha provocado efectos devastadores en la citricultura. Países como China, Brasil, Estados Unidos, España y México son los principales productores de cítricos donde está ha estado presente. El HLB afecta a especies de la familia de las Rutáceas y prácticamente a todas las especies de cítricos cultivados en el mundo, provocando desde una baja producción y deformación del fruto hasta la muerte del árbol (Cazares, 2014). En México la enfermedad se detectó por primera vez en julio de 2009 afectando árboles de limón mexicano en traspatio en una comunidad costera de Tizmín en Yucatán y durante 2010 se hicieron nuevas detecciones en Campeche, Colima, Sinaloa y Michoacán. Hoy en día el HLB se ha vuelto endémico en todas las áreas productoras de limón mexicano (Robles-González *et al.*, 2014).

Esta enfermedad es ocasionada por *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) y que presenta dos tipos de daños, el primero de ellos es el daño directo, las ninfas o adultos al alimentarse, extraen grandes cantidades de savia de las hojas y peciolas y excretan mielecilla en donde se desarrolla la fumagina, la cual cubre las hojas de árboles. Además, al alimentarse inyectan una toxina que detiene el crecimiento terminal y causa malformación de las hojas y brotes, lo cual impide el crecimiento normal de la planta. Los daños son mayores en el indirecto, la plaga es transmisora de una de las bacterias más importantes denominada *Candidatus Liberibacter spp.*, la cual inhabilita el floema y ocasiona la enfermedad que también conocida como “Greening de los cítricos” (Garza, 2014).

Ante ello, es importante establecer mecanismos eficientes de muestreo y vigilancia del HLB y su vector, respaldados por estudios sobre su desarrollo, con tecnologías de manejo probadas localmente para enfrentar este serio problema (Mora-Agui-

lera *et al.*, 2014). Entre las estrategias que se han evaluado recientemente para el manejo del HLB en plantas infectadas, está el uso de diferentes antibióticos como oxitetraciclina y la penicilina, está última aplicada con un surfactante, presentó los mejores resultados en cuanto al control de la bacteria, aunque ambas presentaron buenos resultados al incrementar el crecimiento de los árboles y mejorar la calidad del fruto (Zhang *et al.*, 2021). Otra estrategia para el manejo del HLB, es la evaluación de inductores de resistencia sistémica adquirida (SAR), como el acibenzolar-S-methyl (ASM), el ácido 2,6-dichloroisonicotínico (INA) y el ácido salicílico (SA), aplicados individualmente en aspersión foliares, al suelo y mediante inyección al tronco. Aunque ningún tratamiento mejoró la calidad del fruto, estos redujeron significativamente tanto la severidad de la enfermedad, como la población del vector y la caída de frutos, e incrementaron el rendimiento (Li *et al.*, 2021).

En relación al psílido, en el Estado de México, México Bautista *et al.* (2014) estudiaron el control químico de *D. citri* en el limón persa en condiciones de invernadero, utilizaron 6 tratamientos químicos diferentes, los cuales fueron: imidacloprid + betacyflutrin, spirotetramat, Imidacloprid, thiamethoxam + lambda cyalotrina y aceite parafínico de petróleo, reportaron a las 48 horas que el imidacloprid y el aceite parafínico presentaron del 83 y 100% de mortalidad de los psíidos respectivamente. En otro estudio realizado en el estado de California USA, en las áreas comerciales de cítricos se implementó un programa de control biológico para *D. citri* que inició en 2012 con una duración diez años, a base de enemigos naturales *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae), procedente de parte del área de distribución presuntamente nativa de *D. citri*, la provincia de Punjab en Pakistán. Las densidades de plagas

disminuyeron en aproximadamente un 70% debido a una combinación de parasitismo de ninfas por parte de *T. radiata* y depredación por depredadores generalistas de los sírfidos (Hoddle *et al.*, 2022). Por su parte, Chen *et al.* (2022) en Florida USA evaluaron en cítricos cuatro insecticidas: bifentrina, ciantraniliprol, dimetoato y tiametoxam para medir la toxicidad directa en *D. citri* y observaron que las proporciones de resistencia de las poblaciones de campo fueron 6.67–11.33, 3.20–36.37, 12.50–82.50 y 4.60–10.08%, respectivamente. Por tanto, se propone como objetivo de este estudio evaluar diferentes extractos vegetales y productos biorracionales para el control de *D. citri* en limón mexicano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos evaluaciones de insecticidas en campo para el control de *D. citri* en un huerto de limón mexicano de dos años de edad establecido dentro del Campo Experimental Valle de Apatzingán [CEVA] del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias [INIFAP] en el municipio de Parácuaro Michoacán, México a los 19°00'44,10" N, 102°13'38,57" O, 346 msnm (Google Heart, 2021).

**Tratamientos.** La primera evaluación en campo (1er EV) inició en marzo de 2020 y se evaluaron cinco tratamientos incluyendo el testigo (Cuadro 1).

La segunda evaluación en campo [2da EV] inició en junio de 2020 y se evaluaron ocho tratamientos incluyendo al testigo (Cuadro 2).

**Variable de estudio.** En ambas evaluaciones se consideró una sola variable de estudio, 1) número de adultos *D. citri* y para ello se realizó un muestreo previo (*a priori*) a la aplicación de los tratamientos como punto de referencia.

**Muestreos.** Para la recolección de datos en la 1er EV se realizaron muestreos en campo a los 8, 20 y 27 días después de la aplicación (dda) de los tratamientos y en la 2da EV a los 6, 21 y 27 dda. Para muestrear el número de adultos de *D. citri* presentes, se usó la técnica de golpeteo, seleccionando una rama una altura del árbol de 1.5 m, la cual se golpeó tres veces con una aza de madera y los insectos caían sobre una tabla de color morado de 38 x 21 cm se cuantificaron (Miranda-Salcedo *et al.*, 2019).

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Se usó un diseño experimental completamente al azar, con

**Cuadro 1. Tratamientos utilizados para el control de *D. citri* en limón mexicano en la primera evaluación en campo.**

Número	Tratamiento	Dosis mL L <sup>-1</sup>	Producto comercial / Compañía / País
T1	Spirotetramat 5.87%	0.5	Palgus® / Corteva / México
T2	Extracto compuesto de ajo [ <i>Allium sativum</i> (Liliaceae)], manzanilla [ <i>Matricaria chamomilla</i> (Asteraceae) y ruda [ <i>Ruta graveolens</i> (Rutaceae)] 10%	4.0	BioCrack® / Berni Labs / México
T3	Extracto de cítricos + queratina 10%	4.0	Fractal® / Berni Labs / México
T4	Extracto de meliloto <i>Melilotus indicus</i> (Fabaceae) Solución base al 50%, 500 g de la planta por L de alcohol	6.0	Producto artesanal / México
T5	Testigo (agua)	-	-

**Cuadro 2. Tratamientos utilizados para el control de *D. citri* en limón mexicano en la 2da EV.**

Número	Tratamiento	Dosis mL L <sup>-1</sup>	Producto comercial / Compañía / País
T1	Testigo (agua)	-	-
T2	Tolfenpirad al 15%	0.9	Hachi Hachi / Nichino / México
T3	Tolfenpirad al 15%	1.2	Hachi Hachi / Nichino / México
T4	Tolfenpirad al 15%	1.9	Hachi Hachi / Nichino / México
T5	Pyrufluquinazon al 20,2%	0.3	Pyriflu / Nichino / México
T6	Pyrufluquinazon al 20,2%	0.4	Pyriflu / Nichino / México
T7	Pyrufluquinazon al 20,2%	0.6	Pyriflu / Nichino / México
T8	Pyrufluquinazon al 20,2%	0.3	Pyriflu / Nichino / México

cinco y ocho tratamientos para la 1er EV y 2da EV respectivamente, diez repeticiones independientes y la unidad experimental fue un árbol.

En el análisis estadístico se realizó (preprocesamiento de datos) una transformación logística de datos Cox & Box para la variable. La transformación de Box y Cox (1964) se utiliza con el objetivo de que los supuestos de aditividad, normalidad y varianza constante sean satisfechos aproximadamente. Después de aplicar la transformación de la nueva variable transformada presenta una distribución que está más cerca de la normalidad (Peña y Peña, 1986; Castaño-Vélez, 2011). Seguido se hizo la prueba de normalidad y homogeneidad de las varianzas de los datos [Post Hoc], el ANDEVA ( $p \leq 0.05$ ) y la prueba de comparación de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ), todo lo anterior, con el paquete estadístico Statistica versión 13.3 (StatSoft Inc., 2017).

## RESULTADOS

Los resultados de la prueba de homogeneidad de las varianzas de los datos, mostraron una coincidencia satisfactoria de los datos sobre la línea recta en ambas evaluaciones, asimismo, los muestreos presentaron una distribución normal que corroboró la confiabilidad del experimento.

**1er EV.** El análisis de varianza indicó que en todos los muestreos no existe una diferencia estadística ( $p \leq 0,05$ ) entre tratamientos para las medias poblacionales, son estadísticamente iguales (Cuadro 3).

Los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), registraron un efecto diferencial entre tratamientos a los 8, 20 y 27 dda (Cuadro 4). A los 8 dda los tratamientos que mostraron una disminución de la población de *D. citri* fueron el T3 y T4 con diferencias estadísticas sig-

**Cuadro 3. Análisis de Levene's ( $=*p \leq 0.05$ ) para la variable número de *D. citri* previo a la aplicación y posteriormente a los 8, 20, y 27 dda para la 1er EV.**

Muestreo dda	CM Efecto	CM Error	F - Levene	gl	p
Previo	0.3177	0.5059	0.6280	4.45	0.6450
8	0.0800	0.1522	0.5254	4.45	0.7175
20	0.1629	0.1734	0.9399	4.45	0.4496
27	0.0736	0.2683	0.2743	4.45	0.8930

CM= cuadrado medio, gl= grados libertad, significativo ( $=*p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 4. Efecto de los tratamientos sobre *D. citri* Tukey ( $=*p \leq 0,05$ ) para la 1er EV.**

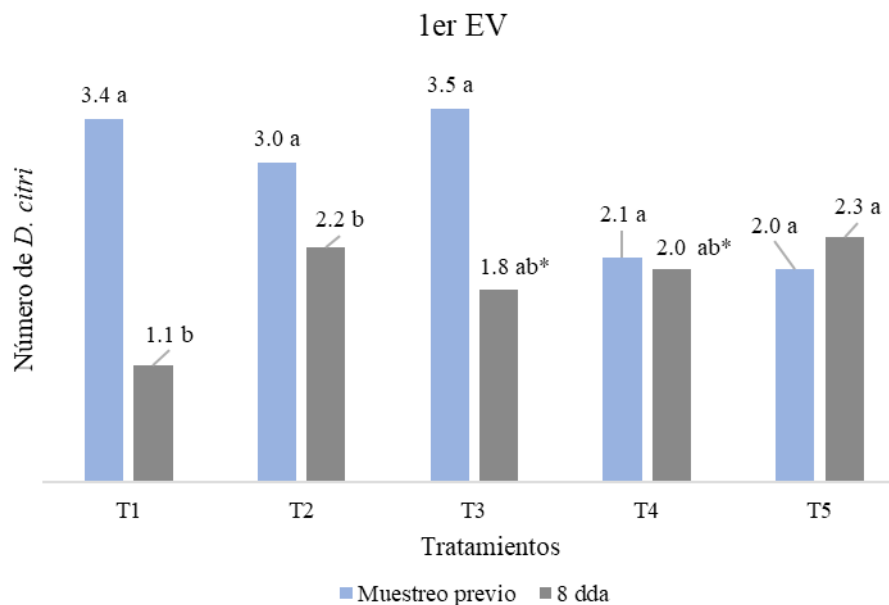
Tratamiento	Previo	Días después de la aplicación		
		8	20	27
T1	3.48 a	1.16 b	0.69 a	2.30 b
T2	3.03 a	2.28 a	1.53 ab*	3.12 ab*
T3	3.51 a	1.87 ab*	2.23 b	3.46 a
T4	2.18 a	2.00 ab*	0.89 a	4.11 a
T5	2.04 a	2.30 a	1.91 b	4.15 a

T1= Spirotetramat 0.5 mL L<sup>-1</sup>; T2= Extracto compuesto de ajo + manzanilla y ruda 4.0 mL L<sup>-1</sup>; T3: Extracto de cítricos + queratina 4.0 mL L<sup>-1</sup>; T4= Extracto de meliloto 6.0 mL L<sup>-1</sup>; T5= Testigo (agua).

\* Medias con distinta letra en la columna son estadísticamente diferentes ( $= p \leq 0.05$ ).

nificativas en relación con los demás tratamientos y el T5 mostró un incremento en la población (Figura 1). A los 20 dda el T2 presentó una diferencia estadística significativa en la disminución de la población, sin embargo, el T1 presentó el valor numérico más bajo en todas las fechas de muestreo y los tratamientos, el T4 presentó también un valor numéri-

co por debajo de 1. Para el muestreo efectuado a los 27 dda el T2 presentó diferencia estadística significativa en relación con los demás tratamientos, el T1 mostró un valor por debajo del muestreo previo y los T5, T4 y T5 presentaron valores numéricos que se ubican en un rango de 3 a 4 psíldos, valor por arriba del muestreo previo.



**Figura 1. Comparación de las medias poblacionales de los tratamientos a los 8 dda con el muestreo previo en *D. citri* para la 1er EV.**

**2da EV.** El análisis de varianza indicó que en todos los muestreos no existe una diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos para las medias poblacionales, son estadísticamente iguales (Cuadro 5).

Los resultados en la prueba de medias Tukey ( $p \leq 0,05$ ) indicaron en todos los muestreos incluyendo el previo una diferencia estadística significativa (Cuadro 6). A los 6 dda solamente se presentó diferencia estadística significativa en el T7, sin embargo, para los T2 y T3 los valores numéricos alcanzados fueron los más bajos en relación a con las demás fechas de muestreo, evidenciando así la mayor disminución de la población de los psílicos

de todos los tratamientos. A los 21 dda los T5, T6 y T7 mostraron pertenecer al mismo grupo (igualdad significativa entre tratamientos), sin embargo, la población de los insectos se incrementó; los T2, T4 y T8 mostraron pertenecer a diferentes grupos con diferencia significativa entre sí y con una disminución en la población (Figura 2). En el muestreo efectuado a los 27 dda solamente se presentó diferencia significativa en los T4 y T5, sin embargo, el T3 mostró un valor numérico por debajo de cero, evidenciando así una mayor disminución en la población de *D. citri*.

**Cuadro 5. Análisis de Levene's ( $=*p \leq 0.05$ ) para la variable número de *D. citri* previo a la aplicación y posteriormente a los 6, 21, y 27 dda para la 2da EV.**

Muestreo dda	CM Efecto	CM Error	F - Levene	gl	<i>p</i>
Previo	0.0978	0.2325	0.4207	7.72	0.8864
6	0.0908	0.0550	1.6520	7.72	0.1348
21	0.1304	0.2127	0.6131	7.72	0.7433
27	0.1232	0.1194	1.0316	7.72	0.4169

CM= cuadrado medio, gl= grados libertad, significativo ( $=*p \leq 0.05$ ).

**Cuadro 6. Efecto de los tratamientos sobre *D. citri* Tukey ( $=*p \leq 0.05$ ) para la 2da EV.**

Tratamiento	Días después de la aplicación			
	Previo	6	21	27
T1	3.37 ab*	2.61 d	3.15 b	2.94 a
T2	2.24 a	0.13 a	1.61 cd*	1.21 b
T3	2.81 ab*	0.13 a	1.35 c	0.77 d
T4	3.90 b	0.52 a	1.94 acd*	1.65 bc*
T5	2.08 a	1.91 b	2.58 ab*	2.79 a
T6	2.51 a	1.94 bc	2.87 ab*	2.39 a
T7	4.11 b	2.51 cd*	2.82 ab*	3.05 a
T8	2.40 a	1.62 b	2.26 abcd*	1.99 bcd*

T1= Testigo (agua); T2= Tolfenpirad 0.9 mL L<sup>-1</sup>; T3:Tolfenpirad 1.2 mL L<sup>-1</sup>; T4=Tolfenpirad 1.9 mL L<sup>-1</sup>; T5= Pyrifluquinazon 0.3 mL L<sup>-1</sup>; T6= Pyrifluquinazon 0.4 mL L<sup>-1</sup>; T7= Pyrifluquinazon 0.6 mL L<sup>-1</sup>; T8= Pyrifluquinazon 0.3 mL L<sup>-1</sup>.

\* Medias con distinta letra en la columna son estadísticamente diferentes ( $=*p \leq 0.05$ ).

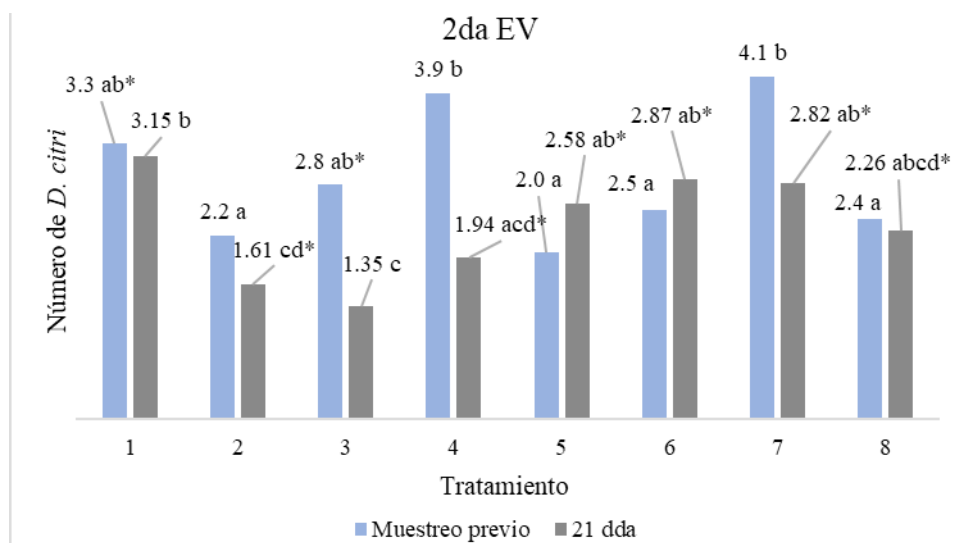


Figura 2. Comparación de las medias poblacionales de los tratamientos a los 21 dda con el muestreo previo en *D. citri* para la 2da EV.

## DISCUSIÓN

Este trabajo corrobora un análisis sobre el control de las poblaciones del psílido asiático en limón mexicano. Los resultados evidenciaron que existe una alternativa sustentable para el manejo de las poblaciones del psílido, con insecticidas comerciales y botánicos.

Aunque los resultados obtenidos para spirotetramat en la prueba de medias Tukey ( $p \leq 0,05$ ) fueron numéricos, controló las poblaciones de *D. citri* en todos los muestreos y a los 20 dda el efecto fue de 80.1% en relación al muestreo previo, por lo cual sigue representando una alternativa para el control del psílido, esto conlleva, a realizar un muestreo en campo que determine el umbral de daño de la plaga antes de tomar la decisión de aplicar un producto. Por su parte, Miranda-Ramírez *et al.* (2021), observaron que el Spirotetramat causó los mayores efectos a los 20 dda, con una disminución poblacional del psílido de 36.9%. Fiaz *et al.*

(2018), evaluaron este insecticida en dosis de 90 gr de i.a. por ha<sup>-1</sup> para *D. citri* en plantas de cítricos y reportaron que la reducción máxima en la media de la población para el spirotetramat se observó a los 3 dda de los tratamientos, alrededor del 57 y el 66% respectivamente.

En relación a los extractos evaluados, el extracto de cítricos + queratina mostró una reducción en la densidad poblacional a los 8 y 20 dda (1.8 psílicos, 46.5% y 2.2 psílicos, 36.4%) respectivamente. Miranda-Salcedo *et al.* (2020) observaron que el extracto de cítricos + queratina presentó valores de 1.2 *D. citri* en muestreo previo y a los 3, 7 y 18 dda los valores fueron 0, 0.3 y 0.6 respectivamente en limón mexicano. En caso de los extractos de compuesto de ajo + manzanilla y ruda, y el extracto de meliloto mostraron un efecto de repelencia de los insectos hasta los 20 dda de 1.5 psílicos con 49.4% y 0.89 con 59.2% a correspondencia, posiblemente debido al manejo agroecológico con que se trabaja en la huerta, la cual no recibe aplicaciones de

insecticidas, cuenta con la presencia de plantas arvenses entre las hileras, lo cual mantiene el arraigo de los enemigos naturales. Sin embargo, Molina *et al.* (2022) destacan que entre las especies vegetales que se han utilizado para el control de insectos está el ajo por sus agentes activos alicina y disulfuro de alilpropilo. Romo-Asunción, *et al.* (2016) reportaron que las especies del género *Melilotus indicus*. y *M. albus*, contienen varios compuestos bioactivos como terpenos, esteroides y polifenoles.

El Tolfenpirad mostró ser una buena alternativa en la disminución de las poblaciones del psílido asiático en limón mexicano, sin embargo, el uso intensivo de este insecticida basado en aplicaciones por calendario puede causar una evolución en de resistencia en el insecto. Al respecto Tang *et al.* (2020) encontraron que las aplicaciones foliares en cítricos de Tolfenpirad en dosis de 50 mg kg de ingrediente activo para *D. citri* con una eficacia de 78.1%, con un efecto de los 3 hasta los 30 dda.

Miranda-Ramírez *et al.* (2021) observaron que el Pyrifluquinazon en dosis de 0.5 mL L<sup>-1</sup> aplicado al follaje en limón mexicano a 3 dda disminuyó la población de psílicos en un 87,7%, seguido a los 6 dda observaron todo lo contrario, un efecto nulo en la mortalidad de 0%. Lo anterior varía con lo encontrado en este trabajo para el Pyrifluquinazon en dosis de 0.5 mL L<sup>-1</sup> a los 21 dda se presentó una disminución en la población de los insectos de más de 31.31%, sin embargo, en las dosis de 0.3 y 0.4 mL L<sup>-1</sup> a los 21 incrementó la población. Lo anterior corrobora que la dosis y el tiempo de aplicación son dos factores importantes para la disminución de la población del psílido.

## CONCLUSIONES

Se logró obtener una alternativa para el manejo sustentable de *D. citri* a través de los productos a

base de extracto de cítricos + queratina, extractos de compuesto de ajo + manzanilla y ruda, y el extracto de meliloto.

El Tolfenpirad mostró una la disminución significativa de las poblaciones del psílido asiático en limón mexicano, sin embargo, hay que considerar que esta molécula con un uso excesivo puede llegar a causar resistencia al psílido.

Es recomendable realizar monitoreos constantes por semana del psílido para tomar la decisión de aplicar un insecticida, además de rotar diferentes productos de bajo impacto ambiental en las dosis correctas.

## AGRADECIMIENTOS

Estas investigaciones fueron financiadas a través del proyecto “Validación y transferencia de tecnología para recuperar la productividad de plantaciones de limón mexicano en ambientes de alta incidencia de HLB en Colima, Michoacán, Oaxaca y Guerrero” apoyado por el Sistema Producto Nacional de limón mexicano. Se agradece el apoyo a Bioibérica y Nichino México A. C. por proporcionar sus moléculas para este estudio.

## LITERATURA CITADA

- Bautista N, Ruiz I, Sánchez H and Valenzuela F. 2014. Control Químico de *Diaphorina Citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Liviidae) en Lima Persa. *Acta Zoológica Mexicana* 31(1): 41-47. <http://www.scielo.org.mx/pdf/azm/v31n1/v31n1a6.pdf>
- Box GEP & Cox DR. 1964. An Analysis of Transformations. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 26(2): 211-252. <https://www.ime.usp.br/~abe/lista/pdfQWaCM-boK68.pdf>
- Castaña-Vélez EA. 2011. Una estimación no paramétrica y robusta de la transformación Box-Cox para el modelo de regresión. *Lecturas de economía*. 75: 89-106. <http://www.scielo.org.co/pdf/le/n75/n75a5.pdf>
- Cazares N. 2014. Estrategias biotecnológicas para el control de *Diaphorina citri* vector de la bacteria *Candidatus liberibacter asiaticus*, agente causal del Huanglongbing [Tesis doctoral]. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. Nuevo León, México.
- Fiaz M, Afzal M and Majeed MZ. 2018. Synergistic action of *Isaria fumosorosea* Wize (Hypocreales: Cordycipitaceae) and spirotramat against Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) under field



- conditions. Pakistan Journal of Agricultural Research. 31(2): 194-201. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjar/2018/31.2.194.201>
- Garza E. 2014. El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* y su manejo en la zona media y Huasteca Potosina. (pp.22) [Folleto para Productores]. <http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/1000.pdf>
- Google Heart. 2021. Parácuaro Michoacán, México. Google Maps. USA. [https://earth.google.com/web/search/Antunez+municipio+de+Par+c3%a1cuaro+Michoac+c3%a1n+M+c3%a9xico/@19.01298263,-102.22692688,344.00993657a,769.03571349d,35y,-0h,0t,0r/data=CigiJgokCer2pJF1GTJAEef2pJF1GTLAGewjuj\\_R2jbA1bAvgTraRV7](https://earth.google.com/web/search/Antunez+municipio+de+Par+c3%a1cuaro+Michoac+c3%a1n+M+c3%a9xico/@19.01298263,-102.22692688,344.00993657a,769.03571349d,35y,-0h,0t,0r/data=CigiJgokCer2pJF1GTJAEef2pJF1GTLAGewjuj_R2jbA1bAvgTraRV7)
- Chen X D, Qureshi JA and Stelinski LL. 2022. Monitoring of *Diaphorina citri* populations from Florida reveals reduced susceptibility to cyantraniliprole and thiamethoxam. Journal of Applied Entomology. <https://doi.org/10.1111/jen.13011>
- Hodde MS, Hodde CD, Morgan DJW and Milosavljević I. 2022. Successful biological control of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in California, pp. 127–143. In: Van Driesche RG, Winston RL, Perring TM, and Lopez VM. (Eds.). Contributions of Classical Biological Control to the U.S. Food Security, Forestry, and Biodiversity. FFAAST-2019-05. USDA Forest Service, Morgantown, West Virginia, USA. <https://bugwoodcloud.org/resource/files/23194.pdf>
- Li J, Kolbasov VG, Pang Z, Duan S, Lee D, Huang Y, Xu J, Teper D, Lamichhane T and Wang N. 2021. Evaluation of the control effect of SAR inducers against citrus Huanglongbing applied by foliar spray, soil drench or trunk injection. Phytopathology Research (2021) 3:2: 1-15. <https://doi.org/10.1186/s42483-020-00079-2>
- Miranda-Ramírez JM, Perales-Segovia C, Miranda-Salcedo MA and Miranda-Medina D. 2021. Insecticidas de bajo impacto ambiental para el control de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle). Revista chilena de entomología, 47 (4), 723-732. <https://dx.doi.org/10.35249/rche.47.4.21.09>
- Miranda-Salcedo MA, Perales-Segovia C, Cortés-Moncada E y Miranda-Ramírez JM. 2020. Manejo agroecológico de *Diaphorina citri* Kuwayama 1908 (Hemiptera: Liviidae) en limón mexicano, en Michoacán, México. Entomología Mexicana 7: 176-182.
- Molina LXZ, Díaz IFC, de los Santos-Villalobos S, Cárdenas CIC, Ramírez SR, and Anaya ER. 2022. Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. Revista mexicana de ciencias agrícolas 27: 69-79.
- Mora-Aguilera GJ, Flores-Sánchez G, Acevedo-Sánchez S, Domínguez-Monge C, Oropeza-Salín A, Flores-Olivas R, González-Gómez G and Robles-García P. 2014. Vigilancia Epidemiológica y Estatus Actual del Amarillamiento Letal del Cocotero, Punta Morada de la Papa y Huanglongbing de los Cítricos (HLB) en México. Revista Mexicana de Fitopatología 32(2): 120-131. [https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2\\_04.pdf](https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_04.pdf)
- Peña D and Peña JI. 1986. Un contraste de normalidad basado en la transformación de Box-Cox. Estadística Española. 110: 33-46. [https://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/13880/contraste\\_pena\\_EE\\_1986.pdf](https://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/13880/contraste_pena_EE_1986.pdf)
- Robles-González MM, Orosco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MA y Velázquez-Monreal JJ. (2014). Huanglongbing. P.p. 231-26. In: Orosco-Santos M, Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA and Bermúdez-Guzmán M de J. (eds.). El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Colima México. 447 p.
- Romo-Asunción D, Ávila-Calderón MA, Ramos-López MA, Barranco-Florido JE, Rodríguez-Navarro S, Romero-Gómez S, Aldeco-Pérez EJ, Pacheco-Aguilar JR and Rico-Rodríguez MA. 2016. Juvenomimetic and insecticidal activities of *Senecio salingus* (Asteraceae) and *Salvia microphylla* (Lamiaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), Florida Entomologist 99(3): 345-351. <https://doi.org/10.1653/024.099.0301>
- Tang T., Zhao M, Wang P, Xiao Y, Kong Huang S and Wei, F. 2020. Field Efficacies and Joint Actions of Beta-cyfluthrin Mixed With Thiamethoxam or Tolfenpyrad Against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Journal of Economic Entomology 20(20): 1–7. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa196>
- TIBCO Inc. (2017) STATISTICA data analysis software system, Version 13.3 for Windows, TIBCO Inc, Tulsa, OK, USA. Consultado el 7 de julio de 2021. [www.tibco.com/products/data-science](http://www.tibco.com/products/data-science)
- Zhang M, Karupaiya P, Zheng D, Sun X, Bai J, Ferrarezi R. S, Powell CA, and Duan Y. 2021. Field Evaluation of Chemotherapy on HLB-Affected Citrus Trees With Emphasis on Fruit Yield and Quality. Frontiers in Plant Science 12: 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.611287>

# Genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strains from the pacific center in Mexico

## Diversidad genética de cepas de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ en cítricos del Pacífico centro de México

Gilberto Manzo-Sánchez\*, Fernando Romero-Parra, Salvador Guzmán-González, Marco Tulio Buenrostro-Nava, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Colima; Autopista Colima-Manzanillo km 40, CP 28930, Tecomán, Colima, México; Mario Orozco-Santos, José Joaquín Velázquez-Monreal, Miguel Ángel Manzanilla-Ramírez, INIFAP-Campo Experimental Tecomán, Colima, CP 28100, Tecomán, Colima, México. \*Corresponding author: gmanzo@uacol.mx.

Received: August 10, 2022.

Accepted: November 10, 2022.

Manzo-Sánchez G, Romero-Parra F, Guzmán-González S, Buenrostro-Nava MT, Orozco-Santos M, Velázquez-Monreal JJ and Manzanilla-Ramírez MA. 2022. Genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strains from the pacific center in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 29-42.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-4>

**Abstract.** The Huanglongbing (HLB) is associated with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLAs). Is a destructive disease of citrus. The aim of this study was to determine the genetic diversity of 90 strains of infected leaves of eight citrus species trees from the Pacific Center. Genetic diversity among CLAs was estimated by fourteen variable numbers of tandem repeat (VNTRs) loci. Three loci were polymorphic, SSR005, SSR077 which amplified four alleles everyone, while the locus SSR-A amplified two alleles, and the other loci only one allele per locus, resulting in a total of 21 alleles. Dendrogram analysis showed two

clusters. No clear genetic structure was found in related to geographical origin or host. The cluster I was mostly constituted by the majority of CLAs strains (82%), but in the cluster II comprised twelve strains of CLAs collected from location Tecoman, State of Colima, and were obtain of different hosts species. The frequency of 17 haplotype among strains of CLAs from the States of Nayarit, Jalisco, Colima and Michoacán was analyzed; in Colima 14 haplotypes were determinate, while in Michoacan all strains were identified in one haplotype. These results indicate a large genetic diversity among the CLAs strains present in the Pacific Center in Mexico.

**Key words:** Huanglongbing, Mexican lime, SSR markers.

Huanglongbing (HLB) is a highly destructive citrus disease associated a *Candidatus Liberibacter* spp., a phloem-limited, gram-negative and

noncultured alpha-proteobacterium (Jagoueix *et al.*, 1994, Ghosh *et al.*, 2018, Dai *et al.*, 2019). Based on geographic area of their origin and temperature tolerance; they are classified into three species: ‘*Ca. L. asiaticus*’ (CLas), ‘*Ca. L. africanus*’ (CLaf), and ‘*Ca. L. americanus*’ (CLam). These bacteria are transmitted by two psyllids vector, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) that transmits both CLas and CLam and *Trioza erytreae* Del Guercio (Hemiptera: Psyllidae) that is responsible for CLaf transmission (Aubert, 1987; Bové, 2006).

The disease can be spread by contaminated plant material grafts that propagate long distances (Hartung *et al.*, 2010; Wang and Trivedi, 2013). The detection of genetic diversity within pathogen populations is fundamental for ecological and epidemiological studies of a disease (Wang and Trivedi, 2013). Knowledge of the genetic structure of a population of pathogens is a valuable technique useful to know the source or origin of a pathogen and the management of the disease (Islam *et al.*, 2012). The first study for genetic differentiation of CLas populations were made using conserved genes that genetic marker, for example: 16S rDNA and 16S/23S regions, *omp*, the *rlp* gene cluster and the bacteriophage-type DNA polymerase region (Bastianel *et al.*, 2005; Adkar *et al.*, 2009; Tomimura *et al.*, 2009; Miyata 2011).

However, genetic diversity into the conserved genes has limited discriminatory power to differentiate closely-related isolates in a population (Islam *et al.*, 2012) and most consisted of single-nucleotide polymorphisms (SNPs). In addition, the completion of genome sequence of CLas strain Psy 62 is now available (Duan *et al.*, 2009), which to facilitated recently the identifying variable number of tandem repeats (VNTRs), also known as microsatellite or short sequence repeat, which demonstrated the potential for examination of CLas genetic variability (Chen *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2008; Katoh *et al.*, 2011; Katoh *et al.*, 2012; Islam

*et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013). The VNTRs can provide sufficient resolution for differentiating closely related isolates and for tracking genotypes of interest; additionally, these markers may help identify the source of invasive strains (Islam *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2019).

In Mexico, the HLB was first reported in July 2009 in the municipality of Tizimin, state of Yucatan and in November, of the same year, a new focus of CLas was reported in the Pacific Center Mexican in the states of Jalisco and Nayarit and for 2010 in the states of Sinaloa and Colima reported presence of the disease (SENASICA, 2010). Actually, around 80% of the citrus producing areas are infected. Knowledge about the genetic diversity of Mexican CLas from different geographical areas and citrus cultivars is indispensable for the management of disease risk. Limited studies are available on the characterization and discrimination of Mexican strains of CLas.

The objective of this study was carried out to characterize strains of CLas with the aim of identifying possible relationship between of geographic origin and host in relation with the genetic diversity.

## MATERIALS AND METHODS

**Sampling strategy.** Leaf samples were collected from different infected citrus species, including Mexican lime (*Citrus aurantifolia*), Persian lime (*C. latifolia*), sweet orange (*C. sinensis*), grapefruit (*C. aurantium*), lime (*C. limetta*), alemow (*C. macrophylla*), volkameriana (*C. volkameriana*) and mandarin (*C. reticulata*) that showed blotchy mottle and yellowing, the classical symptoms of HLB disease, of different groves of the States of Colima, Jalisco, Michoacan and Nayarit, all located in the Pacific Center from Mexico (Table 1).

**Table 1. Information of the *Candidatus Liberibacter asiaticus* strains collected from different host and geographic locations in Mexico.**

Dendrogram ID	Location ID	Host (genre/specie)	Host (common name)	Location	Year of collection	Cluster
<b>Strains from Colima</b>						
Colima1	ColCol1	<i>Citrus macrophylla</i>	Alemow	Colima		I
Colima2	ColCol2	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Colima		I
Colima3	ColCol3	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Colima		I
Colima4	ColCol4	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Colima		I
Colima5	ColCol5	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Colima		I
Colima6	ColCol6	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Colima		I
Colima7	ColCol7	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Colima		I
Colima8	ColCol8	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Colima	2012	I
Colima9	ColCol9	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Colima	2012	I
Colima10	ColCol10	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Colima	2012	I
Colima11	CuCol1	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Cuauhtemoc	2012	I
Colima12	CuCol2	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Cuauhtemoc	2012	I
Colima13	CuCol3	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Cuauhtemoc	2012	I
Colima14	CuCol4	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Cuauhtemoc	2012	I
Colima15	CuCol5	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Cuauhtemoc	2012	I
Colima16	CuCol6	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Cuauhtemoc	2012	I
Colima17	TecCol1	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Tecoman	2010	II
Colima18	TecCol2	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Tecoman	2011	I
Colima19	TecCol3	<i>Citrus aurantium</i>	Grapefruit	Tecoman	2011	II
Colima20	TecCol4	<i>Citrus aurantifolia</i>	Lime	Tecoman	2011	I
Colima21	TecCol5	<i>Citrus reticulata</i>	Mandarin	Tecoman	2011	II
Colima22	TecCol6	<i>Citrus macrophylla</i>	Macrophylla	Tecoman	2011	II
Colima23	TecCol7	<i>Citrus macrophylla</i>	Macrophylla	Tecoman	2011	II
Colima24	TecCol8	<i>Citrus macrophylla</i>	Macrophylla	Tecoman	2011	II
Colima25	TecCol9	<i>Citrus macrophylla</i>	Macrophylla	Tecoman	2011	II
Colima26	TecCol10	<i>Citrus macrophylla</i>	Macrophylla	Tecoman	2011	II
Colima27	TecCol11	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Tecoman	2011	II
Colima28	TecCol12	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Tecoman	2011	II
Colima29	TecCol13	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Tecoman	2011	II
Colima30	TecCol14	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Tecoman	2011	II
Colima31	CoqCol	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coquimatlan	2011	I
<b>Strains from Michoacan</b>						
Michoacan1	CoaMich1	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan2	CoaMich2	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan3	CoaMich3	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan4	CoaMich4	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan5	CoaMich5	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan6	CoaMich6	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan7	CoaMich7	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan8	CoaMich8	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan9	CoaMich9	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan10	CoaMich10	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan11	CoaMich11	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan12	CoaMich12	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Coahuayana	2012	I
Michoacan13	CoaMich13	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Coahuayana	2012	I

Table 1. Continue.

Dendrogram ID	Location ID	Host (genre/specie)	Host (common name)	Location	Year of collection	Cluster
Michoacan14	CoaMich14	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Coahuayana	2012	I
Michoacan15	CoaMich15	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan16	CoaMich16	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan17	CoaMich17	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan18	CoaMich18	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan19	CoaMich19	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan20	CoaMich20	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan21	CoaMich21	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan22	CoaMich22	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan23	CoaMich23	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan24	CoaMich24	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan25	CoaMich25	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan26	CoaMich26	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan27	CoaMich27	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
Michoacan28	CoaMich28	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Coahuayana	2012	I
<b>Strains from Jalisco</b>						
Jalisco1	CiJal1	<i>Citrus reticulata</i>	Mandarin	Cihuatlan	2012	I
Jalisco2	CiJal2	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Cihuatlan	2012	I
Jalisco3	CiJal3	<i>Citrus aurantifolia</i>	Lime	Cihuatlan	2012	I
Jalisco4	BNJal1	<i>Citrus aurantifolia</i>	Lime	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco5	BNJal2	<i>Citrus aurantifolia</i>	Lime	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco6	BNJal3	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco7	BNJal4	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco8	BNJal5	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco9	BNJal6	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco10	BNJal7	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco11	BNJal8	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco12	BNJal9	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco13	BNJal10	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Barra de Navidad	2012	I
Jalisco14	MeJal1	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Melaque	2012	I
Jalisco15	MeJal2	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Melaque	2012	I
Jalisco16	SMHJal1	<i>Citrus x latifolia</i>	Persian lime	San Martin de Hidalgo	2012	II
Jalisco17	CasCJal	<i>Citrus x latifolia</i>	Persian lime	Casimiro Castillo	2012	I
<b>Strains from Nayarit</b>						
Nayarit1	TepNay1	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Tepic	2011	I
Nayarit2	TepNay2	<i>Citrus x latifolia</i>	Persian lime	Tepic	2012	I
Nayarit3	TepNay3	<i>Citrus x latifolia</i>	Persian lime	Tepic	2012	I
Nayarit4	TepNay4	<i>Citrus x latifolia</i>	Persian lime	Tepic	2012	I
Nayarit5	NvoVall1	<i>Citrus reticulata</i>	Mandarin	Nuevo Vallarta	2012	I
Nayarit6	NvoVall2	<i>Citrus reticulata</i>	Mandarin	Nuevo Vallarta	2012	I
Nayarit7	NvoVall3	<i>Citrus x sinensis</i>	Sweet orange	Nuevo Vallarta	2012	I
Nayarit8	NvoVall4	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Nuevo Vallarta	2012	I
Nayarit9	NvoVall5	<i>Citrus aurantifolia</i>	Lime	Nuevo Vallarta	2012	I

Table 1. Continue.

Dendrogram ID	Location ID	Host (genre/specie)	Host (common name)	Location	Year of collection	Cluster
<b>Strains from Yucatan</b>						
Yucatan1	ProYuc1	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Progreso	2011	I
Yucatan2	ProYuc2	<i>Citrus x latifolia</i>	Persian lime	Progreso	2011	I
Yucatan3	MocYuc2	<i>Citrus volkameriana</i>	Volkameriana	Moctezuma	2011	I
Yucatan4	MocYuc1	<i>Citrus x latifolia</i>	Persian lime	Moctezuma	2011	I
<b>Strains from Sinaloa</b>						
Sinaloa	IslaPiedra	<i>Citrus aurantifolia</i>	Mexican lime	Isla de Piedra	2011	I

**Grafting of infected material.** We performed the collection of citrus budwood from plants showing typical symptoms caused by HLB in major citrus producing regions of the states of Colima, Jalisco, Michoacan, Nayarit and Yucatan. Samples were placed in paper bags, labeled, and transported further processing. All samples were side-grafted on *C. volkameriana* or *C. macrophylla* rootstock and were kept under greenhouse covered with mesh antiaphids at 34/25°C (day/night) and a photoperiod 14 h light and 10 h darkness for 3 weeks. Weekly observations were made for symptoms appearance (Garnier *et al.* 2000).

**DNA extraction.** Basically, leaf samples were collected from citrus trees with blotchy mottle and blotchy mottle-like symptoms. Leaves were washed under running tap water and blotted dry with paper towels. The midribs were then excised from the leaf blade. Total genomic DNA was extracted from 4–5 midribs per sample. Samples were ground in liquid nitrogen and DNA was extracted using the CTAB method. Precipitated DNA was dissolved in 100 µL of TE buffer. The quality of DNA samples was checked by spectrophotometry using Nanodrop 2000 (Thermo Scientific; U.S.A.) and electrophoresis in 1.2% agarose gels. All DNA samples were subjected to PCR amplification with

primers set OI1/OI2c (Jagoueix *et al.*, 1994) to confirm infection of the corresponding trees from which tissue was collected.

**VNTRs analysis.** The VNTRs analysis was performed with 14 pairs of oligonucleotides, each pair for different locus (Table 1) in a total of 90 strains of CLAs. PCR reaction was carried out in GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) in a total volume of 20 µL which contained 50 ng of template DNA, 0.1 µM of each oligonucleotide (Table 1), 200 mM dNTP's mixture, 20 mM of MgCl<sub>2</sub> (30 mM), 1X PCR buffer and 2.5 U of *Taq* Polymerase. The thermal cycles were as follows: initial denaturation at 92 °C for 2 min, 35 cycles of amplification at 92 °C each 30 s, annealing at 54 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1 min and a final cycle at 72 °C for 5 min (Katoh *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2012). Subsequently, the PCR products were separated by gel electrophoresis in 1.5% agarose, stained in ethidium bromide solution and visualized in a ChemiBis MF-2 photodocumenting (Bio-Imaging Systems, Neve Yamin, Israel).

**Confirmation of CLAs by sequencing.** To corroborate the presence of CLAs, only two PCR-amplified products were purified from

agarose gels using a commercial kit method (QIAGEN, Hilden, Germany). The sequencing was performed at LANGEBIO (CINVESTAV, Irapuato, Mexico). DNA sequences were compared by using the Blast Sequence Analysis Tool (Madden, 2013) and T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) obtained DNA sequences were compared to those from other *Candidatus* species such as ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ (CLsol) (AN. CP002371.1), ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ (CLam) (AN. CP006604.1) and ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’ (CLaf) (AN. CP004021.1) and ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (AN. KJ885230.1, AN. CP029348.1).

**Data analysis.** The analysis began with the direct observation of the bands obtained in the agarose gel, which are numbered according to their molecular weight and it was assumed that such bands or amplified fragments in different isolates were identical if they had the same molecular weight. Data were considered haploid. We conducted a binary data matrix (assigning a numerical value of 1 to assume the presence and 0 for absence) and genetic variability was estimated by the similarity index developed by Dice (1945) and adapted by Nei (1973) for data molecular ( $H = 1 - \sum X_i^2$ , where  $H$  = population genetic variability and  $\sum X_i$  is the frequency of different alleles at a particular locus, which ranges from zero to one). Then, the matrix was made with a dendrogram using the arithmetic method of unweighted pair group (UPGMA) NTSYS-pc program version 2.0 (Rohlf 1997).

## RESULTS

Of the 90 samples collected in the states of Colima, Michoacan, Jalisco, Nayarit, Yucatan and Sinaloa, all induced severe vein yellowing, leaf mottle and nutritional-like deficiency symptoms in Alemow or Macrophylla within six months from

grafting thus were retained as affected by HLB, which will be kept as an *in vivo* collection.

Fourteen VNTRs loci were used for determinate the genetic diversity in 90 Mexican CLAs collected from different citrus species and geographical regions, the results showed that the loci SSR005 and SSR077 amplified 4 alleles everyone, while SSR-A amplified two alleles, while the other loci (SSR001; SSR002; SSR006; SSR007; SSR010; SSR013; SSR014; SSR022; SSR024; SSR-D and SSR-E) only one allele per loci, resulting a total of 21 alleles (Table 2).

Dendrogram generated indicated two clusters among CLAs strains analyzed in this study (Fig. 1). In relation of the geographical origin of the strains, those from Colima were found in both clusters; however, it was not possible to demonstrate the relationship between their origin. In comparison with the host, cluster I was formed by CLAs strains collected of Mexican lime, sweet orange, lime, Persia lime and volkameriana lemon; while the cluster II was constituted by Mexican lime, grapefruit, alemow and mandarin. Only, the samples of Mexican lime were present in both clusters.

Based on the combination of the allelic data obtained from 14 VNTRs loci, 17 haplotypes were identified in a total of 90 strains from Colima, Nayarit, Jalisco and Michoacan, for which only 2 haplotypes were found to be unique at Nayarit (Fig. 2). An overlapping of identical haplotype was found in different geographical locations, such as haplotype 1, which was found in strains from all locations. While haplotypes 1, 2, 3 and 13 were found in only two or three states. However, majority of the haplotypes (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, and 15) were found in Colima state only. When haplotypes distribution was compared with respect to host, no identical haplotypes appeared to be restricted to a particular type of the citrus species.

**Table 2.** Characteristics of the oligonucleotides primers and number of alleles generated in strains of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from Mexico.

Locus	Foward primer sequence	Reverse primer sequence	Type of repeat motifs	T (° C)	Size range (bp)	No. of alleles
SSR001	TGAAGTAGCTCTGCAATATCTGA	GGTGAATTAGGATGGAAATGC	(TACAGAA) <sub>8</sub>	54	400-450	1
SSR002	TTGATAATATAGAAAGAGGCGAAGC	TCCATACCCAAAAGAAAAGCA	(CAGT) <sub>8</sub>	54	500-650	1
SSR005	ATTGAAGGACGAAACCGATG	TCCAAGGTTTTCAAATTGC	(CAGT) <sub>8</sub>	54	500-650	4
SSR006	TCATGTTGATCAGACGCTTTTT	CACTTAATAACGCCCCGAAA	(TCTTTACA) <sub>3</sub>	54	500-650	1
SSR007	TGGATAGCATGCTCATTGAA	AAGGCAAATTTCCCACATCG	(TCAGTA) <sub>3</sub>	54	500-650	1
SSR010	CGTCAGAATAATCAGCGCATA	TGGATTCGAAAGAACCGTCT	(CAAT) <sub>3</sub>	54	500-650	1
SSR013	AGATTGATGGGCGATAGCTG	TGTCGCATTGTAGACCCCTGA	(TAACTTG) <sub>2</sub>	54	500-650	1
SSR014	AATCCCTTGCTCGTAGGTGA	AAAGATAAGCGACCCGGATT	(TAAAGAG) <sub>2</sub>	54	400-500	1
SSR022	AATCCCTTGCTCGTA GGTGA	ATTGAGCCGTGAAACTTCG	(AAAC) <sub>3</sub>	54	500-650	1
SSR024	GTGGGGAGAGAAGTCGGTTT	ACCGTACCGCTCCAATATGA	(TTGG) <sub>3</sub>	54	500-650	1
SSR077	TGACTGATGGCAAAAAGATGG	AGACACGCCAAACAAGGAAT	(TTTG) <sub>14</sub>	54	500-600	4
SSR-A	CGCCTACAGGAATTCGTTACG	TCTCATCTTGTTTCGTTTATCC	(TATTCTG) <sub>8</sub>	50	241-434	2
SSR-D	CGGTGTCGGTATCGGTATCATTG	CGAAGAAGAGACGGAGGTTAAGC	(TTC) <sub>5</sub>	55	158-174	1
SSR-E	GATCAGTAGTCTATCACCAC	TACTGGAAACAAATGGAATAC	(CTTGTGT) <sub>5</sub>	50	173-290	1



The sequencing results were expressed as a dendrogram. In the phylogenetic analysis, two sequences obtained in this study were compared to those from other '*Candidatus Liberibacter spp.*' (Fig. 4). These two sequences were clustered with CLas (AN. CP029348.1) sequence from Anaheim, USA being genetically similar (0.03621). This cluster was associated with the origin and closeness of this strain. The CLam (AN. CP006604.1), CLaf (AN. CP004021.1), CLsol (AN. CP002371.1) species of *Candidatus*, were not genetically similar, only they present some conserved regions of DNA (Fig. 3). The CLas sequence from Maharashtra, India (AN. KJ885230.1) was also genetically different from the sequences in this study; probably from different geographical origin of this strain (Asia).

## DISCUSSION

The study on genetic diversity of CLAs is limited, initially were employed to certain genes, such as RNA 16S/23S, *omp* region, sequence-rpoBC rplKAJL operon, closely-related effector genes *lasAI* and *lasAII* and miniature inverted-repeat transposable elements, *MITEs* (Villechanoux *et al.*, 1993; Planet *et al.* 1995; Jagoueix *et al.*, 1997; Subandiyah *et al.*, 2000; Bastianel *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008; Adkar *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2009; Furuya *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015; Puttamuk *et al.*, 2014, where some sequencing has been unsuccessful (Deng *et al.*, 2008) or limited to a few SNPs (Bastianel *et al.*, 2005) and may not be sufficient for population analyses.

However, with the recent publication of the complete sequence of its genome (Duan *et al.*, 2009), the availability of this information, has facilitated the implementation of methodologies such as VNTRs, which demonstrated that can

be used to estimate the genetic diversity and populations structure of strains outside of Asia continent (Katoh *et al.*, 2012; Islam *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013). The power of VNTRs facilitate the analysis of regional CLAs populations from HLB-affected plants and to prove the identification of introduction patterns and predict the possible relationship of HLB-associated *Liberibacter* distribution amongst growing regions (Islam *et al.*, 2012).

A similar study was previously carried out to a regional or country scale to better understand CLas genetic variation, for example Meneguim *et al.* (2011), employed PCR-RFLP analyses and sequencing of the  $\beta$ -operon ribosomal protein genes for conducted studies of the genetic diversity of strains of CLAs present in the state of Paraná, Brazil, showing a phylogenetic tree where all strains were genetically identical, regardless of geographical origins. Similarly, to investigate the diversity of 23 CLAs from seven provinces in China, Hu *et al.* (2011), used the *omp* genes and showed that the isolates under study shared 99% identity with CLAs (AY642159), and the phylogenetic tree the isolates from China were grouped with the Asian strains.

The present study 90 strains were examined from different states of Mexico and different citrus host mediated VNTRs-based analysis, which demonstrated the capacity for determinate the genetic diversity of Mexican CLAs strains, not be possibly related the geographic origin with the molecular analysis. Initially, Katoh *et al.* (2011), developed 27 loci and were used to identify the genetic diversity of 84 CLAs strains of Japan, in which only four loci were highly polymorphic. The locus SSR001 detected nine alleles, the locus SSR002 three, the SSR005 seven alleles and three alleles the locus SSR077. Nevertheless, in this study, analyzed Mexican CLAs strains, the loci SSR005 and SSR077 detected 4 alleles, while the

loci SSR001 and SSR002 one allele. For subsequent studies on the genetic variability among Mexican strains of several states and between the same state could analyze the loci SSR005 and SSR077 because they were the most informative because, had the highest number of alleles per locus, while other loci may not be useful to distinguish between strains from other states because they were uninformative among strains of the states analyzed in this study.

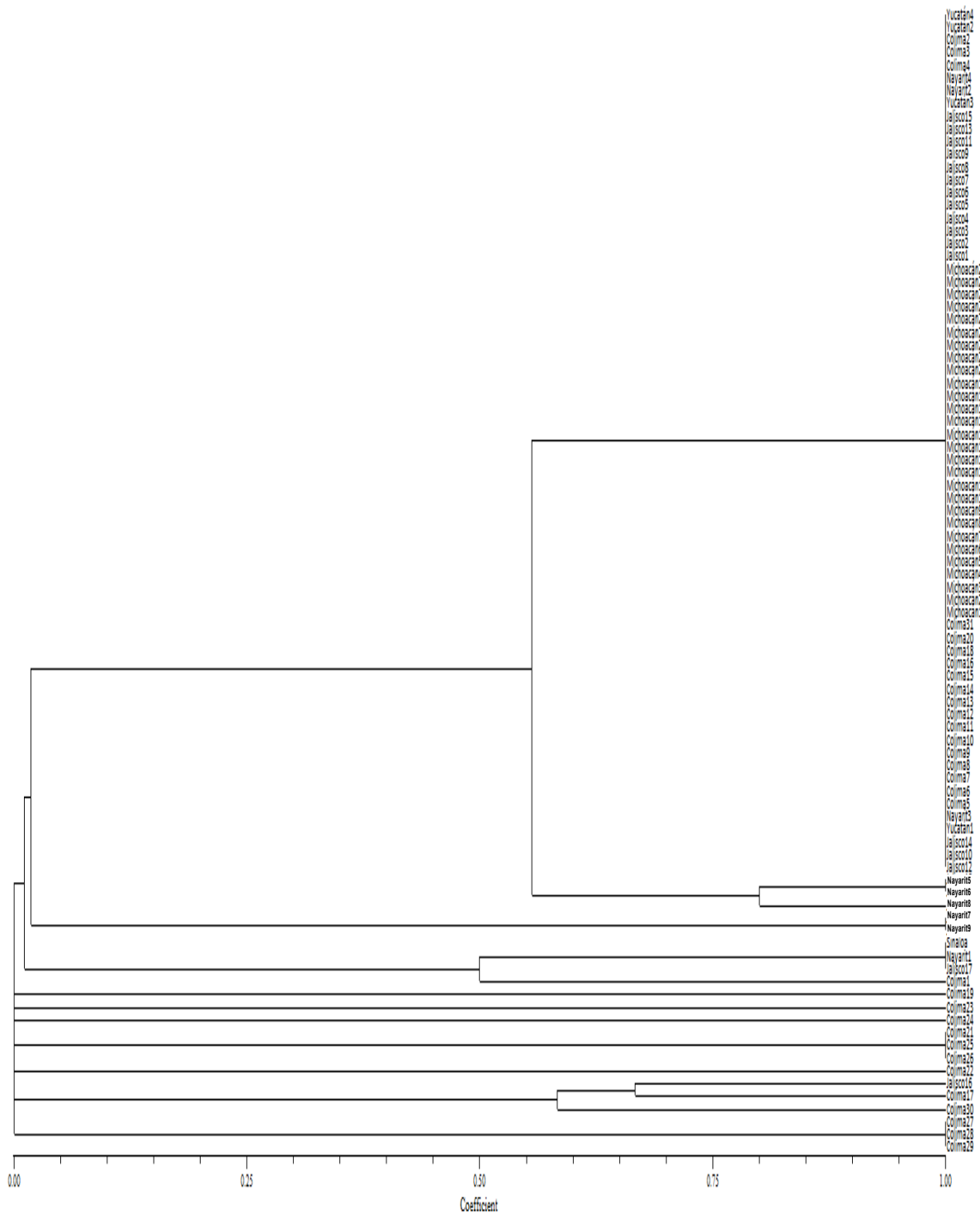
In 2012, Islam *et al.* showed that samples from Mexico, which exhibit the HA and HB haplotypes, were similarly to samples from Florida. These results demonstrate that the origin of the strains of Mexico is Florida. Nevertheless, in our study other haplotypes were identified. In another study a dendrogram analysis performed by Katoh *et al.* (2012), of CLAs strains from India, East Timor, Papua New Guinea and Florida, showed that the cluster were mostly consistent with the geographic origin of the isolate. Furthermore, the differences in the nucleotide sequence were not associated with the citrus species. This was also shown by an analysis of the 16S rDNA, 16S/23S intergenic spacer, *omp*, *trmU-tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB*, and bacteriophage-type DNA polymerase regions; where Tomimura *et al.* (2009) proved that all Indonesian CLAs isolates clustered in one group. These authors also showed that other clusters were not correlated with geographic distribution neither related to the citrus host.

Recently, Singh *et al.* (2019) analyzed the genetic diversity using tandem repeat numbers (TRN) in variable CLIBASIA\_01645 loci in 55 different citrus plant from India. The TRN showed single amplicons (~650 bp) in most of the 55 samples, except for a few amplicons up to 700 bp. Their results are similar to those obtained in the

present work. Therefore, this technique is useful to estimate the genetic diversity of CLAs.

In the present work, we show the use of VNTRs markers can provide enough information about genetic diversity among closely related strains and that might be correlated to a specific host species. This was observed since cluster I was formed by CLAs strains collected of Mexican lime, sweet orange, lime, Persia lime, and volkameriana lemon; while the cluster II was constituted by Mexican lime, grapefruit, alemow, and mandarin orange (Figure 1). Only, strains from Mexican lime were assigned on both clusters. In general, the genetic diversity was higher among CLAs strains across the different regions sampled. However, the large number of unique haplotypes identified, and the high level of genetic diversity observed in this study suggest that this pathogen has much higher diversity in the state of Colima, this is probably due to the presence of different hosts, large areas of crop in a large valley, and frequent use of chemicals.

The characterization of populations affected by HLB citrus can help identify patterns and predict the possible introduction of distribution relationships associated with different citrus producers. The VNTRs loci can be useful for monitoring the genotypes of interest, in addition, these markers can help identify the origins of invasive strains also that genetic differences are not just found in samples from different geographic areas, but also in a single area and a single tree (Islam *et al.*, 2012). In addition to improving our understanding of the spatial and dynamics of the HLB disease, these insights are helpful in designing effective integrated pest and disease management for the HLB problem.



**Figure 1.** UPGMA dendrogram showing the genetic relationships of 90 '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strains from different locations from Mexico [Colima (2-16, 18, 20, 31), Jalisco (1-15), Michoacan (1-28), Nayarit (2-4) and Yucatan (1-4)].

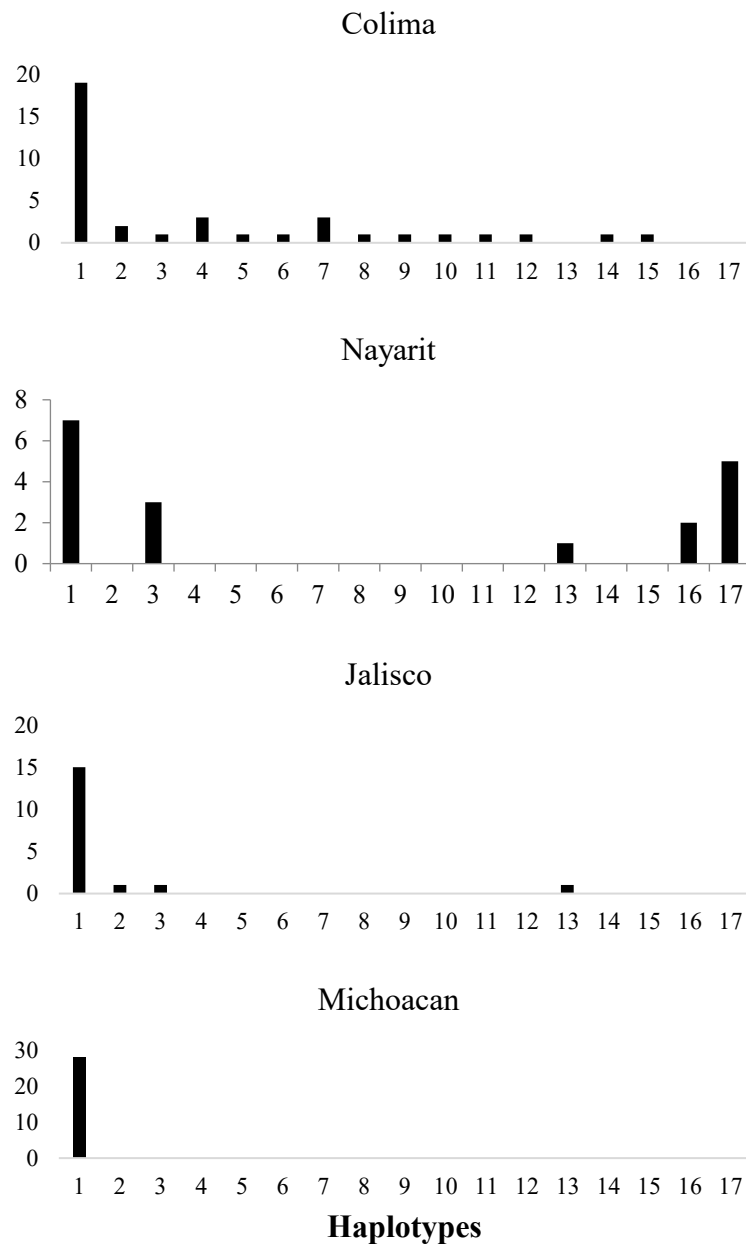
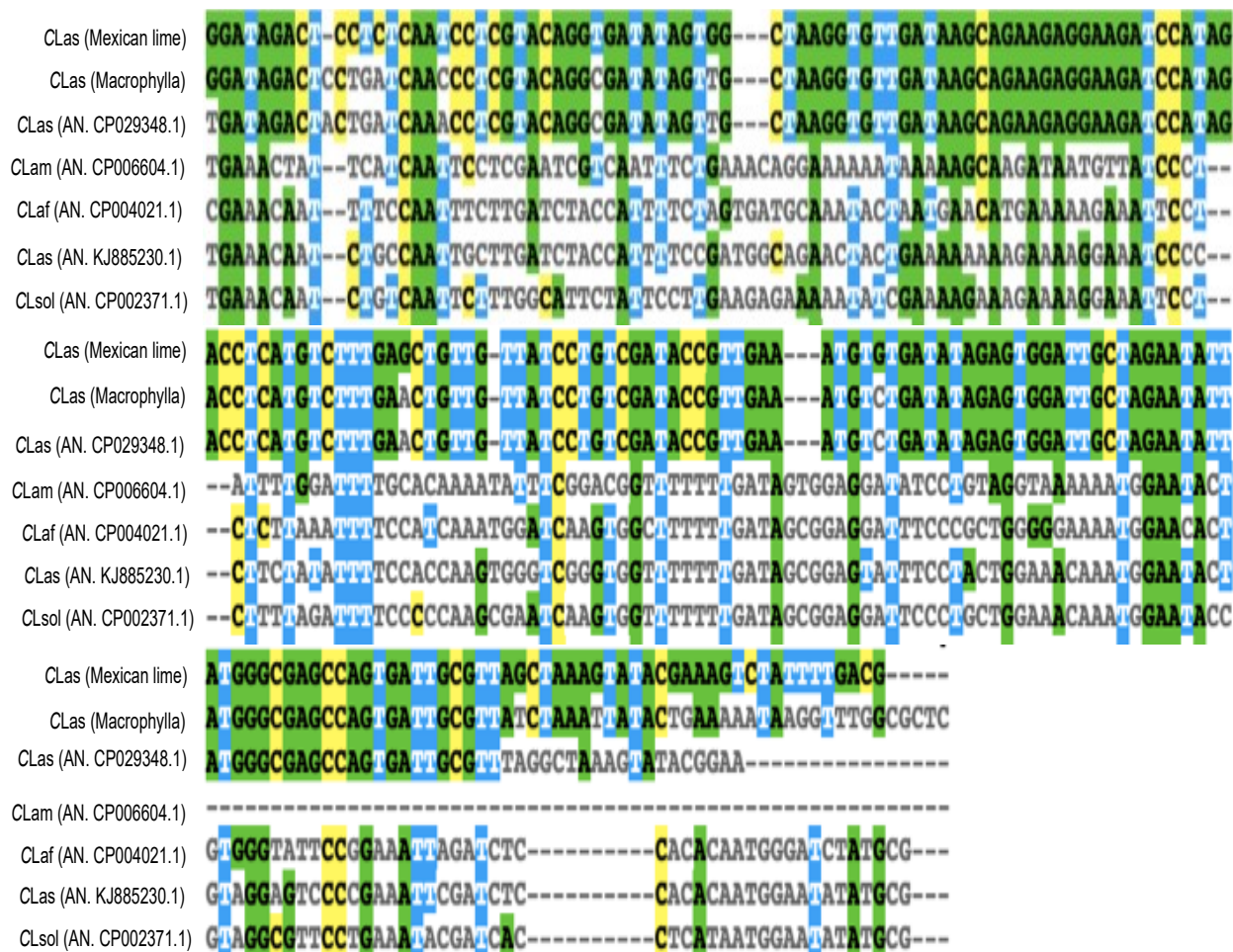


Figure 2. Frequency of each haplotype microsatellite among 90 strains of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from the states of Nayarit, Jalisco, Colima and Michoacan. A total of 17 haplotypes were identified.



**Figure 3.** Dendrogram based on the sequence comparison of some *Candidatus* species. DNA sequence alignment shows that there is a 99% homology between the DNA sequences from the strains described in the present work and that from CLas obtained in the genebank from a strain in the USA (Fig. 4). Therefore, the sequencing confirms the presence of CLas in this study.



**Figure 4.** Nucleotide polymorphisms founded in SSR005 locus and compared with others *Candidatus* species. The two sequences analyzed are highly similar with CLas (AN. CP029348.1) from United States and low similar with other species (CLam, CLaf and CLsol).

## CITED LITERATURE

- Adkar CR, Quaglino F, Casati P, Ramanayaka JG and Bianco PA. 2009. Genetic diversity among “*Ca. L. asiaticus*” isolates based on single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA and ribosomal protein genes. *Annals of Microbiology* 59:681-688. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03179208>
- Aubert B. 1987. *Trioza erytrae* Del Guercio and *D. citri* Kuwayama (Homoptera: Psylloidea), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42: 149-162. <https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/00000373.pdf>
- Bastianel C, Garnier-Semancik M, Renaudin J, Bové JM and Eveillard S. 2005. Diversity of “*Ca. L. asiaticus*,” based on the *omp* gene sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6473-6478. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.11.6473-6478.2005>
- Bové J. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 80: 7-37. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>
- Chen J, Deng X, Sun X, Jones D, Irey M and Civerolo E. 2010. Guangdong and Florida populations of “*Ca. L. asiaticus*” distinguished by a genomic locus with short tandem repeats. *Phytopathology* 100: 567-572. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-100-6-0567>
- Dai Z, Wu F, Zheng Z, Yokomi R, Kumagai L, Cai W, Rascoe J, Polek M, Chen J and Deng X. 2019. Prophage Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” Strains in California. *Phytopathology* 109: 551-559. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-06-18-0185-R>
- Deng X, Chen J and Li H. 2008. Sequestering from host and characterization of sequence of a ribosomal RNA operon (*rrn*) from ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Molecular and Cellular Probes* 22: 338-340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2008.09.002>
- Dice LR. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302. <https://doi.org/10.2307/1932409>
- Ding F, Deng X, Hong N, Zhong Y, Wang G and Yi G. 2009. Phylogenetic analysis of the citrus Huanglongbing (HLB) bacterium based on the sequences of 16S rDNA and 16S/23S rDNA intergenic regions among isolates in China. *European Journal Plant Pathology* 124: 495- 503. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9436-0>
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y and Gottwald T. 2009. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium “*Ca. L. asiaticus*” obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1011-1020. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>
- Furuya N, Matsukura K, Tomimura K, Okuda M, Miyata S and Iwanami T. 2010. Sequence homogeneity of the  $\psi$ *serA-trmU-tufBsecE-nusG-rplK*AJL-*rpoB* gene cluster and the flanking regions of “*Ca. L. asiaticus*” isolates around Okinawa Main Island in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 76: 122-131. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-010-0223-8>
- Garnier MS, Jagoueix E, Cronje RP, Le Roux FG and Bové J. 2000. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa: Proposal of “*Ca. Liberibacter africanus* subsp. *capensis*”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2119-2125. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-6-2119>
- Ghosh DK, Bhose S, Motghare M, Warghane A, Mukherjee K, Ghosh DK Sr, Sharma AK, Ladaniya MS and Gowda S. 2018. Genetic diversity of the Indian populations of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” based on the tandem repeat variability in a genomic locus. *Phytopathology* 105: 1043-1409. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-09-14-0253-R>
- Hartung JS, Paul C, Achor D and Brlansky RH. 2010. Colonization of dodder, *Cuscuta indecora*, by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and ‘*Ca. L. americanus*’. *Phytopathology* 100: 756-762. <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO-100-8-0756>
- Hu WZ, Wang XF, Zhou Y, Li ZA, Tang KZ and Zhou CY. 2011. Diversity of the *omp* gene in *Candidatus Liberibacter asiaticus* in China. *Journal of Plant Pathology* 93: 211-214. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v93i1.294>
- Islam MS, Glynn JM, Bai Y, Duan YP, Coletta-Filho HD, Kuruba G, Civerolo EL and Lin H. 2012. Multilocus microsatellite analysis of “*Ca. L. asiaticus*” associated with citrus Huanglongbing worldwide. *BioMed Central Microbiology* 12: 39. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-39>
- Jagoueix S, Bové JM and Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the  $\alpha$  subdivision of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 379-386. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-379>
- Jagoueix S, Bové JM and Garnier M. 1997. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic regions of “*Ca. L. asiaticus*” and “*Ca. L. africanus*,” the two species associated with citrus Huanglongbing (greening) disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 224-227.
- Katoh H, Davis R, Smith MW, Weinert M and Iwanami T. 2012. Differentiation of Indian, East Timorese, Papuan and Floridian “*Ca. L. asiaticus*” Isolates on the basis of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism profiles at 25 loci. *Annals of Applied Biology* 160:291-297. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00541.x>
- Katoh H, Subandiyah S, Tomimura K, Okuda M, Su HJ and Iwanami T., 2011. Differentiation of “*Ca. L. asiaticus*” isolates by variable number tandem-repeat analysis. *Applied Environment Microbiology* 77: 1910-1917. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01571-10>
- Madden T. 2013. The BLAST Sequence Analysis Tool. 2013 Mar 15. *In: The NCBI Handbook* [Internet]. 2nd edition.

- Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available from: [https://www.unmc.edu/bsbc/docs/NCBI\\_blast.pdf](https://www.unmc.edu/bsbc/docs/NCBI_blast.pdf)
- Matos LA, Hilf ME, Chen J and Folimonova SY. 2013. Validation of variable number of tandem repeat-based approach for examination of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ diversity and its applications for the analysis of the pathogen populations in the areas of recent introduction. *Plos One* 8: 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078994>
- Meneguim L, Marques VV, Murata MM, Barreto TP, Vasquez-Souza GV, Villas-Boas LA, Paccola-Meirelles LD and Leite RP. 2011. Genetic diversity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* isolates from Paraná State, Brazil. In: International Research Citrus and HLB Proceeding, 2011: 24-29. [https://www.researchgate.net/publication/317551919\\_Genetic\\_Diversity\\_of\\_Candidatus\\_Liberibacter\\_asiaticus\\_Isolates\\_from\\_Parana\\_State\\_Brazil](https://www.researchgate.net/publication/317551919_Genetic_Diversity_of_Candidatus_Liberibacter_asiaticus_Isolates_from_Parana_State_Brazil)
- Miyata S, Kato H, Davis R, Smith MW and Weinert M. 2011. Asian-common strains of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ are distributed in Northeast India, Papua New Guinea and Timor-Leste Toru Iwanami. *Journal of General Plant Pathology* 77: 43-47. <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-010-0284-8>
- Nei, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70: 3321-3323. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- Notredame C, Higgins DG and Heringa J. 2000. T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology* 302: 205-217. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Planet P, Jagoueix S, Bové JM and Garnier M. 1995. Detection and characterization of the African citrus greening *Liberibacter* by amplification, cloning and sequencing of the *rp/KAJL-rpoBC* operon. *Current Microbiology* 30: 137-141. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00296198>
- Puttamuk T, Zhou L, Thaveechai N, Zhang S, Armstrong CM and Duan Y. 2014. Genetic diversity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* based on two hypervariable effector genes in Thailand. *PLoS ONE* 9: e112968. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112968>
- Rohlf FJ. 1997. NTSYS-pc Version. 2.02i Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistics Inc., Exeter Software, Setauket, New York. [https://www.researchgate.net/publication/285632506\\_NTSYSpc\\_Version\\_20\\_User\\_Guide](https://www.researchgate.net/publication/285632506_NTSYSpc_Version_20_User_Guide)
- SENASICA. 2010. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Recovered from: <https://www.gob.mx/senasica>
- Singh YH, Sharma SK, Sinha B, Baranwal VK, Singh NB, Chanu NT, Roy SS, Ansari MA, Ningombam A, Devi PS, Das AK, Singh S, Singh KM and Prakash N. 2019. Genetic Variability Based on Tandem Repeat Numbers in a Genomic Locus of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Prevalent in North East India. *The Plant Pathology Journal* 35: 644-653. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2019.0061>
- Subandiyah S, Iwanami T, Tsuyumu S and Ieki H. 2000. Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. *Plant Disease* 84: 15-18. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.1.15>
- Tomimura K, Miyata S and Furuya N. 2009. Evaluation of genetic diversity among “*Ca. L. asiaticus*” isolates collected in Southeast Asia. *National Institute of Fruit Tree Science* 99: 1062-1069. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-9-1062>
- Villechanoux S, Garnier M, Laigret F, Renaudin J and Bové JM. 1993. The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the *nusG-rp/KAJL-rpoBC* gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase. *Current Microbiology* 26: 161-166. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01577372>
- Wang N and Trivedi P. 2013. Citrus Huanglongbing: A new relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology* 103: 652-665. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>
- Wang XF, Chen JY, Tan J, Duan S, Deng XL, Chen JC and Zhou CY. 2015. High genetic variation and recombination events in the vicinity of non-autonomous transposable elements from “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Journal of Integrative Agriculture* 14: 2002-2010. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60979-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60979-5)
- Wang XF, Zhou C, Deng X, Su H and Chen J. 2012. Molecular characterization of a mosaic locus in the genome of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *BMC Microbiology* 12: 18. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-18>
- Zhou LJ, Duan Y, Gabriel D and Gottwald, TR. 2008. Seed transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in periwinkle and dodder resulted in low bacterial titer and very mild disease in periwinkle. *Phytopathology* 98: S181.

# ***Candidatus* Liberibacter solananeorum-tomato as an experimental system for the study of genes associated with Huanglongbing in Mexican lime**

## ***Candidatus* Liberibacter solananeorum-tomate como modelo experimental para el estudio de genes asociados al Huanglongbing en limón mexicano**

María Cristina Hernández-Peraza, Ángela Paulina Arce Leal, Ana Marlenne Bojórquez-Orozco, Edgar Antonio Rodríguez-Negrete, María Elena Santos-Cervantes, Jesús Méndez-Lozano, Norma Elena Leyva-López\*. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa), Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa. CP: 81101, México.

\*Autor para correspondencia: neleyval@ipn.mx.

Received: August 24, 2022.

Accepted: November 12, 2022.

Hernández-Peraza MC, Arce APL, Bojórquez-Orozco AM, Rodríguez-Negrete EA, Santos-Cervantes ME, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE. 2022. *Candidatus* Liberibacter solananeorum-tomato as an experimental system for the study of genes associated with Huanglongbing in Mexican lime. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 43-56.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-5>

**Resumen.** El creciente impacto de bacterias restringidas al floema en cultivos de importancia económica ha llevado a un renovado interés en comprender la patogénesis a nivel genómico e histológico de estas enfermedades. El género *Candidatus* Liberibacter está asociado con enfermedades económicamente devastadoras, destacando *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas) y *Candidatus* Liberibacter solanacearum (CLso) en cítricos y

hortalizas. Los estudios de la interacción planta-patógeno se encuentran limitados debido a la naturaleza no cultivable de las especies patogénicas del género *Ca. Liberibacter*, así como por la carencia de modelos experimentales. El objetivo del presente trabajo fue implementar un modelo para el estudio de bacterias del género *Candidatus* Liberibacter, usando tomate-CLso como modelo experimental. Mediante un análisis curso temporal del proceso infectivo tomate-CLso, se determinó que existe una correlación directa entre la carga bacteriana y el desarrollo de síntomas, diferenciados en etapas temprana, intermedia y tardía. Adicionalmente, un análisis comparativo a nivel transcripcional de genes marcadores de defensa antibacteriana (PR-P1, miR160, y miR393) determinó que la respuesta de dichos genes en los patosistemas tomate-CLso y limón-CLas, son equivalentes. Los resultados demuestran que el sistema tomate-CLso



puede ser utilizado como modelo para el estudio de la interacción planta y bacterias no cultivables *in vitro* restringidas al floema.

**Palabras clave:** *Candidatus Liberibacter asiaticus*, HLB, Zebra Chip, miRNAs.

Actualmente las bacterias fitopatógenos limitados al floema se han dispersado de manera alarmante, aumentado su incidencia gracias a los climas cálidos y a la creciente interconexión entre los sistemas agrícolas. Los métodos tradicionales de control de dichos organismos se restringen a la eliminación de plantas enfermas, a tratamientos paliativos de las enfermedades (como el uso de antibióticos, termoterapia y manejo agronómico) y al uso indiscriminado de pesticidas para atacar a los insectos vectores que transmiten a dichos organismos (Bendix y Lewis, 2018). Dentro de esta categoría de fitopatógenos destacan las bacterias del género *Candidatus Liberibacter*; bacterias Gram-negativas que viven como parásitos obligados limitados al floema de sus hospederos, son transmitidas por psílidos y se asocian con enfermedades de cultivos de interés agronómico en el mundo (Haapalainen, 2014). Evolutivamente, las especies patógenas de ‘*Ca. Liberibacter*’ han sufrido amplias reducciones de su genoma (1.2 Mb), por lo que son altamente dependientes de sus hospederos (Naranjo *et al.*, 2019) y a la fecha no se ha logrado su cultivo *in vitro*. En este género destacan *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLso) asociado a la enfermedad de “Zebra Chip” en papa (Munyanza, 2012) y otras enfermedades en hortalizas (Liefiting *et al.*, 2009); y *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) asociado al huanglongbing (HLB) de los cítricos (Bové, 2006).

En la actualidad, el HLB es una de las enfermedades que generan mayor preocupación en el

sector cítrico, ya que es considerada como la más devastadora y destructiva hasta el momento (Wang, 2019). La citricultura hasta hace poco tiempo era una actividad altamente rentable; sin embargo, con la llegada del HLB la producción se ha visto reducida, tan solo en el estado de São Paulo en Brasil, se reportó que aproximadamente 55.5 millones de árboles de naranja dulce con síntomas de la enfermedad se eliminaron entre enero de 2005 y junio de 2019 (Bassanezi *et al.*, 2020). En Sudáfrica se reportan pérdidas en la cosecha que alcanzan hasta el 100% (Alemán *et al.*, 2007). En Florida, desde que se detectó HLB, la superficie y el rendimiento de naranja han disminuido en un 44%, generando un aumento del 300% en su precio (Dala-Paula *et al.*, 2018). La pérdida económica en Florida ocasionada por el HLB durante el período 2006 hasta 2014 fue de \$7.80 mil millones de dólares en la producción con una pérdida promedio anual de \$975 millones de dólares (Hodges *et al.*, 2014; Singerman *et al.*, 2017). En México el impacto del HLB se reflejó en la producción de cítricos. En el estado de Colima antes de la llegada del HLB el promedio en rendimiento de limón superaba las 20.97 ton/ha. Esta cifra fue disminuyendo a partir del 2011, obteniendo solo 9.43 t ha<sup>-1</sup> en el año 2014. Actualmente se ha observado una recuperación (14.26 t ha<sup>-1</sup>) (SIAP-SAGARPA, 2022), empero, esa cifra sigue representando una reducción del 32%.

A pesar de los esfuerzos por mitigar la enfermedad, hasta la fecha no hay variedades con resistencia real, ni tratamientos efectivos para eliminar el HLB en ninguna especie de cítricos (Gao *et al.*, 2018). Por ello, se han buscado estrategias para elucidar el mecanismo regulatorio de la enfermedad, siendo las aproximaciones “ómicas” (genómica, transcriptómica, metabolómica) las más utilizadas en los últimos años (Ventura-Medina *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2022). Con la ayuda de tecnologías como RNA-Seq, actualmente es posible

caracterizar el transcriptoma de plantas de manera rápida y con una mayor sensibilidad, lo que ha supuesto un cambio enorme a la hora de abordar el estudio de plantas no modelo ante el estrés biótico y abiótico. En cítricos con HLB, se han identificado diversos genes involucrados en la biosíntesis de carbohidratos y fitohormonas que han sido inducidos en los mecanismos de defensa de la planta (Huot *et al.*, 2018). No obstante, el estudio funcional de estos genes aún se encuentra limitado a sistemas modelo como *Arabidopsis-Pseudomonas*, por lo cual se sabe poco sobre el mecanismo regulador en la interacción planta-patógeno en plantas con genoma no disponible y más aún en patógenos no cultivables. El entendimiento del proceso de patogénesis en la interacción planta-bacteria se ha enfocado en sistemas de bacterias cultivables como *Pseudomonas* y *Agrobacterium*, usando modelos experimentales alternativos como *Arabidopsis thaliana* (el cual no es el hospedero natural de dichos patógenos) (Yin *et al.*, 2019). Estos sistemas experimentales han permitido avances en el desarrollo de alternativas para el manejo de fitopatógenos más complejos y de importancia económica.

La caracterización funcional de genes, tratamientos terapéuticos o preventivos en cítricos ha sido complicada debido a la vida prolongada de los árboles de cítricos y los patrones fluctuantes del desarrollo de HLB dentro de un árbol (Fletcher *et al.*, 2018). Además, la manipulación genética de los cítricos requiere mucho tiempo y esfuerzo, lo que hace que la detección genética funcional a gran escala sea casi imposible (Huang *et al.*, 2021).

El creciente avance de los estudios transcriptómicos relacionado a la expresión de genes involucrados en la defensa contra patógenos del género *Candidatus Liberibacter* va en aumento, por lo que se requieren de modelos de estudio para conocer y validar el papel biológico de estos mecanismos de regulación. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue la implementación de un modelo

experimental que permita realizar estudios sobre la interacción planta-bacteria del género *Candidatus Liberibacter*, utilizando a CLso como patógeno, y tomate su hospedero natural, como planta modelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención del inóculo.** La fuente de inóculo de la bacteria CLso se obtuvo de tubérculos de papa de la variedad Citlali (INIFAP-5-10) con síntomas característicos de la enfermedad “Zebra Chip”. Los tubérculos fueron cosechados en agosto del 2017 en el INIFAP Campo Experimental Valle de México, en el Estado de México, y proporcionados por Oswaldo Angel Rubio Covarrubias. Posterior a la ruptura de latencia con ácido giberélico a 15 ppm durante 30 min, los tubérculos brotados se trasplantaron a macetas con sustrato SOGEMIX® PG-M y Vermiculita (1:1).

**Detección y secuenciación de CLso.** Para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* se realizó extracción de DNA genómico utilizando el método CTAB descrito anteriormente (Zhao *et al.*, 1998; Arratia-Castro *et al.*, 2014). La concentración y la calidad del DNA se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Se emplearon los iniciadores OA2 y OI2c diseñados en la región 16S rRNA que amplifican un fragmento de 1160 pb (Liefting *et al.*, 2008; 2009). Los amplicones de PCR se purificaron empleando el kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Los fragmentos se clonaron utilizando el vector pGEMT-Easy (Promega, Madison, WI, EU) y se transformaron en células quimio-competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Posteriormente, se secuenciaron en Laboratorio de CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.

**Transmisión y dinámica del proceso infeccioso de CLso en plantas de tomate.** Las plantas de papa detectadas como positivas para CLso por PCR se emplearon como fuente de inóculo para la propagación del patógeno por medio de injertos a plantas de tomate. Se estableció un diseño experimental anidado donde se utilizaron 47 plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*, híbrido Maya), incluyendo 37 réplicas injertadas y 10 controles negativos. Las plantas se cultivaron bajo condiciones de invernadero a una temperatura que oscilaba de los 25 a los 30 °C. Se colectó tejido vegetal y se fotodocumentaron los síntomas de todas las plantas a los 14, 28, 42, 56 y 70 días posteriores a la inoculación (dpi). El tejido vegetal colectado se criopreservó con nitrógeno líquido para la posterior extracción de ácidos nucleicos. Para determinar el porcentaje de incidencia y seleccionar las plantas portadoras de la bacteria se realizó un análisis de PCR a los 42 dpi (etapa sintomática) usando los iniciadores OA2 y OI2C. Solo las plantas CLso-PCR positivas se incluyeron en la dinámica del proceso infeccioso de CLso en plantas de tomate. Para la cuantificación de la bacteria por qPCR se usaron los oligonucleó-

tidos CLsoF y CLsoR diseñados en este estudio (Cuadro 1). Se realizó una gráfica de dispersión y un análisis ANOVA con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$  en Excel.

**Cuantificación absoluta de CLso por PCR tiempo real (qPCR).** Se realizaron curvas estándar con DNA plasmídico conteniendo el amplicon bacteriano OA2-OI2c de 1160 pb de la región 16SrRNA de CLso con diluciones seriales de  $10^2$  hasta  $10^7$  moléculas. La curva estándar se obtuvo mediante la regresión lineal de la gráfica generada de la representación de los valores de la concentración del estándar en  $\text{Log}_{10}$  versus el correspondiente ciclo de detección (Cq). La eficiencia del qPCR se calculó mediante la fórmula  $E = 10^{-1/m}$ , donde E es la eficiencia y m es la pendiente de la curva estándar, el porcentaje de eficiencia es obtenido mediante la fórmula  $\%E = (E-1)*100$ . Los valores de concentración se obtuvieron mediante la extrapolación de los valores de amplificación (Cq) con la correspondiente curva estándar.

Se utilizó el kit SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Foster City, CA, EE. UU.) en un termo-

**Cuadro 1. Listado de “primers” u oligonucleótidos de PCR utilizados en este estudio.**

Nombre	Secuencia	Amplicón	Referencia
OA2	GCGCTATTTTTTAATAGGAGCGGCA	1160 pb	Li <i>et al.</i> , 2007
OI2c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT		
CLso-F	GTAAAGGCCTACCAAGGCTACG	165 pb	Este estudio
CLso-R	CCTAAGGCCTTCTTCACTCACG		
tomPR1-F	CCGTGCAATTGTGGGTGTC	100 pb	Casteel <i>et al.</i> , 2012
tomPR1-R	GAGTTGCGCCAGACTACTTGAGT		
EF-1F	GATTGGTGGTATTGGAAGTGC	150 pb	Rotenberg <i>et al.</i> , 2006
EF-1R	AGCTTCGTGGTGCATCTC		
miR160	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTTCGCACTGGATACGACTGGCAT	55 pb	Este estudio
miR160-R	GCGGCGGTGCCTGGCTCCCTGT		
miR393	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTTCGCACTGGATACGACGGATCA	56 pb	Este estudio
miRNA393-R	GCGGCGGTCCAAAGGGATCGCAT		
Universal stem-loop RT	GTGCAGGGTCCGAGGT	NA	Varkonyi-Gasic <i>et al.</i> , 2007

ciclador de PCR en tiempo real CFX96TM (Bio-Rad). La reacción de qPCR consistió en 1 µl de H<sub>2</sub>O, 100 µM de cada oligonucleótido, 5 µl de EvaGreen supermix, y 2 µl de DNA molde (20 ng/µl). El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial 95°C por 30s, seguido de 40 ciclos (95°C/5s y 58°C/10s). El programa de la curva de disociación fue de 60 a 95°C con un rango de aumento de temperatura de 0.5°C por segundo y una cuantificación continua de fluorescencia. El análisis se realizó con dos réplicas técnicas y cinco réplicas biológicas. Los valores de la cuantificación del título del patógeno se representaron como número de células bacterianas por cada 100 nanogramos de DNA vegetal.

**Cuantificación del gen PR-P1 en plantas de tomate infectadas con CLso.** Para evaluar los niveles de regulación genética en plantas de tomate infectadas con CLso se seleccionó un gen marcador de defensa, *Phatogenesis-related protein-P1* (PR-P1) relacionado con la producción de ácido salicílico. Se analizaron cinco plantas sanas y cinco plantas enfermas en etapa temprana (14 dpi) y etapa tardía (56 dpi) de la infección. Para el análisis de RT-qPCR se partió de 1000 ng RNA total extraído con el protocolo estándar del reactivo Trizol® (Thermo-Scientific), el cual se trató con DNAsa I (New England Biolabs, Beverly, MA) a 37 °C durante 30 minutos, inactivando la reacción a 85 °C por 10 minutos. Las muestras de RNA se transcribieron inversamente en cDNA utilizando M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen).

Los reactivos y condiciones de amplificación fueron las mismas a las previamente descritas empleando 2 µl de cDNA por reacción. Se usaron los iniciadores tomPR1-F/tomPR1-R para cuantificar el gen PR1 (Casteel *et al.*, 2012) y el gen EF-1α (*Elongation factor 1 alpha*) (Rotenberg *et al.*, 2006) para normalizar los niveles de transcrip-

ción (Cuadro 1). La expresión relativa se determinó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Todas las reacciones se analizaron utilizando dos réplicas técnicas. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de un solo factor con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$ .

**Cuantificación de miRNAs en los patosistemas tomate-CLso- y limón-CLas.** Se seleccionaron miRNAs involucrados en mecanismos de defensa antibacteriana de plantas y asociados a la respuesta de limón a la infección por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Bojórquez-Orozco, 2021). Los miR160 y miR393 están involucrados en la señalización de auxinas, un proceso descrito como mecanismo de defensa en etapas iniciales de infección frente a diversos patógenos, especialmente contra bacterias en diferentes especies vegetales (Chen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018).

Para el diseño de iniciadores, se realizó un análisis comparativo de las secuencias de miRNAs reportados de *Solanum lycopersicum*, *Citrus sinensis* y *Arabidopsis thaliana*, descargados de la base de datos <http://www.mirbase.org/>. En limón mexicano, se obtuvieron las secuencias de miR160 y miR393 en un trabajo previo (Bojórquez-Orozco, 2021). Posteriormente se llevó a cabo el diseño de los iniciadores específicos para la cuantificación de los miRNAs (Cuadro 1) de acuerdo a la metodología propuesta por Varkonyi-Gasic *et al.* (2007) utilizando el software Primer Select (DNASTAR Lasergene, Madison, WI, EE. UU.).

Para la cuantificación de los miRNAs del patosistema CLso-tomate se utilizó el tejido colectado y criopreservado de cinco plantas sanas y cinco plantas infectadas con CLso de tres tiempos de muestreo (14 dpi, 28 dpi y 56 dpi), consideradas etapas tempranas y tardía en la cinética de infección. Mientras que en el patosistema CLas-limón, se empleó tejido criopreservado de un estudio previo (Arce-Leal *et*

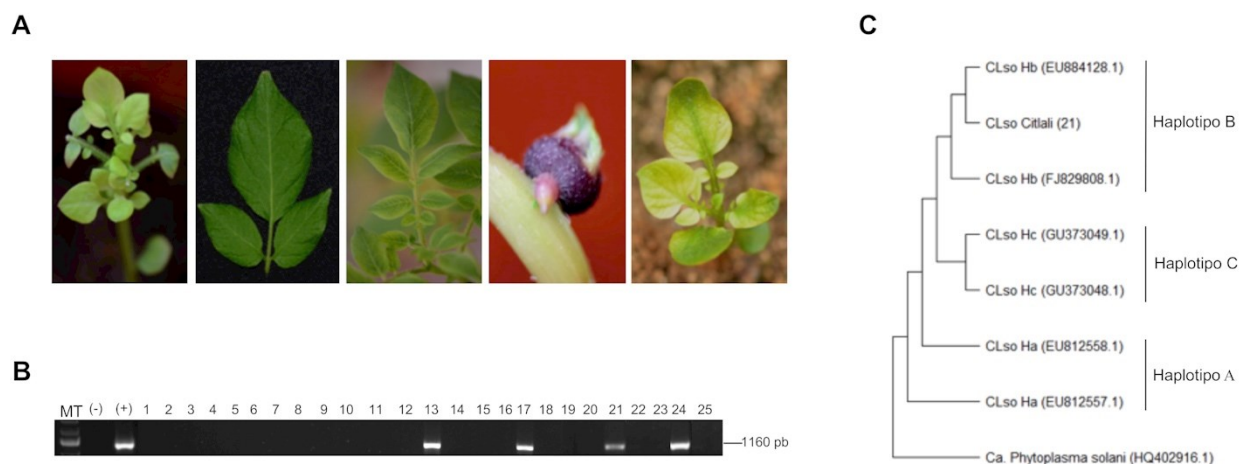
*al.*, 2020). A partir de tejido de cítricos previamente inoculado con CLas se realizó la cuantificación de la expresión de los miRNAs a las 56 y 112 dpi, con cinco réplicas biológicas cada uno y usando como control tejido de las correspondientes plantas sanas colectado en los mismos puntos de muestreo.

El RNA total se extrajo de manera individual de cada una de las plantas con el reactivo Trizol (Thermo-Fisher) y posteriormente se trataron con DNasa I (New England Biolabs, Beverly, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa de miRNA stem-loop se realizó de acuerdo con lo descrito por Varkonyi-Gasic *et al.* (2007), utilizando 500 ng de muestra de RNA total y la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen). El análisis cuantitativo qPCR se realizó utilizando SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Foster City, CA, EE. UU.) de acuerdo al protocolo anteriormente descrito. Los niveles de expresión de los miRNAs se obtuvieron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

(Livak and Schmittgen, 2001). El valor de cambio de expresión “Fold Change”, se obtuvo a partir de la relación de expresión entre la muestra inoculada con la bacteria frente a la muestra control (planta sana). Todas las reacciones de qPCR se analizaron usando dos réplicas técnicas. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de un solo factor con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$ .

## RESULTADOS

**Fuente de inóculo.** Un total de 25 tubérculos de papa (var. Citlatli) se brotaron y el desarrollo de las plantas se documentó. Algunas plantas desarrollaron los síntomas típicos de la enfermedad del “Zebra Chip”, que incluyen proliferación de brotes axilares, amarillamiento, clorosis, tubérculos aéreos, acortamiento de entrenudos y hojas de coloración morada-roja “punta morada” (Figura 1A). El DNA



**Figura 1. Caracterización de la fuente de inóculo de CLso proveniente de tubérculos de papa de la variedad Citlatli.** Panel A, sintomatología observada en plantas PCR-positivas a CLso. Panel B, detección de CLso por PCR con los oligonucleótidos OA2/OI2C (1160pb) en plantas de papa. MT marcador de peso molecular; (-), control negativo de PCR; (+), control positivo de PCR en forma de DNA plasmídico; 1-25, plantas provenientes de tubérculos sintomáticos a “Zebra Chip”. El tamaño del amplicón esperado es indicado. Panel C, Relación filogenética del aislado de CLso Citlatli-21 con aislados previamente reportados, basado en secuencias parciales del DNA ribosomal 16S. La reconstrucción filogenética se realizó mediante el método Neighbor-Joining (Bootstrap valores de arranque 1000) usando el modelo Tamura-Nei en el software MEGA X.

total proveniente de las 25 se utilizó como molde para la detección molecular de CLso por PCR, resultando positivas las muestras 13, 17, 21, y 24 (Figura 1B). La identidad de CLso aislado Citlali-21 se confirmó por secuenciación, encontrándose un porcentaje de similitud del 99% con el aislado de CLso YARL1 (Número de accesión en el GenBank: KU588194.1). El análisis filogenético del aislado CLso Citlali-21 y diferentes aislados pertenecientes a distintos haplotipos depositados en las bases de datos mostró que pertenece al haplotipo B (Figura 1C).

Para confirmar la viabilidad de la fuente de inóculo, tejido de la planta original infectada se utilizó para transmitir la bacteria por injerto a plantas de papa, observándose nuevamente los síntomas asociados al “Zebra Chip” desde los 24 dpi, observándose a las plantas muy débiles y con rápida senescencia alrededor de los 40 dpi (Figura 2A). A nivel molecular, se detectó CLso por PCR en dos de tres submuestras de tres plantas analizadas a los 24 dpi (Figura 2B), confirmándose así la correlación entre los síntomas observados y la presencia del patógeno.

**Patosistema tomate-CLso.** Posteriormente se realizó un ensayo de transmisión en plantas de tomate, por ser otro hospedero natural de CLso y del que se cuenta con numerosas herramientas genéticas disponibles. En este ensayo, en 27 de las 37 plantas inoculadas por injerto se detectó por PCR a CLso desde los 14 dpi, a pesar de que las plantas aún no presentaban síntomas (datos no mostrados). El registro fotográfico de síntomas se realizó cada 14 días (14, 28, 42, 56 y 70 dpi). Los primeros síntomas se presentaron a los 28 dpi, considerándose una etapa inicial, así como intermedia a los 42 dpi, y etapa severa a los 56 dpi (Figura 3).

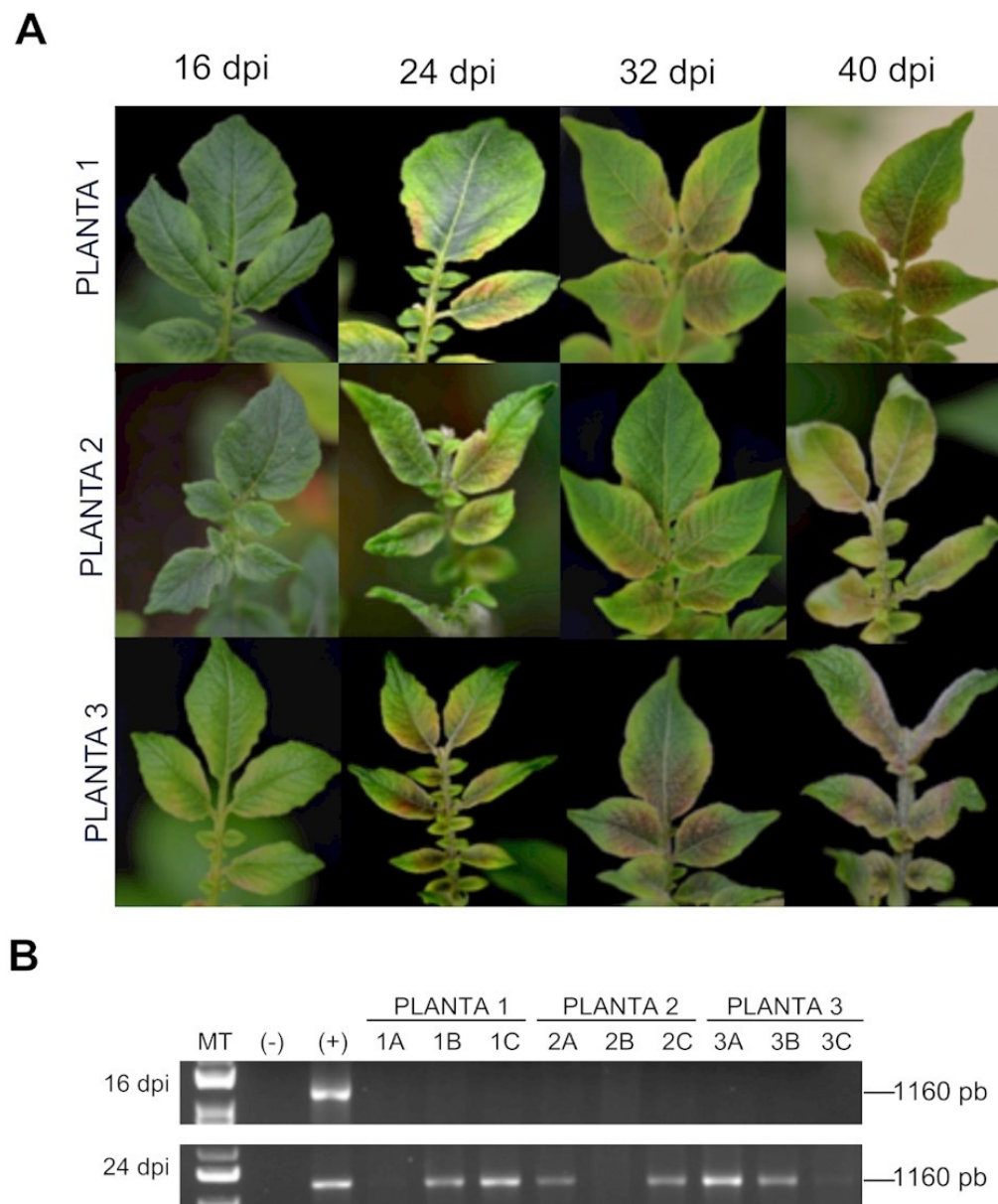
**Dinámica del proceso infeccioso de CLso en tomate.** Para determinar la dinámica del proceso in-

feccioso en el patosistema tomate-CLso se cuantificó la bacteria por qPCR a los 14, 28, 42, 56 y 70 dpi de todas las plantas identificadas como positivas por PCR punto final (27/37). El título bacteriano se determinó de manera absoluta mediante una curva estándar construida con concentraciones seriales ( $1,00E+02$  a  $1,003+E08$  moléculas) del amplicón de 1160 pb de gen 16S rRNA de CLso. Este ensayo consistió en 27 réplicas biológicas (plantas CLso PCR positivas) y 10 controles negativos, con dos réplicas técnicas en todos los casos, obteniendo una eficiencia del 94%,  $R^2=0.999$  y la ecuación de la curva de  $y=-3.5082x+37.667$ .

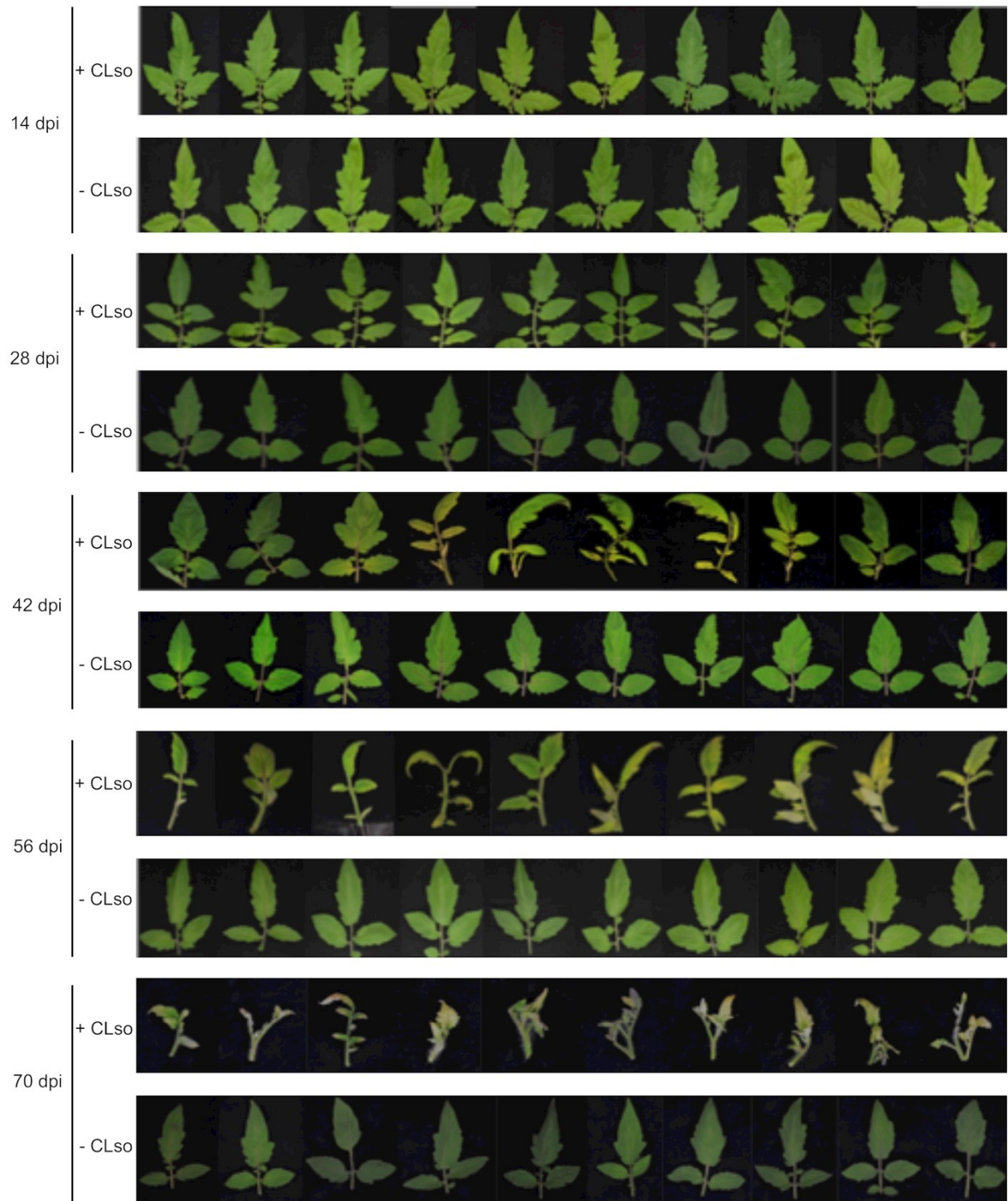
Durante el desarrollo del proceso infeccioso de CLso en tomate se observó un título bacteriano ( $t$ ) (indicando la desviación estándar,  $\sigma$ ) ascendente con respecto al tiempo de muestreo y presencia de síntomas (Figuras 3 y 4A). A los 14 dpi se obtuvo un promedio de  $1.21E+03$  células ( $\sigma \pm 8.88E+02$ ), a los 28 dpi  $9.53E+03$  células ( $\sigma \pm 9.83E+03$ ), a los 46 dpi  $1.36E+04$  ( $\sigma \pm 9.36E+03$ ), a los 56 dpi  $1.74E+05$  ( $\sigma \pm 1.24E+05$ ) y finalmente a los 70 dpi  $2.08E+05$  ( $\sigma \pm 1.43E+05$ ). El análisis ANOVA arrojó un valor de  $P = 0.001$ , siendo menor al valor de  $\alpha=0.05$ , lo que sugiere que las diferencias entre algunas de las medias son estadísticamente diferentes separándolos en dos grupos mediante una prueba de Tukey con el 95% de confianza, grupo A (14 dpi, 28 dpi y 42 dpi) y grupo B (56 dpi, 70 dpi) (Figura 4A).

#### **Expresión del gen marcador de defensa PR-P1.**

Para validar a nivel molecular la respuesta del tomate a la infección por CLso, en este estudio se determinó la expresión del gen marcador de defensa, *Phatogenesis-related protein P1* (PR-P1) relacionado con la producción de ácido salicílico en la etapa temprana (14 dpi) y etapa tardía (56 dpi) de la infección de CLso en tomate por PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos muestran que el gen PR-P1 presentó una inducción exponencial significati-

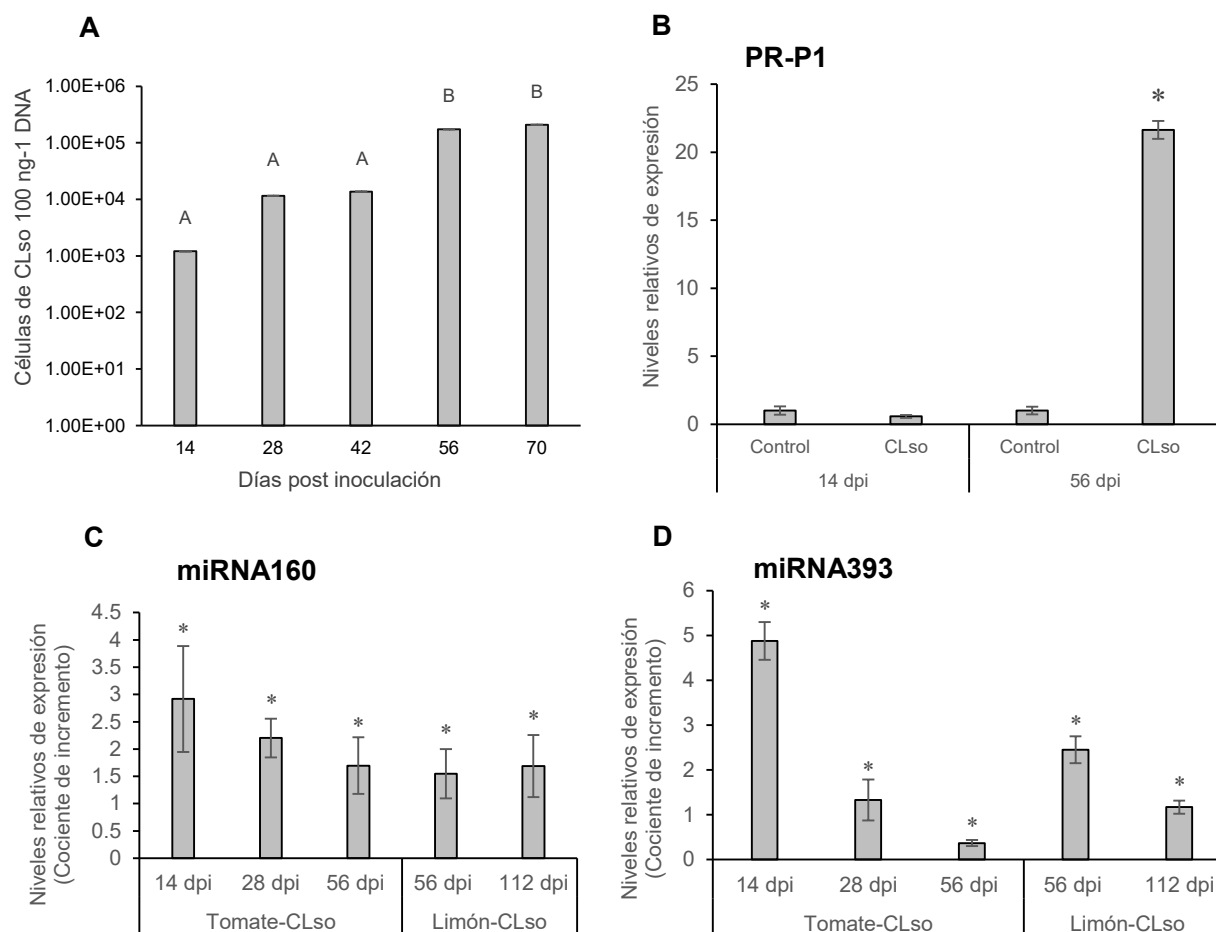


**Figura 2. Transmisión de CLso a plantas de papa.** Para confirmar la viabilidad de la fuente de inóculo, CLso fue inoculado por injerto a plantas de papa variedad 302285.27 libre de patógenos (proveniente de cultivo *in vitro*). Panel A, sintomatología observada en las plantas de papa (tres plantas independientes en diferentes puntos del proceso infeccioso (16, 24, 32 y 40 dpi). Panel B, detección por PCR con los oligonucleótidos OA2/OI2C (1160pb) en plantas de papa inoculadas a los 16 y 24 dpi. MT marcador de peso molecular; (-), control negativo de PCR (coctel sin molde); (+), control positivo de PCR en forma de DNA plasmídico; 1A, 1B, 1C, submuestras de Planta 1; 2A, 2B, 2C, submuestras de Planta 2; 3A, 3B, 3C, submuestras de Planta 3. El tamaño del amplicón esperado es indicado.



**Figura 3. Implementación del patosistema tomate-CLso.** En la figura se muestra la sintomatología asociada a CLso en plantas de tomate durante 70 días posteriores a la inoculación y sus respectivos controles sanos en cada tiempo de muestreo (14, 28, 42, 56 y 70 dpi).





**Figura 4. Dinámica del proceso infeccioso de CLso en plantas de tomate y respuesta transcripcional de genes de defensa.** Panel A, cuantificación CLso por PCR en tiempo real a los 14, 28, 42, 56 y 70 dpi. El título bacteriano fue determinado de manera absoluta mediante una curva estándar construida con concentraciones seriales de DNA plasmídico que contiene el fragmento de 1160 pb de gen 16S rRNA de CLso. Las letras sobre las barras indican grupos con diferencias estadísticamente significativas. Panel B, cuantificación del gen *Pathogenesis-related protein P1* (PR-P1) en la etapa temprana (14 dpi) y etapa tardía (56 dpi) del proceso infeccioso. El asterisco \* marca diferencias significativas. Páneles C y D, cuantificación de miR160 y miR393 de modo comparativo en plantas de tomate infectadas con CLso y de limón infectadas con CLas en etapas tempranas y tardías de la infección en cada sistema. Las barras representan los cocientes de incremento de expresión en cada tratamiento contra su respectivo control, los asteriscos representan diferencias significativas con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$ .

va de ~20 veces mayor con relación al control a los 56 dpi (Figura 4B).

**Expresión diferencial de miRNAs en los patosistemas tomate-CLso y limón-CLas.** Se realizó un análisis comparativo de la respuesta transcripcional de los genes marcadores de defensa antibacteriana,

miR160 y miR393 a los 14, 28 y 56 dpi en plantas de tomate inoculadas con CLso y a los 56 y 112 dpi en plantas de limón inoculadas con CLas. Los resultados mostraron una inducción diferencial asociada a la infección en ambos casos. Para el patosistema tomate-CLso se observó que ambos miRNAs presentaron una inducción de la expresión en los tres

tiempos de muestreo analizados, observándose la mayor inducción a los 14 dpi. En el patosistema limón-CLas, los niveles de expresión de miRNA160 y miR393 aumentaron significativamente ( $P < 0.05$ ) tanto a los 56 dpi (etapa asintomática) como a los 112 dpi (etapa sintomática) en comparación con plantas sanas (Figura 4 C y D).

## DISCUSIÓN

La infección es el resultado de complejos eventos celulares entre el hospedador y el patógeno, los cuales en el caso de las interacciones compatibles resultan en fenotipos asociados a dichas enfermedades. En el proceso de la elucidación de los mecanismos moleculares que gobiernan las interacciones planta-patógeno, uno de los principales cuellos de botella es el contar con los modelos experimentales adecuados que permitan abordar de modo integral (bioquímico, genético y genómico) el mayor número posible de preguntas biológicas. En el caso de la interacción planta-bacteria, sistemas experimentales que incluyen bacterias cultivables de los géneros *Pseudomonas* y *Agrobacterium* usando principalmente como hospedador artificial a *Arabidopsis thaliana*, han permitido generar un amplio conocimiento de los mecanismos de defensa y de la patogénesis, siendo estos muchas veces extrapolables a patosistemas naturales de importancia agrícola (Yin *et al.*, 2019). Por otro lado, recientemente las aproximaciones masivas denominadas “ómicas” han acelerado y profundizado el conocimiento de la interacción planta-bacteria en los sistemas antes mencionados; sin embargo, en el caso de sistemas no modelo dichos estudios se ven limitados. En este sentido, las a-proteo bacterias no cultivables restringidas al floema del género *Candidatus Liberibacter* han cobrado una alta importancia en el mundo debido al alto impacto que causan en

distintos cultivos de interés agrícola (Haapalainen, 2014). De modo específico, *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLso) asociado a la enfermedad de “Zebra Chip” en papa (Munyaneza *et al.*, 2012) y otras enfermedades en hortalizas incluyendo el tomate (Liefting *et al.*, 2009); y *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) asociado al huanglongbing (HLB) de los cítricos (Bové, 2006) destacan como los agentes causales que demandan una urgente generación de modelos para su estudio y potencial generación de estrategias de manejo. CLso y CLas están asociadas a enfermedades en plantas de naturaleza diferente, siendo en el caso del HLB causado por CLas en cítricos, de difícil manejo experimental debido al tamaño de los árboles, aunado a extensos tiempos de desarrollo de la enfermedad y de la limitada disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares para su estudio. Caso contrario de CLas en papa y tomate, donde es posible infectar y manejar una gran cantidad de plantas a la vez, aunado que en el caso particular del tomate existen diversas herramientas genómicas (genoma, transcriptoma, epigenoma) y moleculares (vectores de transformación y para genética directa y reversa) disponibles (<https://solgenomics.net/>).

Adicionalmente, de modo interesante, ambas bacterias (CLso y CLas) comparten una alta similitud y concordancia sinténica a nivel de su genoma básico: 867 proteínas conservadas, y 531 proteínas con un porcentaje de similitud  $> 70\%$  (Lin *et al.*, 2011), lo cual sugiere que ambos patosistemas pueden ser comparativos y extrapolables en diversos procesos y rutas genéticas y metabólicas.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente proyecto fue implementar un modelo para el estudio de bacterias del género *Candidatus Liberibacter*, usando tomate-CLso como modelo experimental. Inicialmente, se analizó a nivel fenotípico un total de 25 plantas de papa provenientes de tubérculos independientes presuntamente infectados

con CLso, lográndose identificar los síntomas del “Zebra chip” en algunas de ellas. La asociación fenotípica de la enfermedad con el agente causal se validó a nivel molecular mediante PCR, secuenciación, y análisis filogenético, pudiéndose confirmar la presencia de CLso específicamente perteneciente al haplotipo B. Estos resultados concuerdan con reportes previos que identificaron al haplotipo B de CLso como el predominante en los campos comerciales de papa en Estados Unidos y México (Munyanza, 2012). Posteriormente, para evaluar la viabilidad de la fuente de inóculo, la planta con el aislado denominado CLso Citlali-21 se utilizó para ensayos de transmisión por injerto a plantas de papa, resultando en un 100 % de transmisión, corroborado fenotípica y molecularmente por PCR. Una vez determinada la viabilidad de la fuente de inóculo CLso Citlali-21 se realizó un ensayo curso temporal de infección de plantas de tomate inoculadas con yemas provenientes de papas CLso positivas. El tomate se seleccionó como modelo de estudio por la disponibilidad de herramientas biotecnológicas antes mencionadas, aunado a que la viabilidad de injerto entre papa y tomate ha sido previamente demostrada (Peres *et al.*, 2005). Un total de 37 plantas de tomate fueron inoculadas y la eficiencia de infección se evaluó por PCR punto final, resultando en un 75 % (27/37) de eficiencia de transmisión. El desarrollo de la enfermedad se documentó fotográficamente en las plantas CLso positivas a los 14, 28, 42, 56, y 70 dpi, resultando en una progresión de la sintomatología proporcional al tiempo, lográndose diferenciar tres etapas principales: 1) Etapa temprana con sintomatología ligera (14 y 28 dpi), 2) etapa intermedia con síntomas moderados (42 y 56 dpi), y 3) etapa tardía con sintomatología severa (70 dpi). Adicionalmente, el título de CLso se determinó por qPCR, encontrándose que existe una correlación entre la intensidad de los síntomas y la carga bacteriana. Esta observa-

ción concuerda con distintos sistemas de interacción planta-patógeno donde dicho fenómeno está ampliamente descrito, incluyendo el patosistema Limón-CLso (Arce-Leal *et al.*, 2020). Estos resultados, muestran que el patosistema tomate-CLso presenta etapas de infección perfectamente diferenciables, y cargas bacterianas homogéneas de modo similar al patosistema limón-CLso, posicionándolo como un buen modelo biológico para estudios intra e inter específicos. Posteriormente, para validar a nivel molecular la respuesta del tomate ante la infección de CLso se determinó la respuesta a nivel transcripcional del gen marcador PR-P1 de tomate, el cual está involucrado en la señalización por ácido salicílico en respuesta a patógenos, incluidas las bacterias (Casteel *et al.*, 2012); obteniéndose una inducción significativa a los 56 dpi en plantas infectadas con CLso comparadas con los controles de plantas sanas. Este resultado demuestra que una vez establecida la infección y los síntomas de la enfermedad se han presentado, la planta genera las respuestas defensivas esperadas.

Finalmente, para ahondar en la posibilidad de usar el patosistema tomate-CLas de modo extrapolable al patosistema limón-CLas, se realizó un ensayo comparativo de la respuesta transcripcional de dos genes marcadores de defensa antibacteriana que incluyen a los micro RNAs miR160 y miR393. Ambos micro RNAs son reguladores negativos del metabolismo de auxinas, y en el caso de *Pseudomonas* y *Agrobacterium* ha sido demostrado que su inducción está molecularmente relacionada con la respuesta antibacteriana por parte de la planta hospedadora (Peláez y Sánchez 2013). Los niveles de miR160 y miR393 se determinaron en etapas temprana y tardía de la infección, tanto en plantas de tomate infectadas con CLso como en plantas de limón infectadas con CLas, tomando en cuenta que por la naturaleza de las plantas hospedadoras para el caso de tomate 14, y 28 dpi se consideran eta-

pas tempranas y 56 dpi etapa tardía, mientras que para limón 56 dpi es etapa temprana y 112 dpi etapa tardía. Los resultados demuestran que en ambos sistemas existe un incremento de expresión estadísticamente significativo de ambos miRNAs tanto en etapas tempranas como tardías y que presentan comportamientos de respuesta similares entre ambos sistemas.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos del análisis fenotípico, desarrollo de síntomas, carga bacteriana y respuesta defensiva a nivel transcriptómico, demuestran que el patosistema tomate-CLso representa un atractivo modelo de interacción planta-bacteria y que los resultados obtenidos pueden ser extrapolables a sistemas más complejos como limón-CLas, dejando así las bases y herramientas para estudios posteriores que permitan generar estrategias de control de enfermedades devastadoras actualmente causadas por bacterias del género *Candidatus Liberibacter*.

## LITERATURA CITADA

- Alemán J, Baños H and Ravelo J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. *Revista de Protección Vegetal* 22(3):154-165. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522007000300003&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522007000300003&lng=pt&nrm=iso)
- Arce-Leal AP, Bautista R, Rodríguez-Negrete EA, Manzanilla-Ramírez MÁ, Velázquez-Monreal JJ, Santos-Cervantes ME, Méndez-Lozano J, Beuzón CR, Bejarano ER, Castillo AG, Claros MG and Leyva-López NE. 2020. Gene expression profile of mexican lime (*Citrus aurantifolia*) trees in response to huanglongbing disease caused by *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Microorganisms* 8 (4):528. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040528>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>.
- Bassanezi RB, Lopes SA, de Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL and Ayres AJ. 2020. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 45:251-264. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00343-y>
- Bendix C and Lewis JD. 2018. The enemy within: phloem-limited pathogens. *Molecular Plant Pathology* 19(1):238-254. <https://doi.org/10.1111/mpp.12526>
- Bojórquez-Orozco AM. 2021. miRNAs expresados diferencialmente durante la infección por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón mexicano. Instituto Politécnico Nacional. 92p.
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88(1):7-37. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>
- Casteel CL, Hansen AK, Walling LL, and Paine TD. 2012. Manipulation of plant defense responses by the tomato psyllid (*Bactericera cockerelli*) and its associated endosymbiont *Candidatus Liberibacter psyllauros*. *PLoS ONE* 7(4):e35191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035191>
- Chen Z, Hu L, Han N, Hu J, Yang Y, Xiang T and Wang L. 2014. Overexpression of a miR393-resistant form of transport inhibitor response protein 1 (mTIR1) enhances salt tolerance by increased osmoregulation and Na<sup>+</sup> exclusion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 56 (1): 73-83. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu149>
- Dai X, Zhuang Z and Zhao PX. 2018. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research* 46 (W1):W49-W54. <https://doi.org/10.1093/nar/gky316>
- Dala-Paula BM, Plotto A, Bai J, Manthey JA, Baldwin EA, Ferrarezi RS and Gloria, MBA. 2018. Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Frontiers in Plant Science* 9:1976. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01976>
- Fletcher J, Berenbaum M, Gray S, Groves R, Scorza R, Triplett L, Trumble J, Yang B. 2018. Review of the citrus greening research and development efforts supported by the Citrus Research and Development Foundation: Fighting a ravaging disease. Washington DC: National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25026>.
- Gao S, Yu D, Meng X and Zhang F. 2018. Global dynamics of a stage-structured Huanglongbing model with time delay. *Chaos, Solitons & Fractals* 117:60-67. <https://doi.org/10.1016/j.chaos.2018.10.008>
- Haapalainen M. 2014. Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology* 165(2):172-198. <https://doi.org/10.1111/aab.12149>
- Hodges AW, Rahmani M, Stevens TJ and Spreen TH. 2014. Economic impacts of the Florida citrus industry in 2012-13. Final sponsored project report to the Florida De-

- partment of Citrus. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, Gainesville, FL. [https://fred.ifas.ufl.edu/pdf/economic-impact-analysis/Economic\\_Impacts\\_Florida\\_Citrus\\_Industry\\_2012-13.pdf](https://fred.ifas.ufl.edu/pdf/economic-impact-analysis/Economic_Impacts_Florida_Citrus_Industry_2012-13.pdf)
- Huang CY, Niu D, Kund G, Jones M, Albrecht U, Nguyen L, Bui C, Ramadugu C, Bowman KD, Trumble J and Jin H. 2021. Identification of citrus immune regulators involved in defence against Huanglongbing using a new functional screening system. *Plant Biotechnology Journal* 19(4):757-766. <https://doi.org/10.1111/pbi.13502>
- Huot OB, Levy JG and Tamborindeguy C. 2018. Global gene regulation in tomato plant (*Solanum lycopersicum*) responding to vector (*Bactericera cockerelli*) feeding and pathogen (*Candidatus Liberibacter solanacearum*) infection. *Plant Molecular Biology* 97(1-2):57-72. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0724-y>
- Islam W, Noman A, Qasim M and Wang L. 2018. Plant responses to pathogen attack: small RNAs in focus. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2):515. <https://doi.org/10.3390/ijms19020515>.
- Liefting LW, Perez-Egusquiza ZC, Clover GRG and Anderson JAD. 2008. A new '*Candidatus Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92 (10): 1474-1474. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1474A>
- Liefting LW, Sutherland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS and Clover GR. 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease* 93 (3):208-214. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0208>
- Lin H, Lou B, Glynn JM, Doddapaneni H, Civerolo EL, Chen C, Duan Y, Zhou L and Vahling, CM. 2011. The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. *PLoS One* 6(4) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019135>.
- Liu SR, Zhou JJ, Hu CG, Wei CL and Zhang JZ. 2017. MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in microbiology* 8:1801. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01801>.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25 (4):402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Munyanza JE. 2012. Zebra chip disease of potato: biology, epidemiology, and management. *American Journal of Potato Research* 89(5):329-350. <https://doi.org/10.1007/s12230-012-9262-3>
- Naranjo E, Merfa MV, Ferreira V, Jain M, Davis MJ, Bahar O, Gabriel DW and De La Fuente L. 2019. *Liberibacter crescens* biofilm formation *in vitro*: establishment of a model system for pathogenic '*Candidatus Liberibacter* spp.'. *Scientific Reports* 9:5150. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41495-5>
- Peláez P and Sanchez F. 2013. Small RNAs in plant defense responses during viral and bacterial interactions: Similarities and differences. *Frontiers in Plant Science* 4:343 <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00343>.
- Peres LEP, Carvalho RF, Zsögön A, Bermúdez-Zambrano OD, Robles WGR, and Tavares S. 2005. Grafting of tomato mutants onto potato rootstocks: An approach to study leaf-derived signaling on tuberization. *Plant Science* 169:680-688. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.017>
- Rotenberg D, Thompson TS, German TL, and Willis DK. 2006. Methods for effective Real time-RT PCR analysis of virus induced gene silencing. *Journal of Virological Methods* 138:49-59 <https://doi.org/10.1016/j.jviro-met.2006.07.017>
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2021. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consulta, julio 2022).
- Singerman A, Lence SH and Useche P. 2017. Is area-wide pest management useful? The case of citrus greening. *Applied Economic Perspectives and Policy* 39(4):609-634. <https://doi.org/10.1093/aep/ppx030>
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF and Hellens RP. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods* 3 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Ventura-Medina PI, Gutiérrez-Espinosa MA, Febres V, Mora-Aguilera G and Robledo-Paz A. 2019. Identification and cloning of three endogenous genes that may confer resistance to pathogens in citrus including CLas and CTV. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(3): 399-420. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-6>
- Wang N. 2019. The Citrus Huanglongbing crisis and potential solutions. *Molecular Plant* 12(5):607-609. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.03.008>
- Yin H, Hong G, Li L, Zhang X, Kong Y, Sun Z, Li J, Chen Y and He Y. 2019. miR156/SPL9 regulates reactive oxygen species accumulation and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 109(4):632-642. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0306-R>
- Zeng C, Wu H, Cao M, Zhou C, Wang X and Fu S. 2022. Integrated Analysis of the miRNAome and transcriptome reveals miRNA-mRNA regulatory networks in *Catharanthus roseus* through *Cuscuta campestris*-mediated infection with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Frontiers in microbiology* 13:799819. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.799819>.
- 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 (1): 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)

# Rootstock implication on quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime

## Implicación del patrón en la distribución cuantitativa de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón Mexicano

Fabiola Esquivel-Chávez, <sup>1</sup>Fitopatología CP-LANREF, <sup>2</sup>Colegio de Posgraduados Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230; Gustavo Mora-Aguilera\*<sup>1</sup>, José Joaquín Velázquez-Monreal, INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima, México. C.P. 28100; M. Alejandra Gutiérrez-Espinosa, <sup>2</sup>Fruticultura; Emiliano Loeza-Kuk, INIFAP Campo Experimental Mocochoá, Yucatán, México. C.P. 67413.

\*Autor de correspondencia: [morag@colpos.mx](mailto:morag@colpos.mx)

Received: September 22, 2022.

Accepted: October 30, 2022.

Esquivel-Chávez F, Mora-Aguilera G, Velázquez-Monreal JJ, Gutiérrez-Espinosa MA and Loeza-Kuk E. 2022. Rootstock implication on quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 57-68.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-15>

**Resumen.** Huanglongbing, enfermedad bacteriana causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), está presente en varias zonas citrícolas de América y otras partes del mundo afectando principalmente cítricos dulces. En México, CLas ha sido más prevalente e intenso en cítricos agrios desconociéndose su comportamiento infeccioso en diferentes combinaciones injerto-portainjerto. El objetivo fue analizar la concentración y distribución de la bacteria en limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) (Lm) injertado sobre *C. macrophylla* (Cm), *C. aurantium* (Ca) y *C. volkameriana* (Cv), y su relación con intensidad sintomática. En condiciones de invernadero, la inoculación se realizó vía injerto simple de varetas de Lm proveniente de una sola

planta donadora de 8 años. Se confirmó la infección con q-PCR. A los 12 meses después de inoculación (mdi) se realizaron muestreos mensuales hasta los 20 mdi. Se extrajo el DNA total por muestra y se cuantificó el número de copias de 16S rDNA CLas mediante q-PCR. A los 6 mdi, 15 de las 21 plantas presentaron moteado difuso. Se detectaron diferencias significativas en la concentración de CLas entre combinaciones injerto-portainjerto y entre regiones distal y proximal de ramas ( $p = 0.001$ ). La expresión sintomática exhibió una tendencia inversamente proporcional respecto a la concentración de CLas (rango:  $5,89E+05$  -  $2,80E+04$ ). Este comportamiento fue notorio en Lm/Ca, la cual presentó en general mayor concentración de CLas, pero menor intensidad sintomática. Este resultado sugiere posible tolerancia de limón Mexicano a la infección de CLas conferido por Ca.

**Palabras clave:** Huanglongbing, *Citrus aurantifolia*, *Citrus aurantium*, *C. volkameriana*, *C. macrophylla*.

La bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) infecta todas las especies de cítricos, pero causa una expresión de síntomas diferencial (Bermudez-Guzman *et al.*, 2015; Esquivel *et al.*, 2012). Por otra parte, los síntomas inducidos por CLas pueden ser similares a los causados por ciertos desbalances fisiológicos como el nutrimental. Sin embargo, algunos síntomas son típicos, como hojas con áreas amarillas y verdes sin límites definidos que dan lugar a un moteado con patrón asimétrico y frutos con pericarpio engrosado asimétricamente (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

En México, CLas ha sido más severo en limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) parcialmente en el pacífico mexicano (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). La producción de este cítrico es la más afectada, ya que su rendimiento se reduce hasta 50% cuando la severidad del HLB es del 75 al 100% de síntomas a nivel del dosel (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013). Velázquez-Monreal y colaboradores (2012), analizaron la expresión de síntomas inducidos por CLas en limón Mexicano injertado en limón Macrofilia (*C. macrophylla*) y limón Volkameriano (*C. volkameriana*). Reportaron que el limón Mexicano injertado en *C. macrophylla* presentó aparentemente mayor susceptibilidad a la infección por CLas expresando mayor severidad foliar. Un estudio reciente sobre el comportamiento de CLas en diferentes patrones Citrandarin, híbridos de mandarina Sunki (*C. sunki*) y *Poncirus*, mostró que la infección de CLas fue del 92% en naranja dulce (*C. sinensis*) injertada sobre 56 patrones Citrandarin y del 14% en plantas Citrandarin injertadas en lima Rangpur (*C. limonia*). A partir de estos resultados asociaron como tolerantes estos híbridos (Boava *et al.*, 2015).

Albrecht y Bowman (2011) observaron mayores rendimientos en plantas de naranja “Valencia”

en combinación con híbrido trifoliado US-897, de naranja trifoliada (*P. trifoliata*) y mandarina “Cleopatra” (*C. reticulata*), cultivadas en invernadero y campo, por lo que reportaron tolerancia de este genotipo a CLas. También Albrecht y Bowman (2012), evaluaron los portainjertos híbridos trifoliados: Citrange Carrizo, US-897, US-942, US-802 y US-812; naranja trifoliada Benecke, limón Volkameriano y mandarina Cleopatra. A los 18 meses después de la inoculación (mdi) Carrizo, US-897 y US-942 fueron clasificados como tolerantes; US-802, US-812 y limón Volkameriano como moderadamente tolerantes, y mandarina Cleopatra como susceptible a la infección de CLas. Albrecht y colaboradores (2012) reportaron que el patrón (Mandarina cleopatra, limón Volkameriano, Carrizo citrange, naranja agrio, Benton citrange, limón rugoso, Kinkoji, Swingle citrumelo, US-942, US-897, US-852, US-812, US-802 y US-801) en naranja dulce no indujo altos niveles de resistencia a CLas, aunque, detectaron diferencias en la expresión de los síntomas, nivel de daño en dosel, crecimiento del tallo, y calidad de fruta. Un aspecto fundamental para entender el comportamiento diferencial de la combinación injerto-portainjerto es el análisis de la multiplicación de CLas en los tejidos de la planta y su relación con la expresión de síntomas.

La distribución y cuantificación de CLas en tejidos de planta adulta y joven se ha estudiado en naranja dulce (Coletta-Filho *et al.*, 2010; Folimonova *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Kawabe *et al.*, 2006). En estos trabajos no se evaluó el efecto de la combinación injerto-portainjerto y en general no se analizó el efecto de época de muestreo. A diferencia de los trabajos anteriores, en el presente estudio se analizó la dinámica de la concentración de CLas en limón Mexicano considerando la combinación de éste con el portainjerto en un período de hasta 20 meses a partir de la inoculación.

Este trabajo tuvo como propósito establecer la implicación de la concentración estacional y distribución de CLas en los tejidos de limón Mexicano en relación en la expresión de síntomas en tres portainjertos bajo la hipótesis de que la concentración y distribución de CLas ésta determinada por el tipo de portainjerto y el nivel de daño e inóculo en los tejidos de los flujos de crecimiento previos, lo cual determina un efecto diferencial en la expresión de síntomas. En este trabajo se incluyeron los portainjertos *C. macrophylla*, *C. volkameriana* ampliamente utilizados en el pacífico mexicano y el naranjo agrio (*C. aurantium*) con fines comparativos dado su amplio uso en México en particular con *C. sinensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Portainjertos.** Se obtuvieron plantas certificadas de *C. macrophylla* (*Cm*), *C. volkameriana* (*Cv*) y *C. aurantium* (*Ca*) de seis meses de edad y 1.5 cm de grosor de tallo para utilizarse como portainjertos del limón Mexicano (*Lm*).

**Inoculación.** El inóculo provino de árboles de *Lm* de ocho años con HLB mantenidos en condiciones de invernadero desde el 2010. La confirmación y concentración de CLas se estimó por PCR en tiempo real (q-PCR). Se colectaron brotes medianamente lignificados de más de 20 cm de longitud y se injertaron varetas en los portainjertos *Cm*, *Cv* y en *Ca*. Las varetas se cortaron en bisel y se insertaron en el tallo de los portainjertos a una altura promedio de 34 cm sobre el nivel del suelo. En esas mismas plantas quince días después, se injertó una vareta de *Lm* negativa a CLas en el tallo de los mismos portainjertos a una altura aproximada de 24 cm sobre el nivel del suelo.

Los ensayos se establecieron en el 2013 en un invernadero del Campo Experimental Tecomán del

INIFAP, en el estado de Colima. El experimento constó de 6 tratamientos ( $Lm^{+CLas} / Cm$ ,  $Lm^{+CLas} / Cv$ ,  $Lm^{+CLas} / Ca$ ,  $Lm^{-CLas} / Cm$ ,  $Lm^{-CLas} / Cv$ ,  $Lm^{-CLas} / Ca$ ); los primeros tres con siete repeticiones y los restantes con una, en un total de 24 plantas. Se consideró una planta como unidad experimental.

**Evaluación de la expresión de síntomas.** Se hicieron evaluaciones mensuales a partir de los 12 meses después de la inoculación (mdi) hasta los 20 mdi, la estimación de síntomas foliares se hizo en base al porcentaje de copa de las plantas mostrando a éstos empleando una escala de 4 clases: 1) síntomas leves (5 al 15%), 2) síntomas moderados (15 al 30%), 3) síntomas típicos (31 al 45%) y 4) síntomas severos (46 al 60%). Se registró la aparición de síntomas foliares como punteado clorótico, moteados difusos y clorosis, así como síntomas similares a los causados por deficiencias nutrimentales. En todos los casos se hizo el registro fotográfico correspondiente.

**Desarrollo de la enfermedad, concentración y distribución de CLas.** Para evaluar el progreso de la infección, la concentración y distribución de la bacteria, se seleccionaron 3 ramas por planta de cada tratamiento y se marcaron las porciones proximal y distal (último brote) al punto de injerto. Se tomaron seis muestras foliares por planta con  $Lm^{+CLas}$  y una muestra de las plantas testigo por portainjerto. El muestreo se realizó cada 30 días a partir de los 12 hasta los 20 mdi. En total se analizaron 129 muestras por muestreo. Se colectó una hoja por sección marcada en cada planta y se fueron alternando en cada muestreo, con la finalidad de identificar la concentración y distribución de CLas en cada fecha.

Todas las muestras foliares se analizaron por qPCR a partir de 0.1g de nervadura central. La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó por el método de CTAB según Freitas-Astúa y colabora-



dores (2003). La pureza del ADN se estimó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

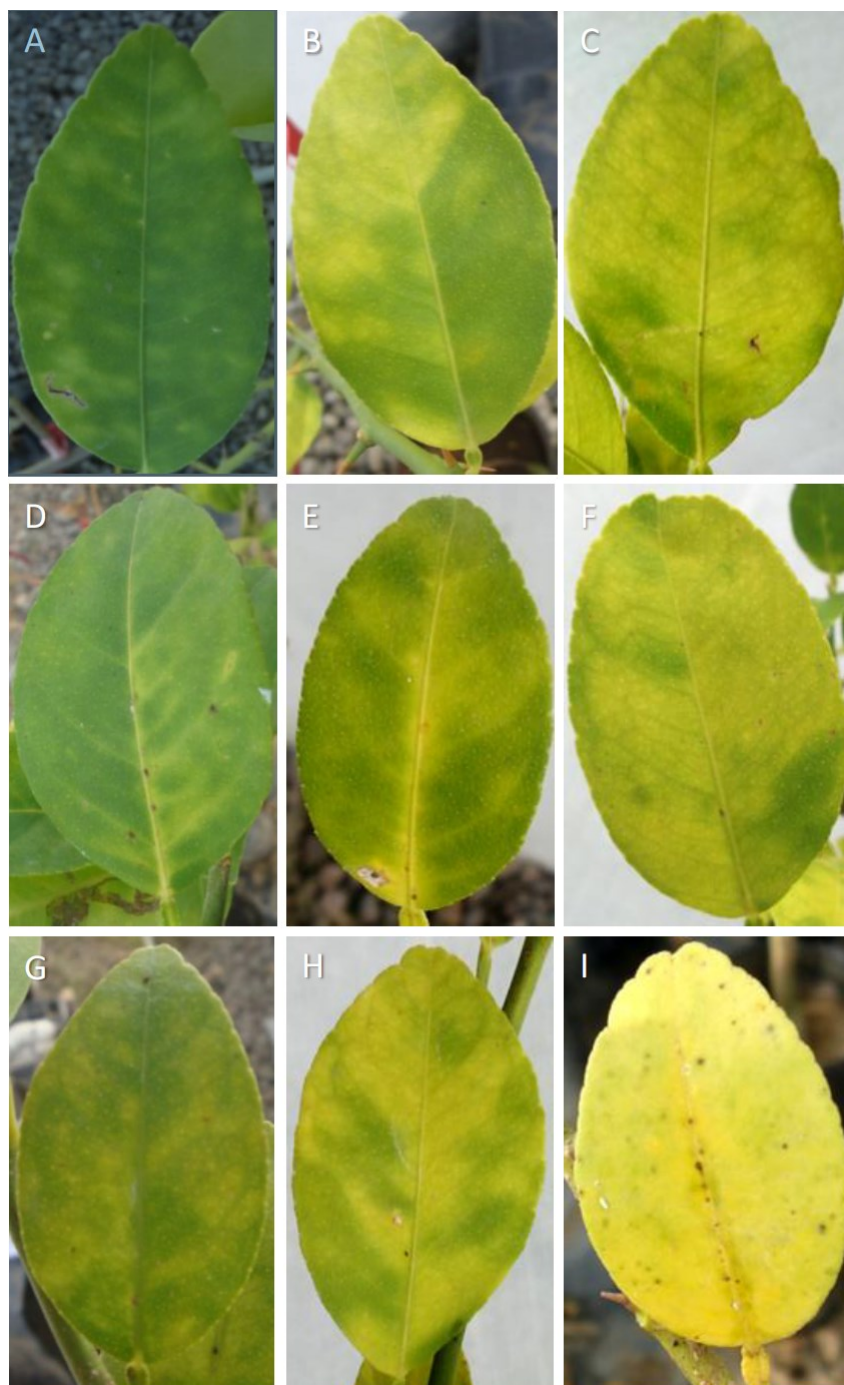
La detección y cuantificación de CLas se hizo con los iniciadores que amplifican para el gen 16S DNA ribosomal: HLBas (TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG) y HLBp (GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG), junto con la sonda HLBr (FAM- AGACGG GTGAGT AAC GCG/3BQH1) (Li *et al.*, 2006). La mezcla de reacción para la qPCR consistió en 20  $\mu$ L, de los cuales 10  $\mu$ L son de Universal Probes Supermix (SsoAdvanced™ BIO-RAD), 120 nM de cada iniciador, 180 nM de sonda y 1  $\mu$ L de ADN total. Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador StepOne Plus (Applied Biosystems) con las condiciones siguientes: un paso a 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 5 s y 59 °C durante 40 s.

La cuantificación de la bacteria se realizó por el método descrito por Li y colaboradores (2006), adaptado por SENASICA-CNRF (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria). Diluciones seriales del ADN de la bacteria se prepararon a partir de 1109500 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup> de 16sr ADN de CLas, dividido en alícuotas de 1:10, de las cuales se hicieron cinco diluciones, y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las diluciones se emplearon para generar la curva estándar. Para determinar la sensibilidad teórica y la fiabilidad de la qPCR, se realizaron dos repeticiones de cada muestra. Se mandó a secuenciar el producto de PCR de las fechas cero y nueve, con la finalidad de corroborar la infección de CLas.

**Análisis estadístico.** Para el análisis estadístico se empleó el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC). Se comparó la concentración de CLas y su distribución por ramas en el progreso temporal de la enfermedad, mediante la prueba de separación de medias Tukey, con significancia de  $p = 0.001$ .

## RESULTADOS

**Síntomas.** A partir de la inoculación de CLas en plantas de Lm injertadas con *Cm*, *Cv* y *Ca* se efectuaron observaciones periódicas para registrar los síntomas que presentaban y así determinar el efecto de la bacteria sobre la expresión de los mismos en ellas. El número de plantas sintomáticas y la intensidad de los síntomas se fueron incrementando con el tiempo. A los 6 mdi, 15 de las 21 plantas inoculadas con el patógeno expresaron los síntomas típicos inducidos por éste, sobre todo en las combinaciones de Lm/*Cm* y Lm/*Cv* (Figura 1). La combinación de Lm/*Ca* presentó síntomas de punteado clorótico en tres plantas, moteado asimétrico cuatro plantas, clorosis leve dos plantas, moteado albino una planta, aclaramiento de nervaduras siete plantas y en ningún caso muerte de ramas, los síntomas no se presentaron de forma individual, sino que en una misma planta se presentaron dos o tres síntomas (Cuadro 1). Con base en la severidad de los síntomas observados, las plantas se agruparon en tres categorías: moderadamente tolerantes, susceptibles y altamente susceptibles. En esta última se ubicó la combinación Lm/*Cm*, la cual presentó punteados cloróticos en tres plantas, seguido de moteados cinco plantas y posteriormente amarillamiento total de hojas jóvenes y maduras siete plantas. A 17 mdi, los síntomas fueron más severos acompañados de defoliación (seis plantas) y muerte de ramas (siete plantas), así mismo, se presentó una disminución del crecimiento de brotes nuevos y el tamaño de las hojas se redujo. A los 20 meses después de la inoculación la mayoría de esas plantas murieron (cinco plantas). Las plantas de la combinación de Lm/*Cv* eran casi tan susceptibles que Lm/*Cm* con síntomas similares 12 mdi sin presentar defoliación ni muerte. Las plantas de Lm/*Ca* mostraron una respuesta muy variable; dos plantas desarrollaron síntomas de punteado clorótico y moteados leves



**Figura 1.** Síntomas inducidos por CLAs en limón mexicano. A-C. Lm/Ca: A) Punteado clorótico síntoma inicial a los 6 mdi, B) Moteado asimétrico síntoma típico a los 12 mdi, C) Hojas cloróticas síntoma severo a los 20 mdi, no generalizado en dosel; D-F. Lm/Cm: D) Aclaramiento de nervaduras síntoma inicial 6 mdi, E) moteado difuso a los 12 mdi generalizado en dosel, y F) clorosis generalizada 20 mdi; G-I. Lm/Cm: G) Punteado clorótico 3-6 mdi, H) Moteado difuso 6-12 mdi síntoma generalizado en dosel, y H) Hojas cloróticas 15 mdi generalizada en dosel.

**Cuadro 1. Respuesta sintomática del limón Mexicano y su combinación injerto-portainjerto a la infección por CLas a partir de los 12 meses después de la inoculación.**

Patrón	No. de planta	Síntomas									Clasificación
		Punteado clorótico	Moteado leve	Moteado asimétrico	Moteado albino	Aclaramiento de nervaduras	Clorosis	Abscisión de hojas	Muerte de ramas	Muerte	
<i>C. aurantium</i>	1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	MT <sup>w</sup>
	2	+	-	-	+	+	-	-	-	-	MT
	3	+	-	-	-	+	+	-	-	-	MT
	4	-	-	+	-	+	-	-	-	-	MT
	5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	MT
	6	+	-	+	-	+	-	-	-	-	MT
	7	-	-	+	-	+	-	+	-	-	MT
<i>C. volkameriana</i>	8	-	+	-	-	+	-	-	-	-	S
	9	-	-	+	-	-	-	-	+	-	S
	10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	S
	11	-	-	-	-	-	+	+	-	-	S
	12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	S
	13	-	-	-	-	+	+	-	-	-	S
	14	-	+	-	-	+	-	-	+	-	S
<i>C. macrophylla</i>	15	-	-	+	-	-	+	-	+	+	AS
	16	-	-	-	+	+	+	+	+	-	AS
	17	+	-	+	+	-	+	+	+	-	AS
	18	-	-	+	-	-	+	+	+	+	AS
	19	-	-	+	-	-	+	+	+	+	AS
	20	-	-	-	-	-	+	+	+	+	AS
	21	-	-	+	-	+	+	+	+	+	AS

<sup>w</sup>MT= moderadamente tolerante, S= susceptible y AS= altamente susceptible.

entre los 3 y 6 mdi, mientras que otras tres presentaron síntomas tardíos de clorosis a los 15 mdi. Estas plantas se clasificaron como moderadamente tolerantes debido a que no exhibieron una reducción de crecimiento, defoliación y muerte (Cuadro 1).

**Concentración y distribución de CLas.** La distribución bacteriana fue heterogénea en relación a títulos altos de la misma (Figura 2), manteniéndose estas concentraciones a través del tiempo (Cuadro 2). Se detectaron variaciones en la concentración en al menos un período de evaluación en las combinaciones de limón Mexicano con tres portainjertos,

destacando aquella con *C. aurantium* (Figura 3). La cual presentó altas concentraciones de CLas ( $p < 0.0001$ ) en cinco fechas de evaluación (13, 15, 16, 18 y 19 mdi), mientras que en otras dos fechas (12 y 14 mdi) la concentración fue similar a la combinación con *C. volkameriana*. Mientras que la combinación sobre *C. macrophylla* superó a las dos combinaciones en las fechas 17 y 20 mdi (Cuadro 3). Destaca que la combinación con *macrophylla* la severidad de los síntomas se incrementó a los 17 mdi; se presentó defoliación, así como muerte de ramas y plantas a 20 mdi y coincide con títulos bacterianos altos comparado con las otras dos combinaciones.

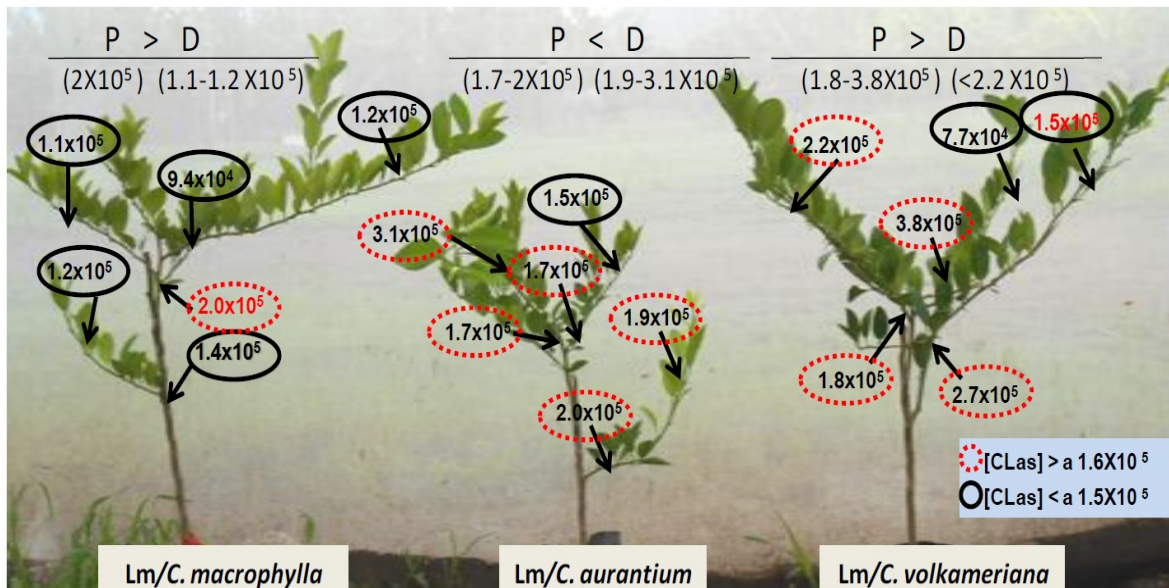


Figura 2. Concentración y distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* detectadas por análisis de PCR cuantitativo en tiempo real. En secciones proximal (P) y distal (D) al punto de injerto en ramas de limón Mexicano sobre 3 patrones 12 meses después de la inoculación.

Los síntomas expresados en cada combinación de limón Mexicano presentaron variaciones, observándose la mayor severidad de estos cuando se utilizó el portainjerto *C. macrophylla*. Así mismo, se obtuvieron diferencias en la concentración de CLas entre fechas de muestreo, aumentando ésta en la parte distal y disminuyendo en la parte proximal de la rama muestreada en periodos de 30 días respecto a la determinación anterior. No habiendo una tendencia en la distribución y concentración de la bacteria. Por ejemplo, para el caso de limón Mexicano sobre *C. aurantium* la distribución de esta varió, de los 12 a los 14 mdi la mayor concentración del patógeno se presentó en la parte distal al punto de inoculación, a los 15 y 16 mdi los títulos bacterianos se distribuyeron heterogéneamente dentro de las plantas, a partir de los 17 a los 20 mdi las mayores concentraciones se detectaron en la parte proximal al punto de inoculación (Cuadro 2). Mientras que en la combinación con *C. volkameriana* la mayor

concentración de la bacteria, se presentó con frecuencia en la parte proximal de las ramas. Finalmente, en limón Mexicano sobre *C. macrophylla* la distribución de la concentración de CLas también varió en las ramas. En general, en las tres combinaciones, durante las últimas tres fechas de evaluación (18 a 20 mdi) la más elevada concentración de la bacteria se detectó en la parte proximal al punto de inoculación.

Se observaron variaciones en la concentración de CLas entre las combinaciones de limón Mexicano con los portainjertos y entre ramas de cada planta. Las concentraciones entre la parte distal y la proximal respecto al punto de inoculación fueron diferentes, esto asociado al desarrollo de los síntomas de la enfermedad, a mayor severidad de éstos menor concentración de CLas (LM/Cm 1.30X10<sup>5</sup> a 12 mdi; Cuadro 3) y a menor severidad mayores títulos de la bacteria (LM/Ca 1.99X10<sup>5</sup> a 12 mdi; Cuadro 3), esto último fue notorio en limón Mexi-

**Cuadro 2. Concentración y distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón Mexicano injertado en *C. aurantium*, *C. volkameriana* y *C. macrophylla*.**

MDI		Lm/Ca <sup>w</sup>			Lm/Cv			Lm/Cm		
		Ct	Concentración	log	Ct	Concentración	log	Ct	Concentración	log
12	r1d <sup>x</sup>	26	3,1E+05	5,13	28	2,2E+05	5,02	27	1,2E+05	5,01
	r1p	28	1,7E+05	5,10	27	1,8E+05	5,14	28	1,4E+05	4,91
	r2d	26	1,7E+05	4,95	28	7,7E+04	4,83	27	1,1E+05	4,91
	r2p	26	1,5E+05	4,84	27	3,8E+05	4,93	26	2,0E+05	5,24
	r3d	27	2,0E+05	5,16	27	1,5E+05	5,06	26	1,2E+05	4,86
	r3p	25	1,9E+05	4,96	26	2,7E+05	5,21	28	9,4E+04	4,77
15	r1d	24	1,2E+05	4,98	26	8,7E+04	4,88	24	1,2E+05	5,01
	r1p	25	1,9E+05	5,06	24	1,8E+05	5,08	24	1,2E+05	5,01
	r2d	24	1,6E+05	5,10	26	7,2E+04	4,77	25	9,1E+04	4,90
	r2p	24	1,7E+05	5,11	25	9,7E+04	4,79	25	1,1E+05	4,85
	r3d	24	1,3E+05	5,04	26	6,3E+04	4,78	27	6,7E+04	4,65
	r3p	24	2,1E+05	5,19	25	1,2E+05	4,98	26	5,4E+04	4,63
18	r1d	25	5,2E+05	5,19	28	6,0E+04	4,52	25	8,6E+04	4,75
	r1p	22	7,5E+05	5,76	27	5,9E+04	4,68	24	3,2E+05	5,23
	r2d	23	5,2E+05	5,57	26	1,4E+05	5,03	26	9,0E+04	4,70
	r2p	23	8,2E+05	5,60	26	2,1E+05	4,70	25	2,3E+05	5,19
	r3d	25	7,2E+05	5,24	26	8,1E+04	4,59	26	4,2E+04	4,55
	r3p	23	8,7E+05	5,57	25	1,8E+05	4,95	25	2,5E+05	5,23
20	r1d	23	5,42E+05	5,51	26	2,54E+05	5,31	22	1,10E+06	6,04
	r1p	23	3,58E+05	5,39	25	4,45E+05	5,43	22	4,57E+05	5,66
	r2d	23	2,05E+05	5,23	25	4,46E+05	5,53	20	1,19E+06	6,08
	r2p	24	3,68E+05	5,32	26	4,48E+05	5,48	25	3,46E+04	4,54
	r3d	22	7,98E+05	5,61	25	2,99E+05	5,40	25	3,19E+05	5,50
	r3p	23	3,95E+05	5,56	24	2,61E+05	5,31	22	4,29E+05	5,63

<sup>w</sup>Lm= limón Mexicano; Ca= *C. aurantium*; Cv= *C. volkameriana*; Cm= *C. macrophylla*.

<sup>r</sup>=rama d= distal p= proximal.

cano sobre *C. aurantium*, que presentó concentraciones mayores que las otras combinaciones durante cinco fechas de evaluación (Figura 3).

## DISCUSIÓN

Las secuencias obtenidas en este estudio (Número de acceso en GenBank: KU159087) se encuentran dentro de los registros del genoma *Candidatus Liberibacter asiaticus* reportados por Lin *et al.* (2008). CLas se detectó en el 100% de las plantas evaluadas excepto en las plantas testigo.

Resultados similares de transmisión de CLas por injerto a los 120 días después de la inoculación fueron reportados por Coletta-Filho *et al.* (2010); en tanto que en otros estudios se ha señalado una transmisión de la bacteria de 70 a 90 % (Folimonova *et al.*, 2009) y de 59 % (Zhang *et al.*, 2012). En el presente trabajo los niveles de concentración de la bacteria variaron entre las diferentes combinaciones de limón Mexicano con los tres portainjertos evaluados, en un intervalo de dos unidades desde aproximadamente  $2.8 \times 10^4$  (Lm/Cm) a  $7 \times 10^5$  (Lm/Ca) copias por 100 mg de tejido muestreado (Cuadro 3). Dentro de la combinación Lm/

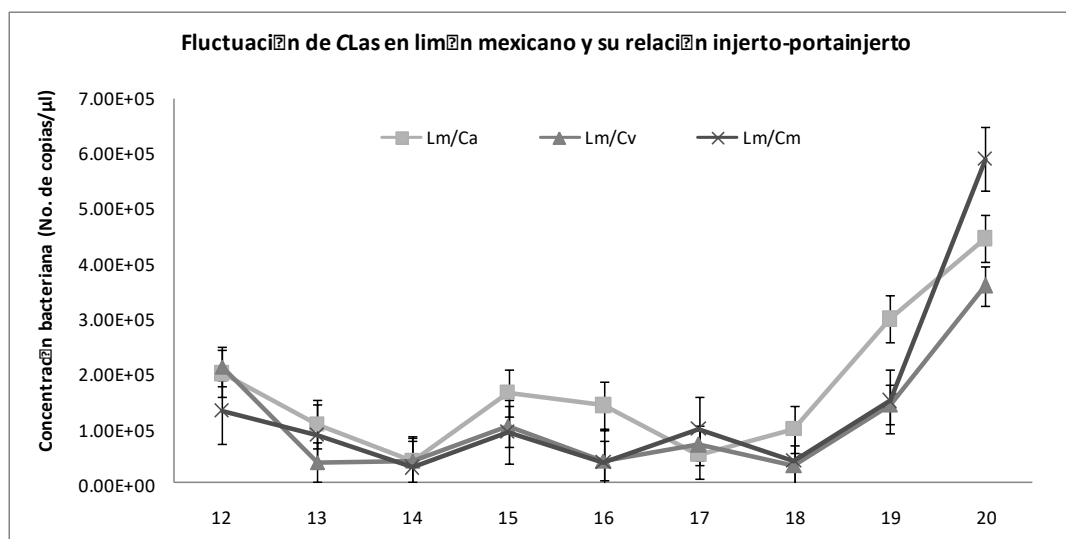


Figura 3. Cuantificación temporal de CLAs, de los 12 meses hasta los 20 meses después de la inoculación en limón Mexicano y su relación injerto/portainjerto. Lm/Ca= *C. aurantium*; Lm/Cv= *C. volkammeriana*; Lm/Cm= *C. macrophylla*.

Cuadro 3. Número de copias del gen 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de limón Mexicano sobre tres portainjertos.

MDI	Ct	<i>Ca<sup>w</sup></i>		Ct	<i>Cv</i>		Ct	<i>Cm</i>				
		Concentración	Log		Concentración	Log		Concentración	Log			
12	26	1,99E+05	5,03	A*	27	2,12E+05	5,03	A	27	1,30E+05	4,95	B
13	28	1,07E+05	4,62	A	31	3,80E+04	4,39	C	30	8,64E+04	4,32	B
14	28	3,98E+04	4,40	C	29	3,99E+04	4,32	C	30	2,80E+04	4,22	B
15	24	1,64E+05	5,08	B	25	1,04E+05	4,88	B	25	9,32E+04	4,84	A
16	26	1,41E+05	4,81	B	28	4,04E+04	4,49	C	27	3,78E+04	4,34	B
17	28	5,18E+04	4,39	C	27	6,89E+04	4,65	B	30	9,80E+04	4,54	A
18	23	7,00E+05	5,49	A	26	1,22E+05	4,75	B	25	1,71E+05	4,94	A
19	24	2,98E+05	5,18	B	26	1,43E+05	4,82	B	25	1,49E+05	4,82	A
20	23	4,44E+05	5,43	A	25	3,59E+05	5,41	A	23	5,89E+05	5,58	

<sup>w</sup>Lm/Ca= *C. aurantium*; Lm/Cv= *C. volkammeriana*; Lm/Cm= *C. macrophylla*.

\*Medias con letras diferentes son significativamente diferentes ( $p < 0.0001$ ).

*Ca*, se observaron diferencias en las concentraciones de la bacteria a través del tiempo, es decir, se presentó una fluctuación, aumentaba y disminuía dicha concentración en el tiempo. Sin embargo, estas diferencias no fueron consistentes en todas las combinaciones de limón Mexicano evaluadas, en

Lm/Ca la concentración sobresalió en cinco fechas alternantes en los 9 periodos de evaluación. En este trabajo se observó que la infección por CLAs en limón Mexicano sobre tres patrones difiere en al menos dos aspectos probablemente interrelacionados: el desarrollo de los síntomas y la concentración de

las células bacterianas que pueden acumularse en el floema de las nervaduras centrales. La mayoría de las muestras con HLB presentaron concentraciones de bacterias que van desde  $10^4$  hasta  $10^7$  por 0.1 g de tejido de la nervadura central en muestras sintomáticas, lo que coincide con lo reportado por otros autores (Lin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009; Tatineni *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006). Sin embargo, es necesario considerar que estas estimaciones corresponden a ADN total, incluyendo la obtenida de bacterias muertas (Hu *et al.*, 2013). En cuanto a los síntomas se observó diferencia entre las combinaciones. *C. macrophylla* que registró títulos bajos de CLas y síntomas severos en contraste con la combinación de *C. aurantium* que tuvo títulos altos del patógeno con síntomas de moderados a leves.

Las diferencias en la concentración de CLas en limón Mexicano injertado sobre tres especies de patrón pudiera ser un factor que influye en las variaciones en la expresión de síntomas de la enfermedad en condiciones productivas. En este trabajo se mantuvo la evaluación de los 12 hasta los 20 mdi. Comparativamente, en otros estudios con diferentes especies de cítricos, la dinámica de carga bacteriana se realizó entre 6 y 12 mdi (Coletta-Filho *et al.*, 2010; Folimonova *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2009; Lopes and Frare, 2008).

La estrategia del muestreo repetitivo en la misma planta a través del tiempo fue necesaria para conocer la distribución de la bacteria y verificar puntos de estacionalidad de ésta (Lin *et al.*, 2010). Las diferentes combinaciones presentaron estacionalidad en cuanto a la parte distal y proximal de la rama. La mayor concentración en la parte proximal se detectó en las últimas tres fechas de evaluación. Este periodo podría traducirse a baja dispersión de CLas por su vector, debido a títulos bajos del inóculo en las áreas de mayor adquisición por el vector, lo que sugiere que la movilidad de la bacteria

durante este periodo estaría afectando directamente el potencial de inóculo. Esquivel-Chávez *et al.* (2012) también reportaron fases de estacionalidad de la bacteria asociadas al grado de daño inducido a nivel celular. Iwanami *et al.* (2009), asociaron la distribución heterogénea de la bacteria con el grado de expresión de los síntomas foliares en las ramas principales, pero no encontraron un efecto directo en la relación de títulos altos o bajos del patógeno respecto a síntomas severos en estas ramas. Esto podría explicar la desigual distribución en planta y títulos bacterianos muy variables (Morgan *et al.*, 2012).

A pesar de que CLas se distribuye de manera heterogénea dentro de cada planta (Ananthkrishnan *et al.*, 2013; Folimonova *et al.*, 2009), la comparación de la concentración de la bacteria en las diferentes combinaciones de limón Mexicano injertado sobre tres especies de patrón reveló niveles similares de CLas en éstas, lo que indica que no hay una estricta correlación entre la concentración bacteriana y la severidad de los síntomas. En la combinación de limón Mexicano sobre *C. macrophylla* se presentaron las concentraciones más bajas en al menos cinco diferentes fechas de evaluación, pero también fue la única combinación que presentó muerte de plantas.

## CONCLUSIONES

La estrategia del muestreo repetitivo en la misma planta a través del tiempo fue necesaria para conocer la distribución de la bacteria y verificar algunos puntos de estacionalidad. La mayor concentración de CLas se presentó en la parte proximal al punto de injerto en cada uno de los patrones en combinación con Lm, excepto en las ramas con mayor desarrollo, éstas presentaron mayor concentración en la parte distal. A pesar de que CLas se

distribuye de manera heterogénea dentro de cada planta, la comparación de la concentración bacteriana en las diferentes combinaciones de Lm reveló que se detectaron niveles similares de CLas en estas, lo que demuestra que no hay una estricta correlación entre la concentración bacteriana y la severidad de los síntomas. Así, la menor severidad en limón Mexicano sobre *C. aurantium* se asoció con alta concentración de CLas. Este resultado sugiere posible tolerancia de limón Mexicano a la infección de CLas conferido por Ca.

#### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada al primer autor. Al INIFAP-Tecomán Colima por las facilidades otorgadas para realizar este trabajo. Al equipo CP-LANREF por el apoyo logístico y operativo. A SENASICA-DGSV por el aporte financiero. A Pedro Robles García, SENASICA DGSV por su apoyo a la investigación en HLB.

#### LITERATURA CITADA

- Albrecht U and Bowman KD. 2011. Tolerance of the Trifoliolate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HortScience* 46(1):16–22. <http://hortsci.ashspublications.org/content/46/1/16.full>
- Albrecht U and Bowman KD. 2012. Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae* 147:71–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.036>.
- Albrecht U, McCollum G and Bowman KD. 2012. Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. *Scientia Horticulturae* 138: 210–220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.027>.
- Ananthkrishnan G, Choudhary N, Roy A, Sengoda VG, Postnikova E, Hartung JS, Stone AL, Damsteeg VD, Schneider WL, Munyaneza JE and Brlansky RH. 2013. Development of primers and probes for genus and species specific detection of ‘*Candidatus Liberibacter species*’ by real-time PCR. *Plant Disease* 97:1235–1243. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1174-RE>.
- Bermudez-Guzman MdeJ, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Orozco-Santos M, Loeza-Kuk E, Michel-López CY, Cortez-Mondaca E and Lucero-Pulido MC. 2015. Molecular identification and distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus species in Mexico. In: IV IRCHLB “International Research Conference on Huanglongbing”. Orlando, Florida, USA. Pp 240. <http://escholarship.org/uc/item/9jw2w985>.
- Boava LP, Sagawa CHD, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2015. Incidence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’-infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. *Phytopathology* 105:518–524. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-08-14-0211-R>.
- Coletta-Filho HD, Carlos EF, Alves KCS, Pereira MAR, Boscardiol-Camargo RL, de Souza AA and Machado MA. 2010. In plant 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>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Flores-Sánchez JL, López-Arroyo JI. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n8/v46n8a3.pdf>.
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fito patología* 33:195-210. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>.
- Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S and Dawson WO. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1346>.
- Freitas-Astúa J, Locali EC, Antoniollo R, Rodríguez V, Kitajima EW and Machado MA. 2003. Detection of *Citrus leprosis virus* in citrus stems, fruits and the mite vector. *Virus Review Research* 8:196.
- Hu H, Davis MJ and Brlansky RH. 2013. Quantification of live ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ populations using real-time PCR and propidium monoazide. *Plant Disease* 97:1158-1167. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-12-0880-RE>
- Iwanami T, Uechi N and Kawano S. 2009. Temporal change in the distribution of PCR-positive tissue within the tree canopy of *Citrus depressa* affected by greening. *Kyushu Plant Protection Research* Jan 55: 68-75. <http://www.cab-direct.org/abstracts/20103012756.html>
- Kawabe K, Truc NTN, Lan BTN, Hong LTT and Onuki M. 2006. Quantification of DNA of citrus Huanglongbing pathogen in diseased leaves using competitive PCR. *Journal of General Plant Pathology* 72:355–359. <http://link.springer.com/article/10.1007/s10327-006-0306-8>
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Li-*



- beribacter species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66:104-115. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Li W, Li D, Twieg E, Hartung JS and Levy L. 2008. Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR. *Plant Disease* 92:854-861. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-92-6-0854>
- Li W, Levy L and Hartung JS. 2009. Quantitative distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus plants with citrus Huanglongbing. *Phytopathology* 99(2):139-144. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-2-0139>
- Lin H, Doddapaneni H, Bai X, Yao J, Zhao X and Civerolo EL. 2008. Acquisition of uncharacterized sequences from *Candidatus Liberibacter*, an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. *Molecular and Cellular Probes* 22:30-37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2007.06.006>
- Lin H, Chen C, Doddapaneni H, Duan Y, Civerolo EL, Bai X and Zhao X. 2010. A new diagnostic system for ultrasensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 81(1):17-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2010.01.014>
- Lopes SA and Frare GF. 2008. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to '*Candidatus Liberibacter americanus*'. *Plant Disease* 92:21-24. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-92-1-0021>
- Lopes SA, Bertolini E, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, Teixeira DC, Fernandes NG and Cambra M. 2009. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. *Phytopathology* 99(3): 301-306. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0301>
- Morgan JK, Zhou L, Li W, Shatters RG, Keremane M and Duan Y. 2012. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Molecular and Cellular Probes* 26:90-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2011.12.001>
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo I, 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. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- Tatineni S, Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T and Wang N. 2008. In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98:592-599. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-98-5-0592>
- Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Eveillard-Jagoueix S, Yamamoto PT, Ayres AJ and Bove JM. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:139-150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2007.12.006>
- Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Manzo-Sánchez G, Robles-González MM, Orozco-Santos M, Carrillo-Medrano SH. 2012. Reacción del limón Mexicano a *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediante inoculación por injerto. In: *Memorias de Congreso Nacional de Fitopatología*. Nuevo Vallarta, Nay. Méx. pp 171.
- Zhang M, Powell CA, Guo Y, Doud MS and Duan Y. 2012. A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and rescuing huanglongbing-affected citrus plants. *Phytopathology* 102:567-574. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-11-0265>

# Implications of crop management and infection chronicity of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime production

## Implicaciones del manejo de cultivo y cronicidad de infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en la producción de limón Mexicano

Gustavo Mora-Aguilera, \*<sup>1</sup>Fitopatología CP-LANREF, <sup>2</sup>Colegio de Posgraduados Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230; <sup>1</sup>Jorge Luis Flores-Sánchez, Emiliano Loeza-Kuk, INIFAP Campo Experimental Mochochá, Yucatán, México. C.P. 67413; <sup>1</sup>Gerardo Acevedo-Sánchez; J. Isabel López-Arroyo, INIFAP Campo Experimental General Terán, Nuevo León CP 67413; J. Joaquín Velázquez-Monreal, INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima, México. C.P. 28100; <sup>1</sup>Santiago Domínguez-Monge; <sup>2</sup>M. Alejandra Gutiérrez-Espinosa, Fruticultura; Bernardo Reyes-González, SENASICA, Zacatecas, México.

\* Corresponding author: morag@colpos.mx

Received: August 23, 2022.

Accepted: November 08, 2022.

Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez JL, Loeza-Kuk E, Acevedo-Sánchez G, López-Arroyo JI, Velázquez-Monreal JJ, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa MA and Reyes González B. 2022. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 69-85.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-16>

**Resumen.** El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del manejo agronómico y cronicidad de infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), bacteria causante del Huanglongbing (HLB), en la producción de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) en el pacífico mexicano con el fin de identificar prácticas tecnológicas de mitigación que propicien la sustentabilidad productiva. Un total de 28 huertos comerciales con alta tecnología agronómica (AT) y 28 con baja tecnología (BT) se seleccionaron en Colima y Michoacán, México.

En cada huerto se determinó la cronicidad de infección de CLAs, estimado mediante el promedio de severidad de HLB en dosel de 100 árboles (total = 5600 árboles). Por huerto, se seleccionaron 15 árboles, tres por clase de severidad (0 = 0, 1 = 25, 2 = 50, 3 = 75 y 4 = 100% de dosel sintomático). Por árbol, se pesó y contó el número total de frutos con madurez de cosecha. En una muestra aleatoria de 20 frutos se midieron variables morfológicas (4) y organolépticas (2). La reducción productiva, inducido por CLAs, fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) en Colima que en Michoacán (8 vs 6.3 t ha<sup>-1</sup>). La carga bacteriana también fue significativamente mayor en Colima (1.68 vs 1.07 x 1000000 copias / q-PCR). En huertos con AT se obtuvo una diferencia de hasta 4 t ha<sup>-1</sup> de fruta con respecto a BT (Tukey,  $p < 0.05$ ). Para ambas entidades, el nivel de tecnificación de huertos aportó 66 %, de la pérdida productiva ( $p$ ) mientras que la cronicidad

de infección el 16 % ( $\hat{p} = 39.4 + 0.57x_1 - 1.15x_2$ ,  $r^2=0.82$ ). El porcentaje de reducción en mediciones morfológicas y organolépticas estuvo en el rango de 7 a 55%, siendo también mayor en Colima (Tukey,  $p < 0.05$ ). Se concluye que el impacto productivo de CLas está fuertemente condicionado por el nivel de tecnificación de huerto y que programas de manejo integrado del cultivo pueden sustentar la rentabilidad de la actividad cítrica.

**Palabras clave:** Huanglongbing, HLB, Pérdidas, Carga inóculo, *C. aurantifolia*

El concepto de cronicidad de infección se usa frecuentemente en humanos y se refiere a la condición permanentemente a nivel tisular de un cuadro infeccioso local o sistémico, la cual requiere monitoreo con fines paliativos. En este grupo de enfermedades se encuentran la hepatitis, cáncer y algunos problemas cardiovasculares (Ali *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2014; Ozougwu *et al.*, 2013). En el caso de enfermedades de plantas el concepto de cronicidad no se ha empleado probablemente porque la fenología de los cultivos, biología de los agentes infecciosos y prácticas agronómicas condicionan y limitan el seguimiento temporal de algunos de estos problemas fitopatológicos. En el contexto agrícola se puede definir a la cronicidad como la asociación permanente y sistémica de un agente infeccioso con el hospedante causando la degeneración gradual de la esperanza de vida del huésped en función de medidas de mitigación adoptadas. Por su naturaleza se aplicaría a cultivos perenes como los frutales y árboles forestales. En cítricos es fundamental la adopción de este concepto ya que la condición sistémica de varios agentes infecciosos como virus, viroides, fitoplasmas y bacterias ha propiciado mecanismos de adaptación entre los cuales se puede citar la protección cruzada (Souza

*et al.*, 2002; Van Vuuren *et al.*, 1993), efectos de supresión inter-específica (Van Vuuren *et al.*, 2000) o la selección natural de cepas moderadas (Rivas-Valencia *et al.*, 2010).

*Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), bacteria con amplia distribución mundial causante del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en México ha exhibido procesos adaptativos debido a su interacción sistémica con amplia diversidad de cítricos cultivados y subcultivados en múltiples ambientes. Este fenómeno debe estudiarse con un enfoque epidemiológico regional con fines de manejo de la enfermedad en su condición crónica, endémica y sub-endémica. La comprensión del efecto de CLas en la fisiología y producción de cítricos permitiría estimar el tiempo de vida productivamente útil, p.e., umbral de rentabilidad, y generar esquemas de mitigación integrales para compensar los impactos detrimentales productivos.

En México, el HLB está presente desde 2009 y en el Pacífico Mexicano desde 2010 en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima y Michoacán (SENASICA, 2015). CLas, se transmite por *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) (DC) en el continente americano (Alanis-Martínez *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2013) y presenta mayor severidad de síntomas fisiológicos e histológicos en limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) y limón persa (*Citrus latifolia*), en comparación con naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Esto representa un escenario contrastante con reportes de Brasil, Florida, California y otras partes del mundo (Bové, 2006; Bassanezi *et al.*, 2009, 2011). No existen bactericidas específicos para el control de CLas, y las fuentes de resistencia para el desarrollo de variedades son muy limitadas (Xu *et al.*, 2013). Sin embargo, se han identificado materiales genéticos que presentan tolerancia o que prolongan la vida productiva (Stuchi *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2013). También existen reportes

sobre agentes inductores de resistencia sistémica adquirida que reducen la carga de inóculo (Bagio *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la óptima nutrición de cítricos puede compensar productivamente una condición de infección (Hernández-Chan *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2014; Gottwald *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011). Las experiencias en Brasil, EUA, China, África y México indican que el enfoque de control regional de *D. citri* representa la estrategia de mayor eficiencia en el manejo del HLB, ya que reduce la dispersión de inóculo secundario y minimiza el costo de aplicaciones de insecticidas y agentes biológicos, en complemento a la erradicación de fuentes de inóculo primario y al uso de material vegetal certificado (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Bassanezi *et al.*, 2013; Bové, 2006). Sin embargo, la eliminación de árboles enfermos es una opción inviable en regiones cítricas con un escenario endémico del HLB (Belasque *et al.*, 2009; Fritz, 2011), es decir regiones con una distribución regional homogénea y crónica de la enfermedad como lo es la región del Pacífico Mexicano.

En este contexto, se requiere una estrategia de manejo integrado del cultivo, la cual incluya la nutrición (Hernández-Chan *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2014; Gottwald *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011), manejo hídrico y del suelo (Campos-Herrera *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013), altas densidades de plantación (Stuchi y Girardi, 2010; Skaria y Hanagriff, 2008; Medina-Urrutia *et al.*, 2004), programas de renovación frecuente de plantaciones (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012), y el control regional de *Diaphorina citri* mediante productos químicos y biológicos (Orduño-Cruz *et al.*, 2015a, 2015b; Cortez-Madriral *et al.*, 2014; Stansly *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2013; Sandoval-Reyes *et al.*, 2013; López-Arroyo *et al.*, 2012; Rogers *et al.*, 2011).

La importancia de CLas se ha demostrado con estudios epidemiológicos de impactos productivos encontrándose pérdidas en rendimiento del 40 al 100 %, para naranja dulce (Bassanezi *et al.*, 2009, 2011), del 17 %, en limón persa (Flores-Sánchez *et al.*, 2015), y del 62 %, en limón Mexicano (Robles-González *et al.*, 2013). Sin embargo, esos estudios no incluyeron al manejo agronómico, cronicidad de infección y regionalidad, o no fueron conducidos con metodologías epidemiológicas que permitieran analizar el efecto variable de severidad y de carga de inóculo en planta, como estimadores de la cronicidad, por lo que la información es restrictiva para toma de decisiones bajo una visión de manejo integrado del cultivo. Otras investigaciones, basadas en indicadores costo-beneficio del manejo del HLB han concluido que la ganancia neta sería igual que la obtenida bajo un escenario de nulo manejo de la enfermedad, por costo de insumos y operatividad (Lopez and Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012); En estos trabajos, sin embargo, no integraron datos fisiológicos para precisar los efectos productivos. A nivel regional, en México y otros países, estudios respecto al riesgo productivos por CLas se han realizado con criterios principalmente socioeconómicos (Singerman and Useche, 2015; Lopez and Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012) y eventualmente con criterios epidemiológicos (Salcedo *et al.*, 2010). Sin embargo, estos enfoques deben adecuarse una vez que patógeno se ha establecido en condiciones endémicas o semi-endémicas. El objetivo de esta investigación fue determinar las implicaciones del manejo agronómico y la cronicidad de infección CLas en la producción de limón Mexicano del Pacífico Mexicano, con el fin de identificar prácticas tecnológicas de mitigación que propicien la sustentabilidad de la producción cítrica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Selección de huertos comerciales.** Este estudio se realizó en el Valle de Tecomán, Colima durante los meses de abril y mayo de 2014, y en el Valle de Apatzingán, Michoacán, en 2015. Estos meses representan la época de cosecha más importante en limón Mexicano (Robles-González *et al.*, 2014). En el caso de Michoacán se contó con el apoyo del Comité Estatal de Sanidad Vegetal tanto en recurso humano, el cual fue entrenado para este trabajo, como medios de transporte. La selección de los huertos fue a partir de un muestreo regional ponderativo denominado Reg-N (CP-LANREF. No Publicado) de 166 huertos, 134 huertos de Michoacán y 32 huertos de Colima, el cual consideró los factores epidemiológicos de repetitividad, por medio de selección de huertos específicos, tales como: nivel de cronicidad regional de infección de CLas, superficie (ha), edad de 6 a 10 años y nivel de tecnificación.

Con el fin de determinar la implicación del manejo agronómico en el impacto productivo de CLas se aplicó, a los productores, una encuesta cuantitativa por huerto, en la que se evaluaron las siguientes categorías: aspectos generales de los huertos (AG), nivel general de nutrición (N), vigor de árboles (V), control de maleza (CM), control general de plagas y enfermedades (CPE), y tipo y frecuencia de riego (R); a partir de estos datos se estimó un factor de ponderación por inductividad al HLB (FPI), el cual fue la suma de los valores parciales por categoría:

$$FPI = \sum(AG, N, V, CM, CPE, R) \quad [1]$$

El nivel de tecnificación por huerto se obtuvo con la regla de decisión:

$$NT = si(FPI \leq \frac{FPI}{2}, "BT", "AT") \quad [2]$$

Donde: *NT*= Nivel de tecnificación de los huertos; *FPI*= Factor de ponderación por inductividad al HLB; *BT*= Baja tecnificación y *AT*= Alta tecnificación.

**Evaluación de variables y cronicidad.** Para estimar la cronicidad de infección de CLas, a partir del área de ingreso (mayor actividad humana y maquinaria) de cada huerto se seleccionaron 100 árboles, en un bloque de 10x10. Se midió la severidad con base en el porcentaje de copa con síntomas de HLB, mediante una escala nominal con clases 0=0, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100% (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). La cronicidad por huerto se estimó con el promedio de severidad de los 100 árboles. La premisa es que una infección sistémica sostenida por más tiempo se refleja en una mayor severidad de síntomas en dosel, concentración bacteriana y daños histológicos (Flores-Sánchez *et al.*, 2015, 2014; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Para estimar la producción total, en el bloque de 10x10 de cada huerto se seleccionaron 15 árboles, tres por clase de severidad. En cada árbol se cosechó, se contó y pesó el número de frutos totales con madurez de cosecha. Esto se realizó con personal experto contratado para homogeneizar criterios de cosecha. Adicionalmente, en una muestra aleatoria de 20 frutos por árbol se midieron las variables morfológicas: diámetro ecuatorial, diámetro polar, grosor de cáscara y volumen de jugo; adicionalmente, se midieron, las variables organolépticas: pH y grados brix (Bassanezi *et al.*, 2009; Flores-Sánchez *et al.*, 2015). El porcentaje de pérdida por variable se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$Perd(\%)i = 100 - (Pe * 100)/Pt \quad [3]$$

Dónde: *Perd(%)i*: es el porcentaje de pérdida por variable-*i*; *Pe*: es la cuantificación de la producción-*P estimada-e* de cada variable en árboles en-

fermos; y *Pt*: es la cuantificación de *P* de árboles sanos, para cada variable morfológica y organoléptica.

Finalmente, con el propósito de tener una estimación por unidad de producción se transformó la pérdida en producción a toneladas por hectárea (*t/ha*), con base en la siguiente ecuación:

$$Perd(t/ha) = (Ptotal * N) / 1000 * (Perd(\%)j) / 100 \quad [4]$$

Donde: *Perd(t/ha)*: es la pérdida en toneladas por hectárea; *Ptotal*: es la producción de árboles sanos en kilogramos; *N*: es la población de plantas en una hectárea (ha) de acuerdo con una densidad de 400 plantas/ha; 1000: constante para convertir kilogramos (kg) a toneladas (t); *Perd(\%)j*: es el porcentaje de pérdida por huerto; 100: constante. Debido a que en limón Mexicano existe *n* cosechas al año la estimación es relativa y no representaría la estimación anual.

**Diagnóstico y Cuantificación de CLas.** Para cuantificar la concentración de CLas y determinar su relación con la cronicidad de infección y pérdida productiva, en cada árbol se colectó una muestra compuesta de ocho hojas, dos por punto cardinal del dosel. El análisis molecular consistió en el aislamiento de ADN con el método CTAB 2%, (Doyle y Doyle, 1987) con buffer salino, para 100 mg de tejido vegetal. Posteriormente, las muestras se cuantificaron mediante un nanodrop espectrofotómetro y se estandarizó a 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  con agua estéril libre de nucleasas. La detección y cuantificación se realizó por qPCR en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems®), con los primers HL-Bas (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBr (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), y sonda (5'-AGA CGG GTG AGT AAC

GCG-3') (Li *et al.*, 2006). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95 °C por 3min, 40 ciclos de 95 °C por 5 s; 59 °C por 40s y 59 °C por 35s.

Para la cuantificación del número de copias genómicas de CLas en las muestras, se generó una curva de calibración externa. Se utilizó el fragmento del gen 16S rDNA clonado en un plásmido (PGEM-T® Promega®). El cual se purificó y cuantificó por uv-espectrofotometría (Nanodrop 1000) y se realizaron diluciones seriales; éstas se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica para estimar la concentración de CLas (*y*) donde  $y = (-3.373) * \text{LN}(\text{Ct}) + 41.95$ , la cual se expresa en número de copias del gen 16S ADNr. Con el propósito de evitar variabilidad en la concentración de ADN de las muestras y para que estas fueran comparables, se realizó una dilución a 20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . El procedimiento descrito se tiene estandarizado en el laboratorio de FRUTI-MOL en Colegio de Postgraduados, lugar donde se procesaron las muestras.

**Análisis de datos.** El análisis estadístico fue parcelas divididas en donde la parcela grande fue el nivel de tecnificación de los huertos y la parcela chica el nivel de cronicidad de infección de CLas. Los datos de cada variable se analizaron con un ANOVA y prueba de comparación de medias (Tukey,  $P < 0.05$ ); adicionalmente, los datos de producción obtenida, cronicidad de infección, y concentración de CLas se ajustaron mediante modelos de regresión lineal simple  $\hat{y} = a + bx$ , donde  $\hat{y}$  representa la estimación del valor de producción, *x* el valor de cronicidad y *a* y *b* son los parámetros de ordenada al origen y tasa de incremento, respectivamente. La implicación del manejo y cronicidad se determinó mediante un análisis de regresión múltiple  $\hat{y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + e_{ij}$ , donde  $\hat{y}$  representa el estimador del porcentaje de pérdida en el rendimiento,  $b_0 =$  pará-

metro de ordenada al origen,  $b_i$  = parámetros que estiman el efecto del manejo y cronicidad,  $X_i$  = valores de manejo y cronicidad para cada huerto evaluado,  $e_{ij}$  = error; el ajuste de los modelos se realizó mediante el método Stepwise del procedimiento REG. Todos los análisis se realizaron en SAS® 9.0 (SAS Instituto, 2008).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Selección de huertos comerciales.** Para determinar la implicación del manejo y cronicidad de infección en el impacto productivo de CLas en limón Mexicano, se cosecharon 900 árboles (126 asintomáticos y 774 con diferentes niveles de severidad del Huanglongbing) en 56 huertos comerciales, 28 con alta tecnificación (AT) y 28 con baja tecnificación (BT) de los municipios citrícolas de mayor importancia de Colima y Michoacán (Cuadro 1). No se observaron frutos con síntomas atribuibles al HLB a diferencia de lo reportado por Robles-González *et al.* (2013), a pesar de considerar un número alto de huertos y de frutos evaluados; esta condición de frutos asintomáticos también se reportó en limón persa en Yucatán (Flores-Sánchez *et al.*, 2015), lo cual sugiere que en el caso de cítricos agrios el HLB no induce los síntomas reportados en frutos de cítricos dulces (Bassanezi *et al.*, 2009; Gottwald *et al.*, 2007; Bové, 2006).

**Diagnóstico y Cuantificación de CLas.** En el presente estudio las 126 muestras colectadas de árboles asintomáticos resultaron molecularmente negativas a CLas, mientras que las 774 muestras de árboles con síntomas de HLB fueron positivas. A nivel regional, se encontró una relación directamente proporcional del incremento de la concentración de CLas (número de copias del gen 16S ADN<sub>r</sub> de CLas x 1,000,000) en función de la cronicidad

de infección ( $x$ ), la cual para Colima fue  $[CLas] = -0.31 + 0.036 x$ ,  $r^2=0.66$  (Figura 1A); y para Michoacán fue  $[CLas] = -0.62 + 0.038 x$ ,  $r^2=0.79$  (Figura 1B).

La severidad del HLB en planta mostró el mismo comportamiento de incremento de la concentración de CLas; para Colima la concentración en planta fue  $[CLas] = 0.008 + 0.032 x$ ,  $r^2=0.71$ ; y para Michoacán fue  $[CLas] = 0.004 + 0.030 x$ ,  $r^2=0.79$ , donde CLas es la concentración de la bacteria y  $x$  es la severidad de la enfermedad (Figura 2A). Los resultados indicaron que la cantidad de CLas es mayor en Colima con  $1.67 \times 10^6$  (número de copias del gen 16S ADN<sub>r</sub> de CLas) en comparación con Michoacán en donde fue de  $1.07 \times 10^6$  (Tukey,  $P < 0.05$ ) (Figura 2B).

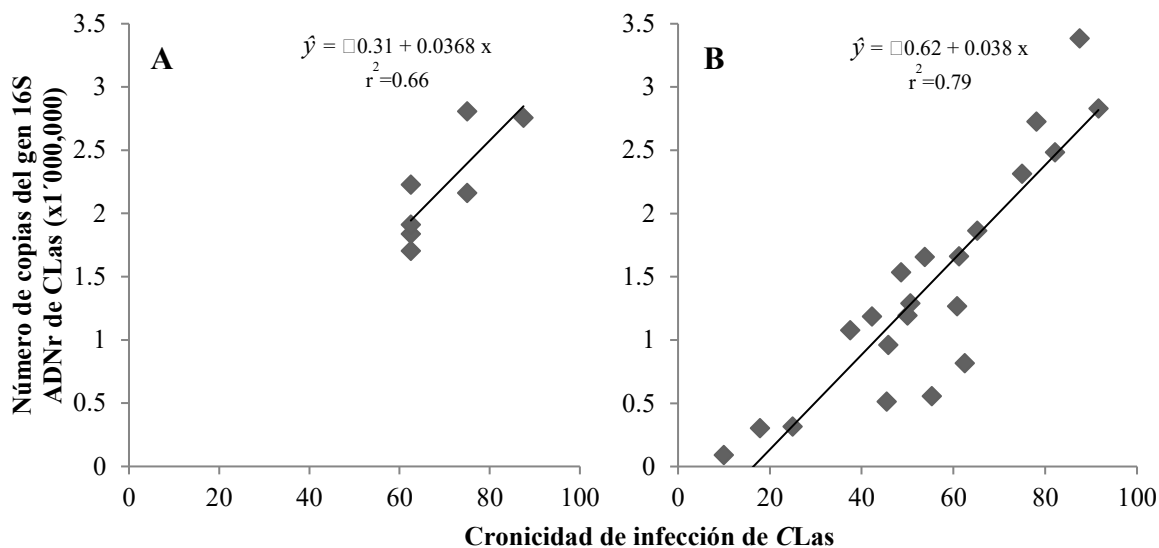
En las dos entidades, el incremento de la concentración de CLas está directamente relacionado con el porcentaje de severidad del HLB en planta y con la cronicidad de infección por huerto, esto significa que árboles con alto porcentaje de síntomas en el dosel y huertos con elevado promedio de cronicidad, contienen mayor cantidad de la bacteria (Figura 1A), lo cual coincide con lo que se reportó, a nivel de plantas, para limón persa en Yucatán en donde se encontró esta misma relación ( $r^2 = 0.91$ ) (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, se propone el uso de la cronicidad de infección de CLas como indicador de la carga de inóculo regional y periodos de infección (Figura 2) en estudios epidemiológicos regionales para la definición de áreas de riesgo y endemidad del HLB (Mora-Aguilera *et al.*, 2014), ya que al ser una variable cualitativa evaluada directamente en campo, reduce los costos de las pruebas moleculares para la cuantificación de CLas y disminuye el tiempo para conocer el estatus epidemiológico *in situ*.

**Implicación del manejo en el impacto productivo de CLas.** La estimación del factor de pon-

**Cuadro 1.** Porcentaje de reducción o incremento (+) del valor de variables morfológicas y organolépticas de frutos de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) en relación a la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en árboles cosechados de huertos con baja tecnificación (BT) de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ ).

Estado/ Severidad del HLB (%)	*Variables Morfológicas				Variables Organolépticas	
	*DP	DE	GC	VJ	Brix	pH
<b>Colima</b>						
0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
25	16 b	21 b	23 b	18 b	13 b	+6 b
50	24 c	27 c	42 c	29 c	20 c	+9 c
75	37 d	37 d	48 d	40 d	27 d	+11 d
100	48 e	52 e	53 e	55 e	33 e	+20 e
<b>Promedio</b>	25	27	33	28	19	+9
<b>Michoacán</b>						
0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
25	9 b	8 b	10 b	14 b	10 b	+2 b
50	16 c	15 c	24 c	21 c	19 c	+2 c
75	24 d	21 d	27 c	25 c	22 d	+3 d
100	25 d	22 d	37 d	32 d	27 e	+7 e
<b>Promedio</b>	15	13	20	18	15	+3

\*DP= Diámetro polar, DE=Diámetro ecuatorial, GC= Grosor de cáscara, VJ= Volumen de jugo, Brix= Grados brix y pH; \*Porcentaje de reducción por variable evaluada, estimada con la proporción de los valores obtenidos por clase de severidad con relación a plantas sanas (severidad = 0%).



**Figura 1.** Relación entre la concentración de CLAs (número de copias del gen 16S ADN<sub>r</sub> de la bacteria x 1'000,000) y la cronicidad de infección de CLAs (promedio de la severidad de 100 árboles por huerto) en 56 huertos de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) con BT de las zonas cítricas de los estados de Colima (A) y Michoacán (B), durante 2014 y 2015. La línea y modelo representan el ajuste por regresión lineal simple.



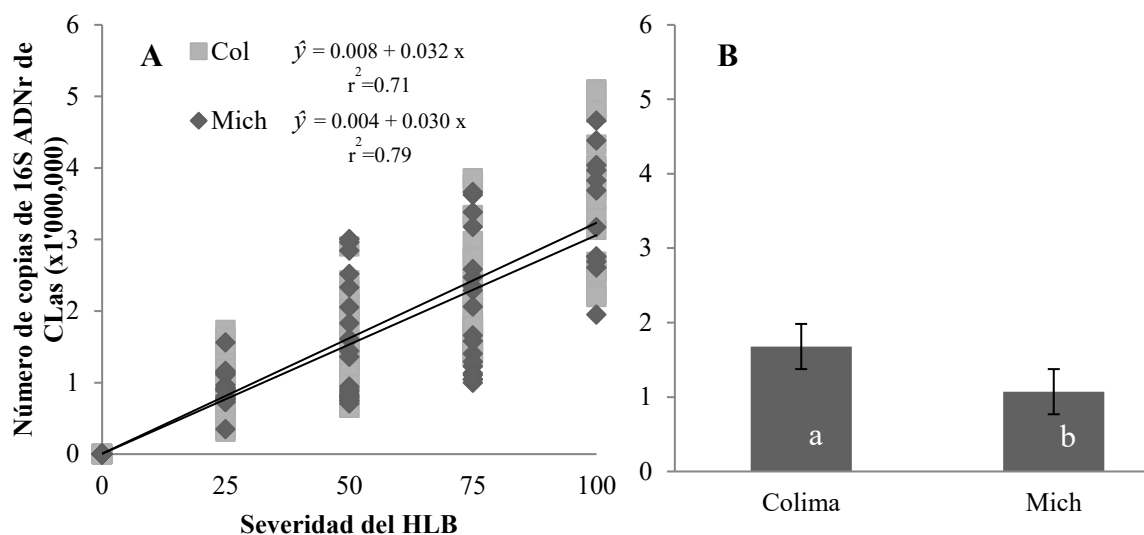


Figura 2. A) Relación entre la concentración de CLas (número de copias del gen 16S ADNr de la bacteria x 1000,000) y la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en 900 árboles cosechados de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) y B) Comparación de medias de la concentración de CLas en Colima (2014) y Michoacán (2015). Las líneas y modelos representan el ajuste por regresión lineal simple. Barras con al menos una letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P < 0.05$ ). Las líneas en las barras representan el error estándar.

deración por inductividad al HLB (FPI) permitió categorizar las condiciones de tecnificación de los huertos evaluados en: 1) baja tecnificación (BT), cuando los productores realizan prácticas agronómicas como riego rodado, bajo nivel de nutrición, ausencia de control de plagas y enfermedades, ausencia de podas de formación y saneamiento, y control ineficaz de *Diaphorina citri* (DC), el FPI varió de 7 a 30; y 2) alta tecnificación (AT), cuando se realizan prácticas agronómicas como: riego por microaspersión, alto nivel de nutrición, control de malezas, podas fitosanitarias, control de plagas y enfermedades, así como control sistemático de DC, con un FPI de 40 a 62.

El impacto productivo promedio en relación a la concentración de CLas en limón Mexicano fue mayor en huertos con BT= 49.4% (4.9 t ha<sup>-1</sup>) en comparación con huertos AT=7.8% (0.8 t ha<sup>-1</sup>) (Tukey,  $p < 0.05$ ) (Figura 3A). Adicionalmente, se

observó que en huertos con BT, la pérdida ( $p$ ) fue directamente proporcional a la cronicidad de infección ( $x$ ) de CLas, la cual para Colima fue del 62.7 % (7 t ha<sup>-1</sup>) con  $p = -3.99 + 0.96 x$ ,  $r^2=0.79$ ; y para Michoacán del 36.7 % (3.4 t ha<sup>-1</sup>) con  $p = -0.34 + 0.82 x$ ,  $r^2=0.82$ ; mientras que en huertos con AT no se observó este efecto en Colima,  $p = 15.4 - 0.09 x$ ,  $r^2=0.02$ ; y tampoco para Michoacán,  $p = 1.43 + 0.11 x$ ,  $r^2=0.08$  (Figura 3B), lo cual era de esperarse ya que la pérdida fue menor al 10% (Cuadro 2).

La integración del efecto de la cronicidad de infección y el nivel tecnológico mediante un análisis de regresión múltiple demostró que, para ambas entidades, la pérdida productiva depende en mayor medida del nivel de tecnificación de los huertos, al explicar el 66% de la varianza, mientras que la cronicidad de infección de CLas explicó solo el 16%. El modelo que mejor se ajustó fue  $p = 39.4 + 0.57x_1 - 1.15x_2$ ,  $r^2=0.82$  ( $p < 0.05$ ), donde  $x_1$  representa

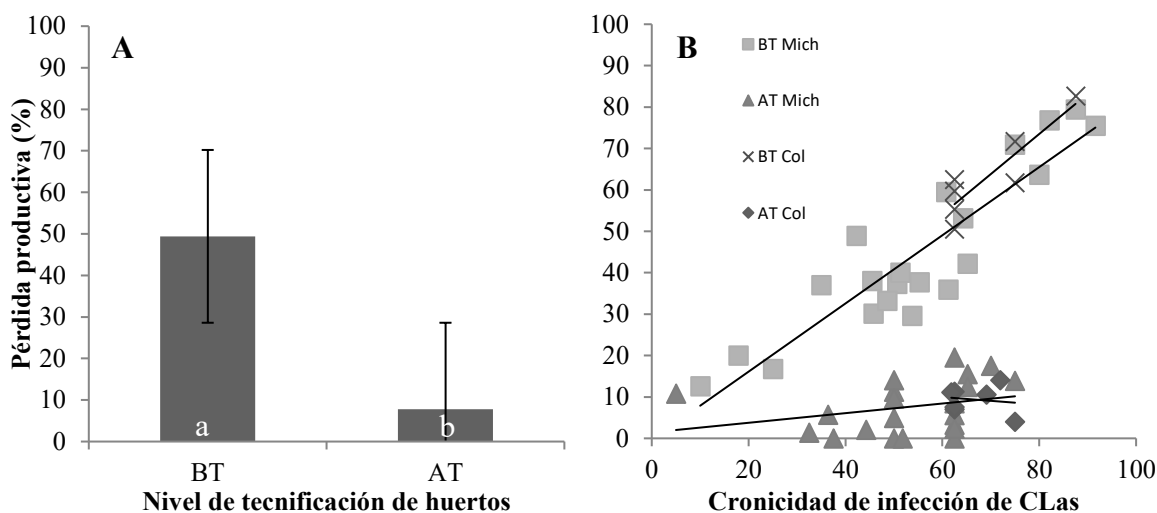


Figura 3. Promedio porcentual de pérdida productiva por: A) nivel de tecnificación de los 56 huertos y B) cronicidad de infección de CLas (promedio de la severidad de 100 árboles por huerto), en huertos con BT y AT de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) de las zonas cítricas de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015. Barras con al menos una letra diferente son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P < 0.05$ ). Las líneas en las barras representan el error estándar. Símbolos diferentes indican diferentes estados y nivel de tecnificación de los huertos. Las líneas representan el ajuste por regresión lineal simple.

al valor de FPI y  $x_2$  la cronicidad de infección de CLas.

A nivel de planta, el impacto productivo promedio con relación a la severidad ( $x$ ) del HLB, también tuvo un comportamiento similar que el descrito para CLas. Así, para Michoacán:  $Prod = 15.8 \exp^{-0.013 x}$ ,  $r^2=0.95$  (Figura 4A) y para Colima:  $Prod = 17.3 \exp^{-0.05 x}$ ,  $r^2=0.84$  (Figura 4B). Esto implica que árboles con 100% del dosel con síntomas de HLB, la pérdida en rendimiento fue del 62.8% (6.3 t ha<sup>-1</sup>) y 80% (8 t ha<sup>-1</sup>) para Michoacán y Colima, respectivamente.

**Efecto de CLas en calidad de fruta.** Las variables morfológicas y organolépticas presentaron, solo en huertos con BT, una relación detrimental en función de la severidad del HLB ( $r^2=0.62$  a  $0.76$ ). El porcentaje de reducción fue mayor en Colima en comparación con Michoacán con DP= 48% vs 25%,

DE= 52% vs 22%, GC= 53% vs 37%, VJ= 55% vs 32%, Brix= 33% vs 27% y pH= +20% vs +7%, para el 100% de severidad (Tukey,  $P < 0.05$ ) (Cuadro 1). En todos los casos, el efecto más alto se encontró en árboles con 100% del dosel con síntomas de la enfermedad. Los frutos de estas plantas presentaron menor tamaño, cantidad y calidad de jugo al ser menos ácidos y con menor contenido de azúcares.

Se comprobó que en limón Mexicano existe un efecto de CLas en la calidad de la fruta, lo cual también se ha reportado para naranja dulce (Bassanezi *et al.*, 2009) y limón persa (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). El efecto más intenso se encontró en frutos de árboles con severidad del 100%, los cuales presentaron menor peso, tamaño, cantidad y calidad de jugo al ser más ácidos y reducirse el contenido de azúcares, en comparación con frutos de árboles sanos; lo anterior es producto de la acumulación de foto-asimilados y almidón en los tejidos infectados

**Cuadro 2. Cronicidad de CLas y nivel de tecnificación y su asociación con las características de los huertos de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) cosechados para medir el impacto productivo de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente.**

No	Municipio	Huerto	Sup. (ha)	Nivel de Tecnificación <sup>w</sup>	Edad (años)	Tipo de Riego <sup>x</sup>	Cronicidad <sup>y</sup>
<b>Michoacán</b>							
1		Ag1	8	BT	10	Rodado	65.2
2	Aguililla	Ag2	38	AT	6	Micro	65.2
3		Ag3	24	AT	6	Micro	65.2
4		Apat1	8	AT	10	Rodado	50
5		Apat2	10	AT	6	Micro	50
6		Apat3	8	AT	6	Rodado	50
7	Apatzingán	Apat4	12	AT	6	Micro	50
8		Apat5	10	BT	6	Rodado	17.9
9		Apat6	8	BT	6	Rodado	35
10		Apat7	12	BT	10	Rodado	50.65
11		Apat8	20	BT	8	Rodado	53.75
12		Buen1	8	AT	6	Micro	62.5
13		Buen2	7	AT	6	Micro	37.5
14		Buen3	5	AT	10	Micro	44.23
15	Buenavista	Buen4	8	AT	6	Micro	70
16		Buen5	10	BT	10	Rodado	45.5
17		Buen6	7	BT	6	Rodado	82.14
18		Buen7	6	BT	8	Rodado	61.25
19	G. Zamora	GZ1	6	AT	6	Rodado	62.5
20		GZ2	8	BT	8	Rodado	25
21	La Huacana	LH1	5	BT	6	Rodado	10
22		LH2	3	AT	6	Rodado	5
23		Muj1	8	BT	6	Rodado	45.8
24	Mújica	Muj2	14	BT	6	Rodado	64.3
25		Muj3	7	AT	8	Rodado	36.36
26		Muj4	5	AT	6	Rodado	62.65
27	Parácuaro	Par1	7	BT	10	Rodado	55.3
28		Par2	10	BT	6	Rodado	60.8
29		Par3	3	BT	6	Rodado	48.6
30		Par4	7	AT	6	Rodado	32.5
31		Par5	8	AT	6	Rodado	62.5
32		Par6	20	AT	6	Micro	51.78
33		Tep1	5	BT	6	Micro	51.3
34	Tepalcatepec	Tep2	8	BT	6	Micro	42.3
35		Tep3	17	BT	8	Rodado	80
36		Tep4	5	BT	6	Micro	91.6
37		Tep5	22	BT	6	Micro	87.5
38		Tep6	8	BT	8	Micro	75
39		Tep7	28	AT	10	Rodado	62.5
40	Tepalcatepec	Tep8	10	AT	10	Micro	75
41		Tep9	5	AT	6	Micro	62.5
42		Tep10	30	AT	6	Micro	50

Cuadro 2. Continuación...

No	Municipio	Huerto	Sup. (ha)	Nivel de Tecnificación <sup>w</sup>	Edad (años)	Tipo de Riego <sup>x</sup>	Cronicidad <sup>y</sup>
<b>Colima</b>							
43	Armería	Arm1	2	BT	8	Rodado	75
44		Arm2	3	BT	8	Rodado	87.5
45		Arm3	3	BT	8	Micro	62.5
46		Arm4	12	AT	10	Micro	62.5
47		Arm5	30	AT	8	Micro	62.5
48		Arm6	40	AT	10	Micro	62.5
49	Tecomán	Tec1	30	BT	10	Micro	62.5
50		Tec2	30	BT	8	Rodado	62.5
51		Tec3	3	BT	6	Rodado	75
52		Tec4	10	BT	10	Micro	62.5
53		Tec5	15	AT	10	Micro	69.1
54		Tec6	10	AT	8	Micro	75
55		Tec7	8	AT	6	Micro	61.84
56		Tec8	10	AT	6	Micro	71.9
<b>Total (Promedio)</b>	<b>10</b>	<b>56</b>	<b>613</b>	<b>2</b>	<b>(7.3)</b>	<b>2</b>	<b>(57.3)</b>

<sup>w</sup>Nivel de Tecnificación: BT: Baja tecnificación; AT: Alta tecnificación. <sup>x</sup>Micro: riego por microaspersión. <sup>y</sup>Cronicidad de infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, estimada con el promedio de severidad de 100 árboles por huerto.

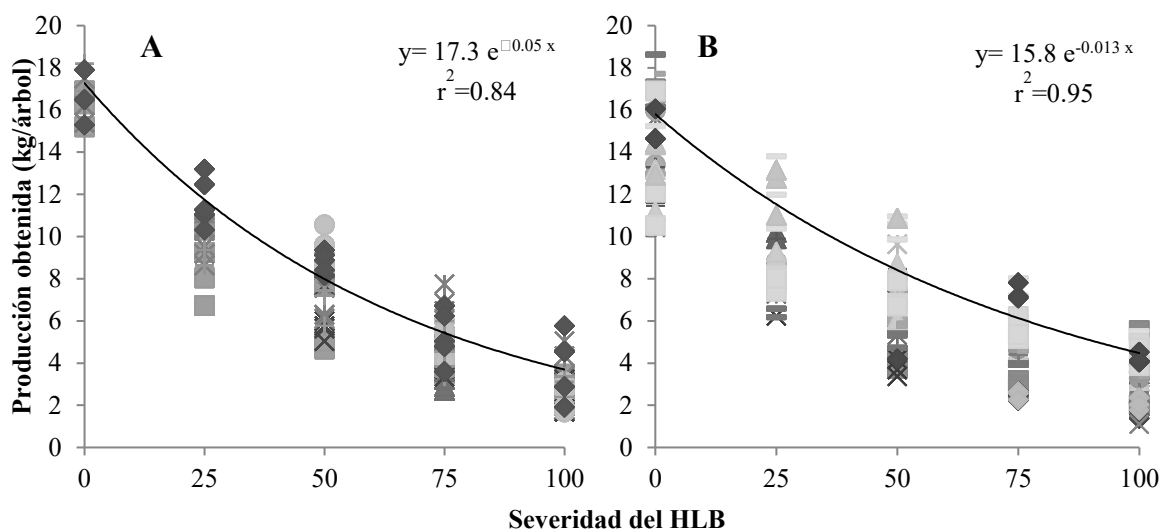


Figura 4. Relación entre la producción (kg) obtenida y la severidad del HLB (porcentaje de dosel con síntomas de esta enfermedad) en árboles de huertos con baja tecnificación (BT) en: Colima (A) y Michoacán (B), durante 2014 y 2015. Símbolos diferentes indican huertos diferentes. Las líneas y modelos representan el ajuste por regresión lineal simple por estado. Datos de huertos con AT no se ajustaron por no mostrar diferencias significativas.

con CLas y por la baja translocación al fruto (Chin *et al.*, 2014; Folimonova y Achor, 2010; Kim *et al.*, 2009).

**Efecto de la cronicidad regional de CLas.** CLas tuvo mayor endemicidad y cronicidad en Colima con 68 % ( $\pm 7.8$ ), es decir, con intensidad epidémica alta y homogénea, en comparación con Michoacán, donde fue del 53.7 % ( $\pm 18.8$ ) y con endemicidad restringida a los municipios de Tepalcatepec (67.7 %), Aguililla (65.2 %) y Buenavista (57.8 %). En Gabriel Zamora (43 %) y La Huacana (7.5 %) la cronicidad fue de baja intensidad y con presencia de focos de infección (Cuadro 2). Esto tuvo un efecto diferencial a nivel de parcela y municipio en función a la combinación de cronicidad y nivel tecnológico (Cuadro 2). Huertos con BT de algunos municipios de Michoacán como Tepalcatepec con 59.6 % (6.6 t ha<sup>-1</sup>) y Buenavista con 45.9 % (5.6 t ha<sup>-1</sup>) mostraron pérdidas similares a los municipios de Colima: Armería con 66.9 % (7.4 t ha<sup>-1</sup>) y Tecomán con 58.4 % (6.5 t ha<sup>-1</sup>); mientras que La Huacana y Gabriel Zamora, Michoacán, mostraron las menores pérdidas entre 12.6 y 16.7, (0.7 a 0.8 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente) (Cuadro 3), lo cual se asocia al efecto de cronicidad regional de CLas. La mayor pérdida productiva se encontró en Colima (Cuadro 3), lo cual se puede explicar por su mayor cronicidad de infección. Es decir, por el mayor tiempo de exposición de los árboles a una infección sistémica (y reinfecciones) de CLas en comparación con Michoacán (Figura 1B). Datos de plantas positivas a CLas en abril de 2010 para Colima y diciembre 2010 para Michoacán (SENASICA, 2015) tuvieron una incidencia de 3% ha<sup>-1</sup>: 7% ha<sup>-1</sup>. El muestreo regional de cronicidad de infección tuvo promedio del 68% y 53.7% en Colima y Michoacán, respectivamente (Cuadro 2). Un estudio previo de pérdidas productivas para *C. latifolia* en México no consideró la cronicidad regional de CLas debido a que se

realizó en el único huerto con presencia del HLB en Yucatán, con un periodo de infección por planta de hasta de 15 meses (Flores-Sánchez *et al.*, 2015). Este es considerado bajo para estimar el efecto de cronicidad en comparación con el tiempo de infección de CLas en Colima y Michoacán, de 4 y 5 años respectivamente, al momento del presente estudio.

La relación significativa entre la cronicidad de infección de CLas y la producción de limón Mexicano requirió la depuración gráfica por outliers (2%) para obtener los mejores ajustes del modelo ( $r^2 = 0.7$  a 0.84). La dificultad de establecer una relación cuantitativa entre el nivel de enfermedad y la producción en cítricos para HLB y CVC se reportó previamente (Bassanezi *et al.*, 2011; Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2012) y se debe principalmente a la alta variabilidad de la producción de árboles con el mismo nivel de enfermedad, lo que significa una variación temporal en el rendimiento y calidad de fruta a nivel de árbol (Ye *et al.*, 2008 a, b); por efectos de manejo agronómico y variabilidad varietal. Este trabajo, y el de Flores-Sánchez *et al.* (2015) intentó con éxito disminuir este tipo de variabilidad al aparear plantas sintomáticas y asintomáticas.

El manejo agronómico condicionó el efecto de la cronicidad de infección de CLas en las pérdidas productivas inducidas en limón Mexicano. Las prácticas agronómicas realizadas por los productores en huertos con AT compensan el efecto de CLas sobre la producción, sin inhibir su efecto, mientras que en huertos con BT la infección sistémica y crónica de CLas induce que los efectos fisiológicos y anatómicos, que se han reportado, sean de mayor magnitud y tengan mayor impacto en la producción; tales como la reducción de la tasa fotosintética, menor producción de azúcares y foto-asimilados, acumulación de almidón, taponamiento de los tubos cribosos con proteínas PP1 y PP2 y calosa, e hipertrofia e hiperplasia sobre los tejidos vascu-

**Cuadro 3. Pérdida productiva inducida por CLas, por municipio citrícola y por nivel de tecnificación de los huertos de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Single Christm.): baja tecnificación (BT) y alta tecnificación (AT), en los estados de Colima y Michoacán durante 2014 y 2015, respectivamente. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ).**

Estado/ Municipio	Nivel de tecnificación			
	BT <sup>w</sup> Porcentaje <sup>x</sup>	BT <sup>w</sup> t ha <sup>-1y</sup>	AT Porcentaje	AT t ha <sup>-1</sup>
<b>Colima</b>				
Armería	66.9 a	7.4	8.6c	1.0
Tecomán	58.4b	6.5	10.1bc	1.1
Promedio	62.7	7.0	9.4	1.0
<b>Michoacán</b>				
Tepalcatepec	59.6 b	6.6	11.3 b	1.2
Buenavista	45.9 c	5.6	4.3 de	0.5
Parácuaro	42.7 c	4.6	3.2 e	0.3
Aguililla	42.2 c	3.8	14.0 a	1.2
Múgica	41.9 c	2.3	5.7 d	0.3
Apatzingán	32.2 d	2.9	5.9 d	0.5
Gabriel Zamora	16.7 e	0.8	3.3 e	0.2
La Huacana	12.6 e	0.7	10.8 b	0.6
Promedio	36.7	3.4	7.3	0.6

<sup>w</sup>BT: Baja tecnificación, AT: Alta tecnificación; <sup>x</sup>Porcentaje de pérdida productiva estimada con la proporción de la producción obtenida en árboles con 100 % de cronicidad con relación a árboles sanos; <sup>y</sup>t ha<sup>-1</sup>: Pérdida productiva expresada en toneladas por hectárea estimada con la diferencia de la producción obtenida en una hectárea de árboles aparentemente sanos (0 % severidad) menos la producción estimada en árboles con 100% de cronicidad.

lares de los árboles infectados (Flores-Sánchez *et al.*, 2014; Hernández-Chan *et al.*, 2014; Chin *et al.*, 2014; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Folimonova y Achor, 2010; Kim *et al.*, 2009).

Estos resultados coinciden con otras investigaciones, las cuales indican que el manejo del HLB tiene un efecto positivo al reducir la pérdida productiva en naranja dulce en San Pablo, Brasil y California, E.U.A. No obstante, los costos de producción se incrementarían en tal medida que la ganancia neta sería igual que la obtenida bajo un escenario de cero manejo de esta enfermedad (Lopez y Durborow, 2014; Miranda *et al.*, 2012). Sin embargo, estos estudios se basan en pronósticos a 20 años del costo-beneficio de estrategias naciona-

les de contención del HLB y carecen de un enfoque epidemiológico de campo y del análisis puntual de las prácticas agronómicas discutidas en este estudio.

Estrategias específicas de manejo como nutrición (Bassanezi *et al.*, 2014; Gottwald *et al.*, 2012; Spann *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011), manejo hídrico (Campos-Herrera *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2013), uso de altas densidades de plantación (Stuchi y Girardi, 2010; Skaria y Hanagriff, 2008; Medina-Urrutia *et al.*, 2004), programas de renovación frecuente de plantaciones (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2012), y el control regional de DC (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Bassanezi *et al.*, 2013; Stansly *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2011;

Sandoval-Reyes *et al.*, 2013; López-Arroyo *et al.*, 2012), no son sostenibles para el manejo del HLB. Sin embargo, la adopción de estas estrategias mediante un programa de manejo integrado del cultivo permitiría la convivencia con la enfermedad aún en condiciones crónicas y endémicas. Estudios tecnológicos específicos son necesarios para optimizar la relación costo-beneficio en escenarios regionales.

## CONCLUSIONES

Este trabajo constituye la primera investigación que estima con un enfoque epidemiológico y regional las pérdidas inducidas por CLas en limón Mexicano. También es la primera evidencia de la implicación del manejo agronómico y la cronicidad de infección regional en el impacto productivo inducido por esta bacteria. Los resultados permiten postular que las regiones citrícolas bajo una condición crónica y endémica pueden mantener la sustentabilidad y rentabilidad productiva. Sin embargo, será necesario establecer el tiempo de reemplazo de huertos en función de rentabilidad. Se propone el uso de cronicidad de infección como estimador del tiempo de infección para patógenos sistémicos que afectan sostenidamente a cultivos perenes como frutales. El entendimiento de la cronicidad de un patógeno en función de la fisiología de la planta por efecto de manejo tecnológico, genética de planta, coinfecciones con otros patógenos sistémicos es fundamental para coadyuvar al manejo fitosanitario y realizar estudios epidemiológicos sobre una base racional biológica sistémica.

La pérdida productiva fue mayor en Colima que en Michoacán, debido a la mayor endemicidad, cronicidad y carga de inóculo. CLas también tuvo un efecto en la calidad de fruta. El efecto más intenso se encontró en frutos de árboles con severidad del

100. Se demostró que el manejo agronómico tiene mayor implicación en pérdidas productivas de limón Mexicano que la cronicidad de infección, bajo una condición endémica. En consecuencia, óptimas prácticas agronómicas (AT) pueden compensar el efecto de CLas en la producción. El efecto independiente de estrategias de manejo como nutrición, manejo hídrico, uso de altas densidades de plantación, programas de renovación frecuente de plantas, y el control regional del vector *Diaphorina citri*, tienen un efecto limitado en el manejo del HLB. Sin embargo, el empleo de estas estrategias mediante programas de manejo integrado permitiría optimizar el manejo de la enfermedad aún en condiciones crónicas de infección de CLas.

## Agradecimientos

Al CONACYT por becas otorgadas; A SENASICA-DGSV y CESAVEMICH por el financiamiento. Al equipo CP-LAN-REF por el soporte logístico y operativo. A técnicos del CESAVEMICH por el apoyo en muestreos de campo. A Pedro Robles García del SENASICA por su apoyo decidido a la investigación en HLB.

## LITERATURA CITADA

- Ahmad K, Sijam K, Hashim H, Rosli Z and Abdu A. 2011. Field assessment of calcium copper and zinc ions on plant recovery and disease severity following infection of Huanglongbing (HLB) disease. *African Journal of Microbiology Research* 5(28): 4967-4979. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.236>
- Alanis-Martínez EI, Cora-Valencia E, López-Arroyo JI y López-Buenfil A. 2015. Identificación del número variable de secuencias repetidas en TANDEM (VNTRs) de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33 (Suplemento): S197. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento332015.html>
- Ali MK, Narayan VKM and Tandom N. 2010. Diabetes & coronary heart disease: Current perspectives. *Indian Journal of Medical Research* 132: 584-597. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21150011/>
- Bagio TZ, Barreto TP, Canteri MG, Leite-Junior RP. 2014. Resistência sistêmica adquirida em citros para controle de Huanglongbing. *In: 47° Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. 62. Agosto. Londrina Paraná. Brasil.

- Bassanezi RB, Montesino LH and Stuchi ES. 2009. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 125: 565-572. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9506-3>
- Bassanezi RB, Montesino LH, Godoy GMC, Filho AB, Amorim L. 2011. Yield loss caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in Sao Paulo Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130(4): 577-586. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9779-1>
- Bassanezi RB, Montesino LH, Gimenes-Fernandes N, Yamamoto PT, Gottwald TR, Amorim L, Bergamin Filho A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0314-RE>
- Bassanezi RB, Montesino LH, Matos D, Quaggio JA, Boaretto RM and Bové JM. 2014. Three years of nutritional management on Huanglongbing epidemics and crop loss in sweet orange grove. *In: 47º Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. 494. Agosto de 2014. Londrina Paraná. Brasil.
- Belasque JJ, Filho BA, Bassanezi BR, Barbosa JC, Fernandes GN, Yamamoto TP, Lopes AS, Machado MA, Pereira Leite JR, Ayres JA and Massari CA. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology* 34(3): 137-145. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762009000300001>
- Ben-Shlomo Y and Kuh D. 2002. A life course approach to chronic disease epidemiology: conceptual models empirical challenges and interdisciplinary perspectives. *International Journal of Epidemiology* 31: 285-293. doi: 10.1146/annurev.publhealth.26.021304.144505
- Bové MJ. 2006. Huanglongbing: a destructive newly-emerging century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37. <http://www.jstor.org/stable/41998278>
- Campos-Herrera R, El-Borai FE, Ebert TE, Schumann A and Duncan LD. 2014. Management to control citrus greening alters the soil food web and severity of a pest-disease complex. *Biological Control* 76: 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.04.012>
- Chin EL, Mishchuk DO, Breksa AP and Slupsky CM. 2014. Metabolite signature of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection in two citrus varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 6585-6591. <https://doi.org/10.1021/jf5017434>
- Doyle JJ and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15. [https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S140531952012000800003&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S140531952012000800003&script=sci_abstract)
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Gutiérrez-Espinosa MA, Velázquez-Monreal JJ, Domínguez-Monge S, Bassanezi RB, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2017. Diffusion model for describing the regional spread of Huanglongbing from first-reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101:1129-1127. doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE.
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G, López-Arroyo JI y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210. [https://rmf.smf.org.mx/Contenido\\_Vol\\_33\\_2\\_2015.html](https://rmf.smf.org.mx/Contenido_Vol_33_2_2015.html)
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G, Velázquez-Monreal JJ y Manzanilla-Ramírez MA. 2014. Impacto productivo y fisiológico inducido por *Candidatus liberibacter asiaticus* en limón Mexicano a cuatro años de ingreso en Colima. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31 (Suplemento): S54. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento322014.html>
- Folimonova SY and SD Achor. 2010. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100: 9-49. <https://doi.org/10.1094/phyto-100-9-0949>
- Fritz MR. 2011. Defining the economic “tipping point” in the management of citrus greening: Follow the standard protocol or shift to an enhanced foliar nutritional program. *In: 18th International Farm Management Congress*. Pp: 159-165 Methven Canterbury New Zealand.
- Gonçalves FP, Stuchi ES, Lourenço SA, Hau B and Amorim L. 2012. Relationship between sweet orange yield and intensity of Citrus Variegated Chlorosis. *Plant pathology* 61: 641-647. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02557.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. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.004>
- Gottwald TR, da Graça JV and Bassanezi RB. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress Online*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2007-0906-01-RV>.
- Gottwald TR, Aubert B and Zhao XZ. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglungbing) epidemics in the People’s Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79:687-693. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1989Abstracts/Phyto79\\_687.htm](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1989Abstracts/Phyto79_687.htm)
- Hall DG, Richardson ML, Ammar ED and Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* vector of citrus Huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 146: 207-223. <https://doi.org/10.1111/eea.12025>



- Hernández-Chan EC, Mora-Aguilera G, Cano-Medrano R, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Velázquez-Monreal JJ, Flores-Sánchez JL y Domínguez-Monge S. 2014. Efecto Fisiológico y Nutricional del HLB en limón Mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: (Suplemento) S97. <https://rmf.smf.org.mx/suplemento/Suplemento312014.html>
- Kim JS, Sagaram US, Burns JK, Li JL and Wang N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50–57. <https://doi.org/10.1094/phyto-99-1-0050>
- Kwon YC, Ray RB and Ray R. 2014. Hepatitis C virus infection: establishment of chronicity and liver disease progression. *Experimental and Clinical Sciences* 13: 977-996. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26417315/>
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative Real-Time PCR for Detection and Identification of Candidatus Liberibacter Species Associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- López-Arroyo JI, Díaz-Martínez S, Torres-Acosta RI, Reyes-Rosas MA y Loera-Gallardo J. 2012. Nuevos registros de depredadores del psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama en el Noreste de México. P: 287 *In: Memorias del 3º Simposio nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing*. 9-11 Diciembre. Veracruz México.
- Lopez JA and Durborow SL. 2014. Huanglongbing and the California citrus industry: A cost comparison of do nothing vs. do something management practices. *The Texas Journal of Agriculture and Natural Resources* 27: 51-68. <https://txjanr.agintexas.org/index.php/txjanr/article/view/21>
- Manzanilla-Ramírez MA, Robles-Gonzalez MM, Velázquez-Monreal JJ, Orozco-Santos M y Carrillo-Medrano SH. 2012. Experiencias y perspectivas del Huanglongbing en Limón Mexicano. Pp: 406-414 *In Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing*. 9-11 Diciembre. Veracruz México.
- Medina-Urrutia VM, Becerra-Rodríguez S y Ordaz-Ordaz E. 2004. Crecimiento y rendimiento del limón Mexicano en altas densidades de plantación en el trópico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 10: 43-49. <http://www.revistas.chapingo.mx/horticultura/?section=articles&subsec=issues&numero=9&articulo=175>
- Miranda SHG, Adami ACO and Bassanezi RB. 2012. Economic impacts of Huanlongbing disease in São Paulo State. Poster prepared for presentation at the International Association of Agricultural Economists (IAAE) Triennial Conference Foz do Iguaçu Brazil August 18-24. Revisado en web el 10 de diciembre de 2015. [http://iaae.confex.com/data/abstract/iaae/iaae28/Paper\\_17434\\_abstract\\_11032\\_0.pdf](http://iaae.confex.com/data/abstract/iaae/iaae28/Paper_17434_abstract_11032_0.pdf)
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JI, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa A y Loeza-Kuk E. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(2): 108-119. [https://rmf.smf.org.mx/Vol\\_32\\_2\\_2014.html](https://rmf.smf.org.mx/Vol_32_2_2014.html)
- Nguyen VH, Tran MH, Nguyen TB, Bui NL and Nguyen MC. 2013. Results on attempts in management of HLB under small scale in Vietnam and initiation in screening for HLB tolerant from varieties/clones belonging to Rutaceae. Pp: 10-13 *In: IRCHLB III Proceedings*. February 4-8. Orlando Florida. <https://doi.org/10.5070/C411025272>
- Orduño-Cruz N, Guzmán-Franco AW, Rodríguez-Leyva E, Alatorre-Rosas R, González-Hernández H and Mora-Aguilera G. 2015a. *In vivo* selection of entomopathogenic fungal isolates for control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Biological Control* 90: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.011>
- Orduño-Cruz N, Guzmán-Franco AW, Rodríguez-Leyva E, Alatorre-Rosas R, González-Hernández H, Mora-Aguilera G and Rodríguez-Maciél JC. 2015b. *In vitro* selection of a fungal pathogen for use against *Diaphorina citri*. *Biological Control* 90: 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.05.010>
- Ozougwu JC, Obimba KC, Belonwu CD and Unakalamba CB. 2013. The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Journal of Physiology and Pathophysiology* 4(4): 46-57. <https://doi.org/10.5897/JPAP2013.0001>
- Robles-González MM, Medina-Urrutia VM y Manzanilla-Ramírez MA. 2014. Fenología y Poda. Pp: 135-154 *In Orozco-Santos M, Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA y Bermúdez-Guzmán M. (eds.). El limón Mexicano (Citrus aurantifolia)*. SAGARPA INIFAP CIRPAC. Colima México.
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI y Flores-Virgen R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19: 15-31. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- Rogers ME, Stansly PA and Stelinski LL. 2011. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a Psyllid Management Plan. University of Florida IFAS Extension Gainesville FL. 2 p. <https://crec.ifas.ufl.edu/extension/chmas/>
- Sandoval-Reyes F, Arriaga-Gaona ML, Hernández-Limón L, Hernández-Romero I, Guzmán-González FI. 2013. Actividad biológica en campo del extracto etanólico de *Melia azedarach* *Psidium guajava* *Datura stramonium* *Piper auritum* y *Azadirachta indica* a juss sobre la *Diaphorina citri*. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 9: 22-29. <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/208>

- SAS Institute 2008. Guía de procedimientos SAS Versión 9. SAS Institute Cary NC USA.
- SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe Julio 2015. Revisado el 27 de julio 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Cierre de la producción agrícola por estados. Revisado el 11 de diciembre de 2015. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Skaria M and Hanagriff RD. 2008. Micro-budded High Density Citrus Planting: Is There an Opportunity for HLB Control and Financial Returns?. IRCHLB Proceedings. P 365-368. <https://www.scribd.com/document/150808982/Micro-Budded-High-Density-Citrus-Planting>
- Spann TM, Schumann AW, Rouse B, Ebel B. 2011. Foliar nutrition for HLB. Citrus Industry. (June) Pp: 6-10. [https://crec.ifas.ufl.edu/media/crecifasufledu/new-site/documents/research/Foliar-nutrition-for-HLB-\(June\)-.pdf](https://crec.ifas.ufl.edu/media/crecifasufledu/new-site/documents/research/Foliar-nutrition-for-HLB-(June)-.pdf)
- Stansly PA, Arevalo HA, Qureshi JA, Jones MM, Hendricks K, Roberts PD and Roka FM. 2014. Vector control and foliar nutrition to maintain economic sustainability of bearing citrus in Florida groves affected by Huanglongbing. *Pest Management Science* 70: 415-426. <https://doi.org/10.1002/ps.3577>
- Stuchi ES, Reiff ET, Sempionato OR, Parolin LG and Toledo DA. 2013. Evidence that 'flying dragon' trifoliolate orange delays HLB symptom expression for four sweet orange cultivars Tahiti lime and Okitsu mandarin. Pp: 10-18 *In: IRCHLB III Proceedings*. February 4-8. Orlando Florida. [https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/1\\_Stuchi\\_14.pdf](https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/1_Stuchi_14.pdf)
- Stuchi ES and Girardi EA. 2010. Use of horticultural practices in citriculture to survive Huanglongbing. *Documentos 189/Embrapa Cassava & Fruits* ISSN 1809-4996. 67 p. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.4159.8802>
- Xia Y, Ouyang G, Sequeira RA, Takeuchi Y, Baez I and Chen J. 2011. A review of Huanglongbing (Citrus Greening) management in citrus using nutritional approaches in China. *Plant Health Progress*. <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-1003-01-RV>.
- Xu M, Liang M, Chen J, Xia Y, Zheng Z, Zhu Q and Deng X. 2013. Preliminary research on soil conditioner mediated citrus Huanglongbing mitigation in the field in Guangdong China. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0238-z>.
- Ye X, Sakai K, Sasao A and Asada S. 2008a. Potential of airborne hyperspectral imagery to estimate fruit yield in citrus. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 90: 132-144. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2007.09.002>
- Ye X, Sakai K, Asada S and Sasao A. 2008b. Application of narrow-band TBVI in estimating fruit yield in citrus. *Biosystems Engineering* 99: 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.09.016>

# Mechanisms involved in the pathogenesis of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and possible molecular bases of tolerance in citrus

## Mecanismos involucrados en la patogénesis de *Candidatus Liberibacter asiaticus* y posibles bases moleculares de la tolerancia en cítricos

Luis A. Pérez-Zarate, Juan A. Villanueva-Jiménez, Francisco Osorio-Acosta, Eliseo García-Pérez, Laboratorio de Entomología-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. Km. 88.5 Carretera Fed. Xalapa-Veracruz. Manlio F. Altamirano. Veracruz, C. P. 91690, México; Felipe Roberto Flores-de la Rosa, Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Ixtacuaco. Km. 4.5 carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, Tlapacoyan, Veracruz, CP. 93650, México; Aida Martínez-Hernández\*, Laboratorio de Agrogenómica y Fenotipificación, Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, Carretera Haltún-Edzná km 17.5, Sihochac, Champotón, Campeche, CP.24450, México.

\*Autor para correspondencia: aida.martinez@colpos.mx

Received: August 28, 2022.

Accepted: October 25, 2022.

Pérez-Zarate LA, Villanueva-Jiménez JA, Osorio-Acosta F, García-Pérez E, Flores-de la Rosa FR and Martínez-Hernández A. 2022. Mechanisms involved in the pathogenesis of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and possible molecular bases of tolerance in citrus. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 86-124.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-8>

**Resumen.** El Huanglongbing (HLB) es una enfermedad considerada como la más destructiva para los cítricos en el mundo, es causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) y diseminada por el vector *Diaphorina citri*. El HLB ha generado cuantiosas pérdidas económicas en la citricultura mundial. Todas las variedades comerciales de cítricos son susceptibles a esta enfermedad. La natura-

leza de CLAs como parásito intra celular estricto limitado al floema dificulta el estudio fitopatológico de la enfermedad. Las herramientas “ómicas”, que permiten aplicar análisis comparativos con enfoque masivos, han resultado útiles para describir la interacción entre el agente patogénico y diferentes especies de cítricos, generando conocimiento sobre las bases moleculares de la patogenicidad de CLAs y de las respuestas de los hospederos ante la infección. Sin embargo, muchos procesos inmersos en la compleja interacción CLAs-cítricos aún no son del todo comprendidos. En la presente revisión se resumen algunos de los principales hallazgos en la última década relacionados con los posibles mecanismos de patogenicidad de CLAs a nivel molecular, así como de las respuestas transcripcionales y metabólicas inducidas en cítricos tolerantes o

susceptibles, ante la infección. Este conocimiento es necesario para el diseño e implementación de nuevas estrategias para el manejo sustentable de la enfermedad.

**Palabras clave:** Huanglongbing, respuesta inmune, ómicas, fitohormonas, susceptibilidad, tolerancia,

Los cítricos (género: *Citrus*, familia: *Rutaceae*, subfamilia: *Aurantoideae*) son cultivos frutales de importancia económica en el mundo; su desarrollo óptimo se da entre los 35 y 40° de latitud norte y sur, es decir, en áreas tropicales y subtropicales (Gottwald, 2010; Liu *et al.*, 2012; Nehela *et al.*, 2018). La producción de cítricos es afectada por la incidencia de una gran variedad de plagas y enfermedades, de las cuales destaca el Huanglongbing (HLB), enverdecimiento o dragón amarillo de los cítricos, catalogada como la enfermedad más destructiva de estos cultivos a nivel global ya que causa anualmente pérdidas por billones de dólares a nivel mundial (Timmer *et al.*, 2000; Singerman y Rogers, 2020).

Las plantas que contraen esta enfermedad desarrollan una serie de síntomas característicos: brotes amarillos en sectores del dosel, adelgazamiento de las ramas afectadas, pocos frutos, moteado asimétrico con islas amarillas y acumulación de almidón en hojas las cuales tienden a ser más gruesas, corchosas, agrandadas, coriáceas y con venas amarillas, síntoma similar a deficiencias nutricionales como carencia de zinc. Los frutos presentan coloración desigual y reducción de tamaño, maduración inversa iniciando en el tallo, deformación, caída prematura y aborto de semillas. La cobertura del sistema radicular también se afecta, disminuyendo las raíces secundarias, lo que limita la toma de minerales del suelo (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012;

Robles-González *et al.*, 2013; da Graça *et al.*, 2016; Nehela y Killiny, 2020b).

El HLB afecta las plantaciones comerciales al incrementar la tasa de mortalidad de árboles, reducir el rendimiento y calidad de frutos, e incrementar los costos de producción (Farnsworth *et al.*, 2014). El rendimiento puede reducirse desde un 30% hasta pérdida total, según el nivel de intensidad de la enfermedad; los frutos son pequeños, ácidos y el jugo es bajo en contenido de grados brix, lo que dificulta colocarlos en el mercado (Bassanezi *et al.*, 2009). En Florida se reportó un 23% de reducción en la producción de cítricos del año 2006 al 2011, con más de 1.7 mil millones de dólares y 8000 empleos directos e indirectos perdidos (Hodges y Spreen, 2012). El número de citricultores en Florida disminuyó de 7389 en el año 2002 a 2775 en 2017; además, las plantas procesadoras de jugo se redujeron de 41 a 14 y las empacadoras de 79 a 26 en el mismo periodo de tiempo (Singerman y Rogers, 2020).

En México son pocos los reportes del impacto del HLB. El estado de Colima ha sido de los más afectados por HLB, donde se han replantado casi 5000 ha dañadas, particularmente de limón mexicano, con una reducción de más de 84 mil t de producción y una pérdida económica neta mayor a 300 millones de pesos (Granados-Ramírez y Hernández-Hernández, 2018). En Yucatán, Flores-Sánchez *et al.* (2015) señalan que árboles enfermos sintomáticos mostraron una reducción en el peso de fruto del 17.3% y de volumen de jugo del 18.6%, con lo cual se estimó una pérdida de 2.4 t ha<sup>-1</sup>. Salcedo *et al.* (2011) y Hernández-Hernández *et al.* (2019) sugieren que, ante un escenario de alto impacto del HLB, se podrían perder más de 19 millones de empleos en todo el país y la pérdida en la producción de naranja llegaría a 1.8 millones de t.

Entre las estrategias para el manejo del HLB, se encuentran desde los esfuerzos iniciales para frenar el avance de la enfermedad en las plantacio-

nes mediante la eliminación de plantas enfermas (Martini *et al.*, 2015) y el uso de planta certificada (Bové, 2012), así como aplicaciones foliares de insecticidas (Boina y Bloomquist, 2015) o el control biológico del vector (Álvarez *et al.*, 2016); hasta tecnologías en desarrollo como la termoterapia (Hoffman *et al.*, 2013) o la generación de plantas transgénicas resistentes (Dutt *et al.*, 2015; Ventura-Medina *et al.*, 2019; Soares *et al.*, 2020). Ante el panorama de que la enfermedad ya se encuentra establecida en la mayoría de las plantaciones comerciales en el mundo, actualmente se evalúan estrategias que permitan prolongar la vida productiva de los árboles infectados que incluyen manejo agronómico como programas de fertilización complementarios (Xia *et al.*, 2011; Uthman *et al.*, 2020; Atta *et al.*, 2021; Hernández-Morales *et al.*, 2021), el uso de inductores de resistencia (Hu *et al.*, 2018; Trinidad-Cruz *et al.*, 2019; Flores-de la Rosa *et al.*, 2021), péptidos antimicrobianos (SAMPs) (Huang *et al.*, 2021), antibióticos (Killiny *et al.*, 2020) o fitohormonas (Tang *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2022). También se considera que tecnologías de frontera como la edición genética mediante CRISPR puede ser una alternativa viable en el manejo del HLB (Song *et al.*, 2017).

Sin embargo, el desarrollo de estrategias efectivas y sustentables que disminuyan el impacto del HLB requiere comprender a fondo los mecanismos involucrados en la interacción CLas-cítricos, identificar los factores genéticos y moleculares que participan en el proceso de patogénesis de CLas y en las respuestas de defensa de las plantas, así como de los determinantes de tolerancia en cítricos. Con el uso de las denominadas herramientas *ómicas*, en la última década se han identificado posibles factores de virulencia de CLas y algunas de las bases moleculares potencialmente involucradas en el proceso de infección y patogénesis (Dalio *et al.*, 2017; Coyle *et al.*, 2018). También se han descrito

respuestas transcriptómicas, proteómicas y metabólicas expresadas diferencialmente en plantas infectadas de variedades tolerantes y susceptibles, con el fin de identificar mecanismos involucrados en la tolerancia (da Graça *et al.*, 2016; Dalio *et al.*, 2017; Coyle *et al.*, 2018; Curtolo *et al.*, 2020a; Yao *et al.*, 2020).

En el presente trabajo se revisa el estado del arte sobre los mecanismos moleculares y procesos metabólicos asociados a la interacción CLas-cítricos; en particular con la variante asiática debido a que es la especie predominante en México y el mundo; haciendo énfasis en elementos sobre los cuáles podrán desarrollarse futuras estrategias para el manejo sustentable de la enfermedad como: el reconocimiento molecular planta-patógeno, la diferencia en las respuestas transcriptómicas/proteómicas/metabólicas entre variedades susceptibles y tolerantes, la modulación de las respuestas de defensa mediante hormonas, así como la relación entre los cambios metabólicos/fisiológicos en las plantas y el desarrollo de síntomas en variedades susceptibles. El acceso a esta información de forma comprensible no solo para la comunidad científica, sino también para funcionarios de las dependencias de gobierno, técnicos, productores y sociedad en general, es necesario para que las novedosas tecnologías en desarrollo sean adoptadas en campo.

**Al agente causal de HLB y su transmisión.** El HLB es causado por bacterias gram-negativas del género *Liberibacter*, patógenos obligados que colonizan células del floema de las plantas infectadas y no pueden ser aisladas en medios artificiales con técnicas microbiológicas tradicionales, por lo que permanece con el estatus de “*Candidatus*” (Fleites *et al.*, 2014; Merfa *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha logrado obtener cultivos axénicos mediante el uso de biorreactores (Ha *et al.*, 2019). Con base en la distribución geográfica y en características de la

secuencia del gen 16S del rADN (ADN ribosomal), se han propuesto cuatro especies asociadas a la enfermedad del HLB: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. americanus* (CLam), *Ca. L. africanus* (CLaf) y *Ca. L. caribbeanus* (CLca) (Jagoueix *et al.*, 1994; Thapa *et al.*, 2020). La transmisión de la enfermedad ocurre por el uso de injertos infectados y, en mayor medida, por insectos vectores como *Trioza erythrae* (Del Guercio; Hemiptera: Triozidae) en el continente africano, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en los continentes asiático y americano (Bové, 2006), y *Cacopsylla citrisuga* en China (Cen *et al.*, 2012).

El proceso de transmisión del HLB por *D. citri* inicia cuando el vector adquiere la bacteria CLas al alimentarse de la savia de un árbol enfermo; las células bacterianas pasan del intestino a la hemolinfa, luego a las glándulas salivales donde permanece en estado de latencia dentro del vector (3-20 días) y se reproduce antes de transmitirse a nuevas plantas (Ammar *et al.*, 2016). Las células bacterianas se propagan a la mayoría de los órganos del insecto, multiplicándose en vacuolas asociadas al retículo endoplasmático (Ghanim *et al.*, 2017). Los insectos pasan la bacteria de árboles enfermos a sanos en alimentaciones posteriores (Hall *et al.*, 2013). Pelz-Stelinski y Killiny (2016) indican que la transmisión de CLas a una planta sana puede ocurrir incluso después de 30 min de haberse alimentado de un árbol enfermo. Cuando la bacteria es transmitida a nueva planta a través del estilete del insecto hacia el floema de brotes tiernos, se distribuye por el tejido vascular hacia toda la planta de forma heterogénea, incluyendo hojas, tallos, raíces, tejidos florales, frutos y semillas; aunque no hay reportes de transmisión vertical de semilla a plántulas (Tatineni *et al.*, 2008; Bagio *et al.*, 2020). Sin embargo, la colonización de CLas está limitada al floema. La aparición de síntomas es un proceso lento, se requieren entre 6 y 9 meses entre la inoculación

experimental mediante injerto o infección inducida mediante vectores y la aparición de los primeros síntomas (Folimonova *et al.*, 2010).

El desarrollo del HLB en una planta y su epidemiología, dependen de la convergencia espacio temporal de un hospedero susceptible, el patógeno virulento, el vector y condiciones ambientales favorables (Francl, 2001). La densidad del hospedero, la densidad del vector y la dominancia del viento son fundamentales para la dispersión del inóculo primario; pero también lo son las actividades antropogénicas (Flores-Sánchez *et al.*, 2017). Por ello consideramos que en el tetraedro de la enfermedad descrito por Dik y Albajes (1999), se debe incluir al productor o controlador del agroecosistema (Figura 1), ya que es el responsable del uso oportuno de las estrategias técnicas disponibles para evitar la dispersión y reducir el impacto de la enfermedad (Pérez-Zarate *et al.*, 2016; Pérez-Zarate *et al.*, 2020).

Aún no se conocen los mecanismos de patogénesis de CLas es decir, cómo el patógeno causa los daños observados en las plantas susceptibles. Una visión general de algunos de los posibles eventos bioquímicos y moleculares subsecuentes a la transmisión de CLas, se esquematizan en la Figura 1: Las plantas reconocen la presencia de la bacteria detectando moléculas secretadas por el patógeno (PAMPs y/o efectores), las cuales son reconocidas por las plantas mediante receptores transmembranales (PRRs) y/o citoplásmicos (NLRs). La percepción de las bacterias por la planta conduce a la activación de cascadas de señalización interna en las que pueden participar segundos mensajeros como el calcio ( $Ca^{2+}$ ), flujo electrolítico a través de la membrana plasmática, la producción de especies reactivas a oxígeno (ROS) y óxido nítrico, conduciendo a la activación de proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPKs) (Coyle *et al.*, 2018). Las cascadas de señalización hacen blanco sobre factores transcripcionales (TFs) que modulan la expre-

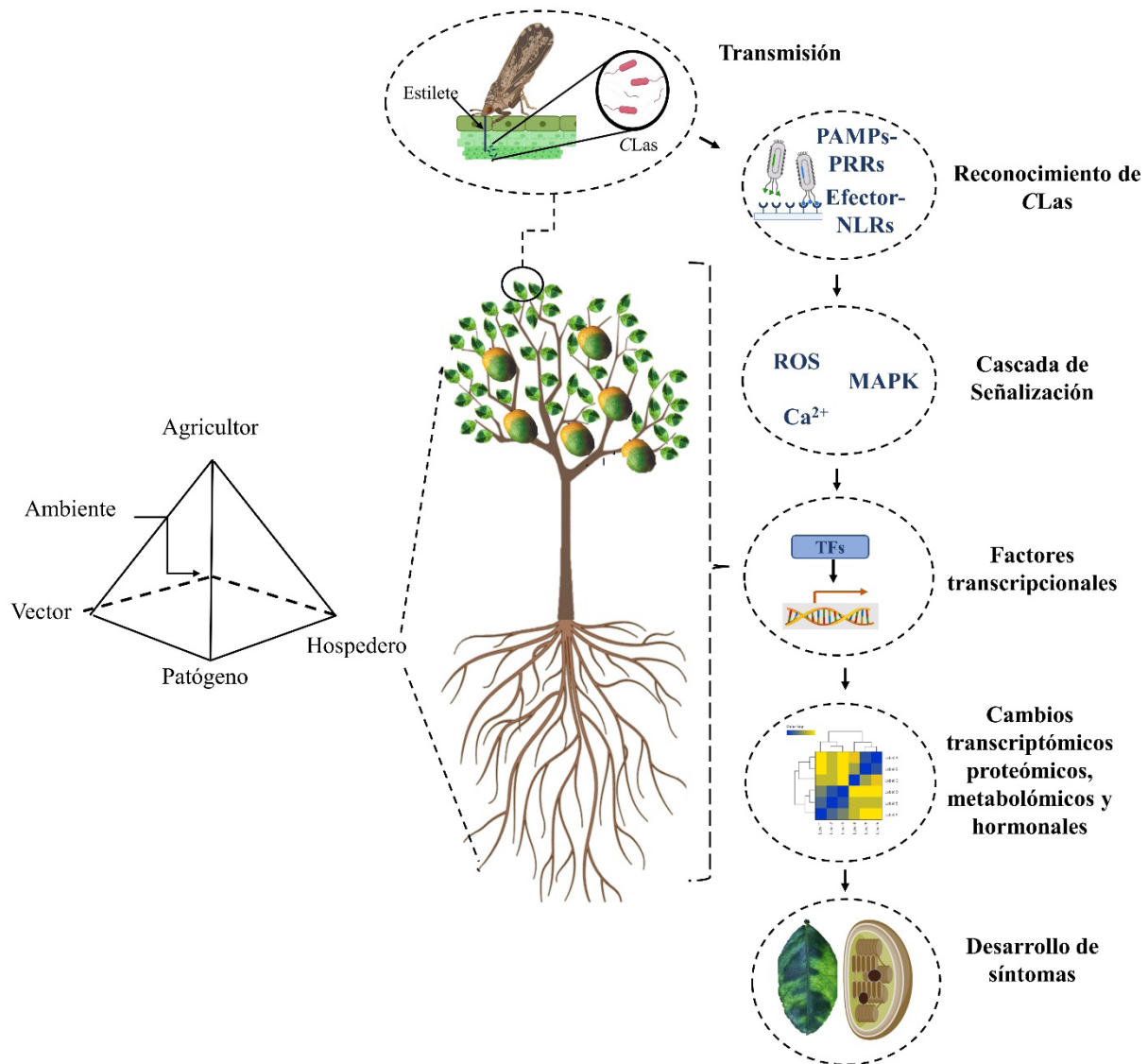


Figura 1. Componentes del tetraedro de la enfermedad del HLB, así como eventos consecutivos desde la transmisión y percepción de la enfermedad, hasta procesos intracelulares de señalización, respuesta génica y desarrollo eventual de síntomas. PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos, PRRs: Receptores de reconocimiento de PAMPs, NLRs: Receptores con dominio de unión a nucleótidos con repetidos ricos en leucina, ROS: Especies reactivas a oxígeno, MAPK: Proteínas cinasa activadas por mitógenos, Ca<sup>2+</sup>: Iones de calcio, TFs: Factores transcripcionales.

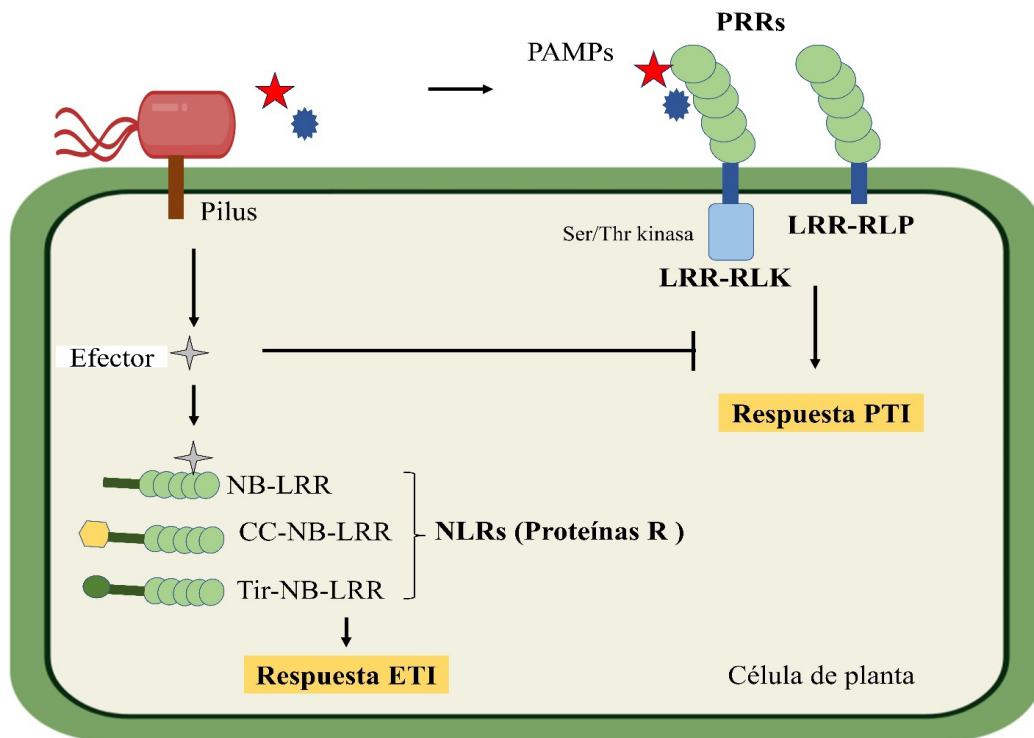
sión de múltiples genes, entre ellos los que participan en los procesos de defensa e inmunidad, local y sistémica. Los cambios transcripcionales se manifiestan también en cambios metabólicos y fisiológicos que incluyen la participación de fitohormonas y

que, eventualmente, derivan en el desarrollo de los síntomas característicos de la enfermedad.

**La inmunidad innata en plantas: PTI, ETI y SAR.** Para comprender mejor los eventos mole-

culares y metabólicos que se han propuesto como posiblemente implicados en la interacción CLas-cítricos, resumimos primero generalidades de las respuestas de defensa descritas en relaciones planta-patógeno modelo. La Figura 2 muestra que el sistema inmune innato de las plantas actúa de dos formas: a) inicia con el reconocimiento de los patógenos a través de *receptores de reconocimiento de patrones* de patógenos o PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) localizados en la superficie de la membrana celular, los cuales detectan moléculas producidas por los microorganismos, conocidos como *patrones moleculares* asociados a micror-

ganismos o a *patógenos* (MAMPs o PAMPs de *microbe- or pathogen-associated molecular patterns*). Los PRRs, al percibir al patógeno, disparan la denominada *Inmunidad Provocada por PAMPs* o PTI (*PAMP-Triggered Immunity*); o b) los receptores intracelulares denominados *Receptores con dominio de unión a Nucleótidos mediante el dominio con repetidos ricos en Leucina* o NLRs (*Nucleotide-binding domain Leucine-rich repeat containing Receptors*), detectan moléculas del patógeno denominadas *efectores*, que han penetrado en la célula. Estos factores de virulencia o efectores modifican de forma directa o indirecta los procesos de la plan-



**Figura 2.** Vías de activación del sistema inmune de plantas ante el ataque de patógenos, estructura de los receptores transmembranales para el reconocimiento de patógenos y receptores intracelulares para el reconocimiento de efectores en cítricos. Adaptado de Dodds y Rathjen (2010) y Dalio *et al.* (2017). ETI: Inmunidad mediada por efectores, NLRs: Receptores con dominio de unión a nucleótidos con repetidos ricos en leucina, Tir: Dominio homólogo a receptores de Toll o interleucina-1, CC: Hélice superenrollada, LRR: Repeticiones ricas en leucina, NB: Sitio de unión a nucleótido, PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos, PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones, PTI: Inmunidad desencadenada por PAMPs, RLK: Cinasa tipo Receptor, RLP: Proteína tipo Receptor, Ser/Thr kinasa: Serina/Treonina cinasa.



ta para mejorar sus probabilidades de supervivencia. La detección de efectores por los NLRs dispara la denominada *Inmunidad Provocada por Efectores* o ETI (*Effector-Triggered Immunity*).

En 2006, Jones y Dangl propusieron un modelo de 4 fases secuenciales en “zig-zag” en el cuál: 1) la respuesta innata inicial PTI, inducida por PAMPs, se manifiesta por cascadas de señalización, inducción transcripcional de genes en respuesta a patógenos, producción ROS y reforzamiento de la pared celular en los sitios de infección, todo lo cual es parte de la primera barrera de inmunidad y frena la colonización de nuevos tejidos. 2) Para romper la PTI y colonizar al hospedero, los patógenos virulentos exitosos utilizan efectores de patogenicidad que pueden interferir con la PTI, impidiendo su activación o inhibiendo sus mecanismos, dando lugar a una *Susceptibilidad Provocada por Efectores* o ETS (*Effector Triggered Susceptibility*), lo que lleva al desarrollo de la enfermedad en la planta. Sin embargo, 3) si algún receptor intracelular de la planta tipo NLR reconoce y neutraliza algún efector del patógeno, se dispara la ETI a través de la reactivación de cascadas de señalización y la eventual expresión de genes de defensa, por ello se denomina al receptor como proteína de resistencia (R). La ETI es una respuesta inmune similar a la PTI, pero más rápida e intensa, que conduce a la resistencia a la enfermedad y, usualmente, a la respuesta de hipersensibilidad (HR) con muerte celular en el sitio de infección (Jones y Dangl, 2006). Esta interacción específica en la cual un gen de resistencia de la planta reconoce de manera específica a un gen complementario de virulencia del patógeno (Durrant y Dong, 2004; Kaloshian, 2004) disparando mecanismos de apoptosis (antes denominada hipótesis gen x gen) deriva eventualmente en una fase 4) en la que el patógeno, por selección natural, elimina o diversifica el efector reconocido y/o adquiere factores de virulencia adicionales que

le permiten nuevamente evadir la respuesta inmune de la planta, la cual eventualmente coevoluciona mediante la selección de nuevas proteínas R, las cuáles no siempre son receptores y que nuevamente disparan la ETI.

La hipótesis de la resistencia gen por gen (Flor, 1971), actualmente incluida en la ETI, plantea que las plantas hospederas contienen genes de resistencia (R) dominantes, muy conservados en el reino vegetal, codificantes de proteínas que reconocen específicamente, directa o indirectamente, productos complementarios de genes de patógenos denominados de avirulencia (avr). Esta interacción conduce localmente a la HR y posteriormente a la activación de vías de señalización que culminan con la inducción de una resistencia sistémica adquirida SAR (*Systemic acquired resistance*). La SAR es una respuesta de inmunidad innata que protege a la distancia a partes de la planta no infectadas, es duradera en el tiempo y efectiva contra una amplia diversidad de patógenos después de una infección local inicial dada por algún patógeno (Thilmony *et al.*, 1995; Fu y Dong, 2013). Las plantas con SAR están preparadas para dar una respuesta de defensa más rápida y efectiva si un patógeno ataca por segunda vez. Esta respuesta inmune depende de señales sistémicas móviles, de naturaleza posiblemente lipídica, que transmiten a la distancia el mensaje de que la planta está siendo invadida por un posible patógeno (Durrant y Dong, 2004). La ISR (*Induced systemic resistance*) es una respuesta similar a la SAR, pero inducida por microorganismos no patógenos que forman parte de la microbiota asociada a las plantas. La PTI y la ETI inducen SAR, por lo que se considera una respuesta secundaria de resistencia inducida después de la necrosis asociada a una respuesta de hipersensibilidad. La resistencia sistémica puede ser elicitada por sustancias que mimeticen la presencia de los microorganismos inductores o a la señal móvil. La SAR se caracteriza

por la acumulación de ácido salicílico (SA), su derivado metilado MeSA, así como de genes codificantes de proteínas PR relacionadas a patogénesis (*pathogenesis-related proteins*), las cuales tienen actividad antimicrobiana, como quitinasas o glucanasas. La expresión de PRs es regulada por NPR1 o no-expresor de proteínas PR (nonexpresser of pathogenesis-related protein), el cuál es un factor clave que pasa a su forma activa por interacción con SA en el citoplasma. El NPR1 activo entra al núcleo para interactuar con factores transcripcionales que activan la transcripción de genes PR (Pietterse *et al.*, 2014).

Los PAMPs son moléculas altamente conservadas entre los microorganismos, indispensables para sus funciones, que son secretadas al espacio extracelular y cuyos epítomos son detectados por las plantas como moléculas ajenas a ellas. Ejemplos de PAMPs son los lipopolisacáridos (LPS) (He *et al.*, 2007) como el lípido A de bacterias; oligosacáridos de base estructural antigénicas o los peptidoglicanos de bacterias Gram positivas (Schwessinger y Zipfel, 2008). El PAMP mejor caracterizado que dispara PTI es la flagelina, proteína flagelar encargada de la motilidad cuyo epítomo de 22 aminoácidos en el dominio N-terminal (flg22) es altamente conservado (Schwessinger y Zipfel, 2008).

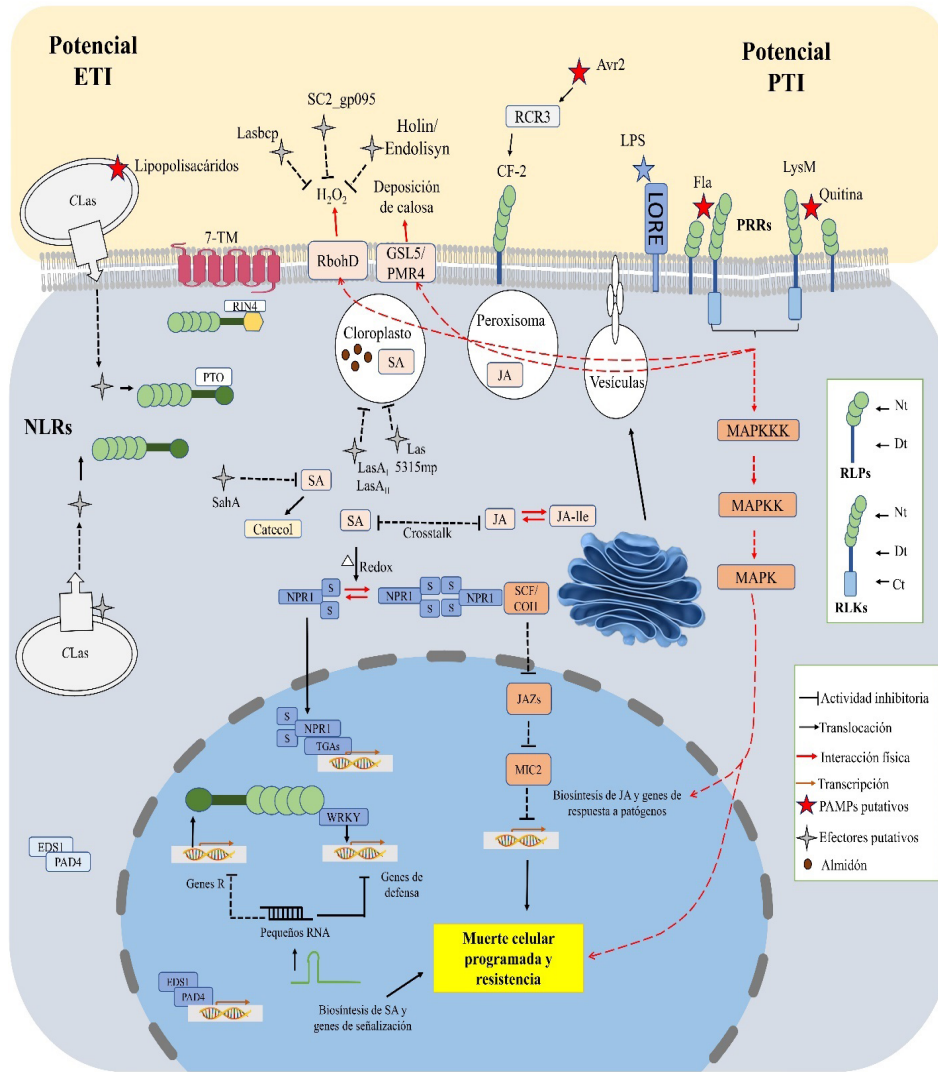
Respecto a los efectores o factores de virulencia de los patógenos exitosos que suprimen la PTI, mimetizando o inhibiendo las funciones celulares, se incluyen las fitotoxinas, polisacáridos extracelulares y diversas proteínas secretadas mediante el sistema de secreción tipo III TTSS o T3SS (*type III secretion system*) (Jones y Dangl, 2006; He *et al.*, 2007).

Por otra parte, las células vegetales tienen receptores para percibir diversas señales ambientales, incluidas las de plagas y patógenos. Las proteínas receptoras PRR localizadas en la superficie de la membrana citoplásmica detectan a los PAMPs (Fi-

gura 2) (Jones y Dangl, 2006). Albert *et al.* (2020) clasifican a los PRR como receptores cinasas (RLKs) o proteínas receptoras (RLPs), ambas contienen ectodominios con capacidad de unión a ligandos (Figura 3). Los ectodominios son dominios extracelulares ubicados fuera de la célula para entrar en contacto con patógenos o efectores de ellos, lo cual conduce a la transducción de señales hacia el interior celular (Restrepo-Montoya *et al.*, 2020). La estructura de los RLKs comprende un dominio extracelular N-terminal, con una región transmembranal y un dominio intracelular C-terminal con actividad de cinasa (Shiu y Bleeker, 2001; Dalio *et al.*, 2017). Los RLPs tienen un dominio transmembranal y un dominio extracelular N-terminal, pero carecen del dominio cinasa intracelular (Shiu y Bleeker, 2001).

En cuanto a los receptores NLR que detectan efectores del patógeno, estos contienen un dominio N terminal variable, un sitio de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio con repetidos ricos en leucina (LRR) variable en el número de repeticiones y composición (Figura 2). El extremo N terminal se encarga de la interacción con complejos de señalización, el dominio NBS funciona como ATPasa y regula la oligomerización, mientras que el dominio LRR participa en la interacción proteína-proteína y el reconocimiento de efectores (Alder *et al.*, 2005). El N-terminal de los NLRs puede como alternativas presentar el dominio Toll/interleucina-1 (TIR) o el CC (*Coiled-coil*).

**La respuesta inmune en cítricos ante HLB.** En plantas de variedades susceptibles como *Citrus sinensis* (naranja dulce) se ha descrito que, ante la infección con CLAs, hay sobreexpresión de genes de defensa como la calosa sintasa (*Cscals*), lo cual conduce a la deposición de calosa y a la muerte celular programada en el sitio de la infección, por efecto del daño oxidativo ocasionado por las ROS



**Figura 3.** Modelo de la respuesta de inmunidad en cítricos y la participación de los posibles efectores de *CLas*. Dado que los efectores son propuestas aún no demostradas, se observan en color gris como en el diagrama original. Adaptado de Panstruga *et al.* (2009) y da Graça *et al.* (2016). AVR2: Efectore de avirulencia 2, CF-2: Receptor de tomate homólogo al gen de resistencia de *Cladosporium fulvum*, Ct: Extremo C terminal, Dt: Dominio transmembranal, EDS1/PAD4: Dímero de la proteína que incrementa la susceptibilidad a enfermedad y su coregulador deficiente a fitoalexina, ETI: Inmunidad mediada por efectores, Flaga: Flagelina, GSL5/PMR4: Glucano sintasa like 5 (calosa sintasa)/resistente al moho polvoriento 4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno, JA: Ácido jasmónico, JA-Ile: Jasmonil-isoleucina, JAZs: Dominio ZIM de jasmonato, LPS: Lipopolisacáridos, LysM: Motivos de lisina, MAPK: Proteínas cinasa activadas por mitógenos, MIC2: Factor transcripcional tipo bHLH, NLRs: Receptores con dominio de unión a nucleótidos con repetidos ricos en leucina, NPR: Gen supresor de patogénesis, Nt: Extremo N terminal, PRRs: Receptores de reconocimiento de patógenos, PTI: Inmunidad desencadenada por PAMPs, PTO: Serina/treonina cinasa que confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* pv tomato, RbohD: Proteína D homóloga a oxidasa del burst respiratorio, RCR3: Cisteína-proteasa extracelular de tomate homóloga a las Cys-proteasas similares a papaína, RIN4: Proteína que interactúa con RPM1, RLK: Receptor similar a cinasa, SA: Ácido salicílico, SahA: Efectore salicilato hidroxilasa, SCF/COI1: SCF/COI1 ubiquitin ligasa, TGAs: Factores transcripcionales tipo bZIP, WRKY: Factores transcripcionales tipo WRKY, 7-TM: Receptores con 7 dominios transmembranales.

(Pitino *et al.*, 2017). Se presume que la muerte celular programada tiene el objetivo de impedir la dispersión generalizada de la bacteria hacia todo el árbol. Sin embargo, el taponamiento de los tubos del floema posiblemente contribuye a la acumulación de almidón en hojas, conduciendo al desarrollo de síntomas a nivel foliar debido a cambios anatómicos e histoquímicos en mesófilo y floema como el engrosamiento de la pared celular de células del floema, el incremento de la división celular (hiperplasia) del parénquima del floema, aumento del área total del sistema vascular (xilema y floema) y del contenido de proteínas del floema como PP1 y PP2, las cuales participan en el bloqueo del floema durante la infección (Albrecht y Bowman, 2012; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Koh *et al.*, 2012; Granato *et al.*, 2019).

La interacción entre CLas y plantas de cítricos susceptibles, dando lugar a los síntomas de HLB, se ha intentado explicar ajustándose al modelo en zigzag de Jones y Dang (2006). Según Curtolo *et al.* (2020a) la interacción de PAMPs de CLas disparan una PTI efectiva durante el estado asintomático, asociado a la producción de giberelinas (GA) y SA. Posteriormente los efectores de CLas interfieren con la PTI o facultan al patógeno para su nutrición y dispersión por la planta, dando lugar a la ETS y eventual expresión de síntomas. La activación de la ETI en la planta se asocia con la activación de genes responsables de la acumulación de calosa y de proteínas 2 del floema o PP2 (Phloem protein 2), lo cual trae como consecuencia alteraciones anatómicas y taponamiento de los tubos del floema que podría disparar la muerte celular por HR para evitar la propagación generalizada de CLas en la planta (Jain *et al.*, 2019; Achor *et al.*, 2020). Sin embargo, esto también causa disfunción del floema y evita el flujo y la distribución de fotoasimilados a lo largo del sistema vascular, provocando la acumulación de almidón en los cloroplastos del mesófilo, saca-

rosa y glucosa en células foliares (Koh *et al.*, 2012; Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2019), ruptura de las membranas tilacoideas y degradación de clorofila; todo ello, junto con un desbalance fitohormonal y el estrés oxidativo, contribuyen al desarrollo de los tardíos síntomas característicos de HLB en cítricos susceptibles (da Graça *et al.*, 2016).

Con este mismo enfoque, se han identificado algunos putativos PAMPs en el genoma de CLas y, mediante estudios transcripcionales, se ha encontrado evidencia de que ante la infección, se induce la expresión de receptores cinasas (RLKs) localizadas en la superficie celular; lo que sugiere la capacidad de las células de los cítricos para reconocer a los PAMPs de CLas e iniciar una cascada de señalización que derive en una PTI (Zou *et al.*, 2012; Hao *et al.*, 2013; Aritua *et al.*, 2013; Mafra *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2021). Además, la identificación de numerosas moléculas homólogas a elicitores de la inmunidad innata, así como a componentes de la respuesta de defensa y de señalización en cítricos, ha conducido a proponer una “potencial ETI” como parte de la respuesta inmune ante la infección de CLas (da Graça *et al.*, 2016).

**Posibles PAMPs y Efectores identificados en CLas.** A la fecha no se han establecido mecanismos concluyentes de patogenicidad de CLas en cítricos, principalmente debido a la dificultad de cultivarla en laboratorio para realizar pruebas de patología. La alternativa ha sido utilizar parientes cercanos como *Liberibacter crescens*, *Agrobacterium* sp. y *Sinorizobium* sp. para expresar heterológamente efectores o genes homólogos de CLas (Dalio *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2020).

La secuenciación del genoma completo de CLas por Duan *et al.* (2009) reveló que, entre los genes potencialmente involucrados en la patogenicidad, CLas contiene 57 genes involucrados en la biogénesis de la envoltura celular y de lipopolisacáridos,

que podrían funcionar como PAMPs; además de 30 genes de biosíntesis de flagelos. Zou *et al.* (2012) demostraron que la proteína homóloga a flagelina de 452 aminoácidos contiene el dominio flg22 y funciona como PAMP (Figura 3). Además, flg22 es capaz de desencadenar la respuesta de defensa de los cítricos de forma diferenciada entre cítricos resistentes y susceptibles (Shi *et al.*, 2017). Sin embargo, Andrade *et al.* (2020) reportan que estos genes no se expresan en plantas. Además, muchos PAMPs presentes en otros patógenos están ausentes en el genoma de CLas, por lo que se ha sugerido que posiblemente CLas ha evolucionado para reducir la elicitación de PTI (Duan *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2017). Esta hipótesis considera que, siendo la vía de inoculación por el vector *D. citri* intracelular y directamente al floema, tejido al cual se limita la infección por CLas, éste patógeno podría evitar la defensa inicial de la planta por PTI debido a que los receptores PRR perciben PAMPs hacia el exterior de la célula.

De acuerdo al modelo, en segundo término y una vez que CLas ha ingresado a la planta, utiliza efectores para modular algunas funciones celulares del hospedero para multiplicarse y colonizar exitosamente las células del floema. Los efectores son fundamentales en la patogenicidad ya que restringen la acción del sistema inmune de las plantas o interfieren en el proceso de desarrollo del hospedero (Iqbal *et al.*, 2020). La secuenciación del genoma de CLas reveló la presencia de proteínas derivadas de un sistema de secreción tipo I (T1SS) y de un sistema general de secreción (Sec), que se consideran importantes en la virulencia de CLas. Aunque los autores resaltan que genes de secreción comúnmente encontrados en otras bacterias patógenas no se encontraron en CLas. También se encontró un gen potencialmente codificante de la proteína serralisina, la cual está asociada al T1SS y potencialmente actúa como un factor de virulencia,

participando en la degradación de proteínas (Cong *et al.*, 2012). Diferentes herramientas computacionales están disponibles para la identificación de posibles efectores de patogenicidad, por ejemplo [http://prodata.swmed.edu/liberibacter\\_asiatikus/curated/](http://prodata.swmed.edu/liberibacter_asiatikus/curated/), un website público donde se pueden consultar los resultados más relevantes de un análisis bioinformático que identifica posibles factores de virulencia de CLas (Cong *et al.*, 2012). En los últimos años se logró un avance importante en la evaluación funcional de los factores de patogenicidad de CLas y su papel en el proceso de infección en cítricos. Posibles factores de patogénesis de CLas hasta ahora identificados, así como las respuestas de defensa inducidas en las plantas, están esquematizadas en la Figura 3. La caracterización de algunos de los diversos efectores estudiados se describen a continuación.

Liu *et al.* (2019) señalan que CLas secreta proteínas con funciones aún desconocidas, y que la proteína CLIBASIA\_00460 podría estar relacionada con su patogenicidad, ya que su sobreexpresión en hojas de tabaco provocó muerte celular programada. Además, sus evaluaciones en cítricos mostraron que CLIBASIA\_00460 se expresó en niveles significativamente más altos que en psíidos positivos. Estos hallazgos, junto con reportes previos (Pitino *et al.*, 2016), los llevaron a concluir que esta proteína podría actuar como un factor de virulencia de CLas. Por otra parte, Hao *et al.* (2013) reportó que las proteínas hipotéticas LasA<sub>I</sub> y LasA<sub>II</sub> comparten características estructurales con familias de transportadores y se han detectado en mitocondrias cuando se expresan heterológamente en plantas; además, se observaron cambios morfológicos en mitocondrias y cloroplastos de las plantas sobreexpresantes, por lo que se hipotetiza que LasA<sub>I</sub> y LasA<sub>II</sub> podrían manipular la producción de energía en la planta durante la infección. Clark *et al.* (2018) señalan que el efector Sec1 de CLas inhibe

la actividad de proteasas cisteínicas tipo papaína (PLCPs), producidas como defensa por las plantas de cítricos, asociadas con la SAR. También, se ha reportado que CLIBASIA\_RS00445 codifica la proteína bacterioferritina (LasBCP), la cual pertenece a la familia de las 1-Cys peroxidoxina y es esencial en la supervivencia y colonización de CLas en plantas. LasBCP degrada peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y tiene especificidad por peróxidos orgánicos (Singh *et al.*, 2017; Jain *et al.*, 2018), por lo que potencialmente afecta la señalización y la acción de las ROS como defensa. Jain *et al.* (2019) observaron que la expresión LasBCP en hojas de cítricos se relacionó con una disminución transcripcional de la biosíntesis de oxilipina; por lo tanto, reprime la peroxidación de lípidos inducida por ROS. Además, reportaron que LasBCP atenúa la señalización de defensa de la planta mediada por ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS). Pitino *et al.* (2016) expresaron de forma transitoria el efector Las5315 en cloroplastos de *Nicotiana benthamiana*, lo cual produjo fuertes deposiciones de calosa y muerte celular tres días después de la inoculación. Así mismo, Pitino *et al.* (2017) observaron mayores niveles de  $H_2O_2$  y adenosín trifosfato (ATP) en hojas enfermas respecto a sanas. Posteriormente, Pitino *et al.* (2018) demostraron que la infección de CLas causaba una acumulación de almidón en hojas de *N. benthamiana*, de forma similar a lo que se observa en cítricos enfermos con HLB; y que el efector Las5315 expresado de forma transitoria incrementó de 6 a 8 veces la acumulación de almidón, lo que se asoció con una baja expresión de enzimas vegetales degradadoras de almidón, como la alfa glucosidasa, la alfa amilasa y la glicosil hidrolasa. Jain *et al.* (2015) reportaron que la proteína SC2\_gp095 de CLas se asoció con una regulación transcripcional negativa de proteínas RBOHB (Proteína B homóloga a oxidasa del *burst* respiratorio) de plantas, las cuales son esen-

ciales en la señalización de defensa mediada por  $H_2O_2$ . Ying *et al.* (2019) reportan la presencia de la proteína CLIBASIA\_00470, se asocia con la alteración del perfil proteico del hospedero a través de la degradación de proteínas de defensa mediadas por ubiquitina. Por otra parte, Wang y Trivedi (2013) y Li *et al.* (2017) reportaron la presencia de la enzima salicilato hidroxilasa funcional (SahA) en el genoma de CLas, la cual convierte el SA producido por las plantas infectadas en catecol, el cual inactiva la señalización que induce la resistencia sistémica. Otros posibles factores de virulencia del genoma de CLas están presentes en dos profagos, uno de escisión (SC1) y otro insertado a nivel cromosómico. Ambos profagos codifican dos proteínas con actividad de peroxidases (SC1\_gp035 y SC1\_gp110), similares a la endolisina y la holina, respectivamente. Estas proteínas podrían proteger a la bacteria de las ROS producidas por la planta durante la infección (Fleites *et al.*, 2014). Vahling *et al.* (2010) reportaron la presencia del gen *nttA* (proteína transportadora de nucleótidos) que codifica una ADP/ATP translocasa que altera los niveles de ATP intracelular, lo que sugiere que CLas importa ATP de su entorno. Por otra parte, CLas tiene genes relacionados con el sistema de transporte de Zn, Mn y Fe (Znu #1, Znu #2), transportadores ABC (ZnuA1, ZnuB1, ZnuC1) y otros transportadores periplasmáticos (ZnuA2, ZnuB2, ZnuB2-2, Znu-C2), lo que sugiere que CLas podría importar nutrientes de su entorno inmediato (Vahling-Armstrong *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2015, 2016).

En resumen, no hay claridad respecto a la existencia de PAMPs en CLas, pero sí una amplia diversidad de posibles efectores con evidencia de disparar respuestas de defensa en los cítricos.

**Putativos receptores PRR y NLR en cítricos.** A pesar de la importancia económica del cultivo de cítricos y su coexistencia con una gran variedad de

patógenos, ningún PRR de cítricos ha sido funcionalmente bien caracterizado; sin embargo, algunos RLKs y RLPs parecen tener un papel en la percepción de patógenos y en disparar la inmunidad innata (Dalio *et al.*, 2017). Magalhães *et al.* (2016) identificaron mediante bioinformática, un total de 300 y 297 proteínas de *C. clementina* y *C. sinensis* respectivamente, homólogas a receptores PRRs de la subfamilia LRR-RLKs. Por otra parte, Aritua *et al.*, (2013) realizaron análisis de microarreglos y reportaron que ante la infección de CLas, las plantas de *C. sinensis* sobre expresaron 12 genes homólogos de receptores presentes en arroz (*Xa21*) y tomate (*Hcr2-5D* y *Cf-2.2*), un gen que codifica al receptor SR160, además de homólogos a receptores cinasa FERONIA (FER), cinasas asociadas a la pared celular (WAK) y genes de la familia WLKs (similares a los genes WAKs). También, reportan una regulación negativa de homólogos a receptores cinasa como ERECTA y el receptor similar a proteína cinasa 1, descritos en Arabidopsis y cultivos como maíz y arroz, donde participan en la comunicación entre la pared celular y la membrana plasmática, mediando la transducción de señales hacia el compartimiento intracelular al activarse sus dominios extracelulares (Hurni *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2017a). Por otra parte, Fu *et al.*, 2016 realizaron un perfil transcriptómico en *C. sinensis* y reportaron un gran número de transcritos que se expresaron de forma diferenciada ante la inoculación de CLas (RLP6, RLP9, RLP13, RLP14, RLP15 y RLP45), además de RLKs similares a LRR-K, WAKs y proteínas con dominio de función desconocida 26 (DUF26). Respecto al reconocimiento de los efectores por parte de los cítricos con receptores tipo NLRs, se ha reportado la presencia de posibles genes de resistencia (R) homólogos a estos receptores en los genomas secuenciados de *Citrus cinensis* y *C. clementina* (Wang *et al.*, 2015). Mafra *et al.* (2013) evaluaron la respuesta de *C. sinensis* a la

infección de CLam mediante microarreglos y reportaron, además de la presencia de transcritos que codifican proteínas similares a PRRs (RLP12), la expresión diferencial de genes de reconocimiento tipo NBS-LRR, y receptores cinasa con motivos de lisina (CERK1). Por otra parte, el análisis transcriptómico de secuencias expresadas de cítricos en respuesta a patógenos (CitEST) de diferentes especies bajo diferentes condiciones de crecimiento, mostró la presencia de un gran número (137) de putativos genes R con estructura similar a NBS-LRR, CC-NBS-LRR, TIR-NBS-LRR, así como proteínas de resistencia de la familia transmembranal 7 (7-TM) (Guidetti-Gonzalez y Carrer, 2007; Dalio *et al.*, 2017). Además, en estudios donde se comparan los perfiles transcripcionales de plantas sanas y enfermas con HLB, se ha mostrado la expresión diferencial de múltiples genes NBS-LRR potencialmente involucrados en la percepción de los efectores de CLas (Kim *et al.*, 2009; Aritua *et al.*, 2013; Mafra *et al.*, 2013; Nwugo *et al.*, 2013). La sobre expresión del gen *CsSAMT1* en plantas transgénicas de *C. cinensis* se relacionó con la inducción de la expresión de receptores cinasa, particularmente de receptores similares a TIR-NBS-LRR (Zou *et al.*, 2021), además de una mayor expresión de genes de defensa y resistencia ante la enfermedad del HLB. *CsSAMT1* codifica el ácido salicílico metiltransferasa (SAMT), la cual cataliza la formación de ácido metilsalicílico (MeSA) a partir del ácido salicílico. El MeSA es fundamental en la señalización de la respuesta sistémica adquirida (SAR) mediada por SA ante el ataque de patógenos. A pesar de la correlación de los perfiles de expresión de putativos NLRs con el proceso de infección en HLB, el papel de estos receptores interactuando funcionalmente con los efectores de CLas y promoviendo la defensa en plantas resistentes aún no ha sido comprobado.

**Lo resumido hasta ahora, ilustrado en la figura 3, significa un avance significativo en el entendimiento de cuáles son los posibles PAMPs y factores de virulencia o efectores de CLas, así como de sus mecanismos para elicitar o bloquear la inmunidad en los cítricos. Sin embargo, se requiere más investigación dirigida a caracterizar funcionalmente los posibles receptores PRR y proteínas R de cítricos antagonistas a los efectores de CLas, para comprender de mejor manera las vías de activación de la PTI y la ETI que se propone son inducidas en cítricos con HLB.**

**HLB como enfermedad mediada por la inmunidad, una visión alternativa.** Aunque se considera que la protección de las plantas ante el ataque de la mayoría de patógenos depende del sistema inmune innato que da lugar a la PTI, ETI o ambas; así como de las señales sistémicas que emanan del sitio de infección dando lugar a la SAR (da Graça *et al.*, 2016); la clasificación diferencial entre la PTI y la ETI basada en interacciones planta-patógeno modelo no siempre se ajusta a la gran diversidad de interacciones planta-patógeno existentes, hay poca claridad en la diferenciación química o funcional entre PAMPs y efectores, y convergencia o solapamiento en las respuestas de las plantas involucradas en la PTI y la ETI (Bart *et al.*, 2011). Bajo esta consideración, la diferenciación entre PAMPs/Efectores, tipo de receptores y tipos de inmunidad, puede ser solo conceptual.

Así mismo, se asume que las enfermedades de las plantas son resultado directo del impacto de los factores de patogenicidad de los agentes causales o efectores, como toxinas, enzimas que degradan la pared celular, biopelículas de patógenos que obstruyen los flujos de los productos fotosintéticos, y otros. Sin embargo, en el caso de HLB, no son claros los mecanismos a través de los cuáles CLas daña a las plantas infectadas y no se han confir-

mado factores de patogenicidad directamente responsables de los síntomas. Por el contrario, Ma *et al.* (2022) recientemente han propuesto que HLB es una enfermedad que es mediada por el sistema inmune y que los síntomas son ocasionados por las propias respuestas de inmunidad de la planta, crónicas y sistémicas, indirectamente provocadas por el patógeno (*pathogen-triggered immune disease*) al inducir la sobreproducción crónica y excesiva de ROS que provocan la muerte celular en el floema. Lo anterior se fundamenta en a) evidencia genómica y experimental de que CLas no tiene factores de patogenicidad que causen de forma directa los síntomas de HLB; b) la presencia de CLas en hojas nuevas de árboles de *C. sinensis* infectados dispara la respuesta inmune y muerte celular en el tejido del floema; incluyendo el incremento en la producción de ROS ( $H_2O_2$ ), deposición de calosa, acumulación de almidón previo a la aparición del amarillamiento, así como la expresión de proteínas PR como marcadores de inmunidad; c) la muerte celular de células acompañantes y tubos cribosos del floema, mediada por HLB, parece ser disparada por los altos niveles de ROS producidas tanto en hojas jóvenes con infección en estadios tempranos, como en hojas maduras y tallos; en congruencia con que el estrés oxidativo involucrado en HLB ha sido sugerido por muchos estudios; d) la infección por CLas altera de forma significativa la expresión de rutas relacionadas con el estrés oxidativo, incluyendo tanto la regulación negativa de homólogos de enzimas antioxidantes como la sobreexpresión de posibles NADPH-oxidasas membranales o RBOHs (*Respiratory burst oxidative homolog*) implicados en otras plantas en la generación de ROS después del reconocimiento de PAMPs; conforme análisis de los perfiles de expresión reportados en estudios transcriptómicos de *C. sinensis*; e) hay cambios de expresión en homólogos de genes asociados con la respuesta inmune, incluyendo inducción de dece-



nas de NLRs; revelados por el mismo análisis de múltiples estudios transcriptómicos. Las respuestas inmunes disparadas por CLas han sido ampliamente descritas (Zou *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017; Clark *et al.*, 2018) y esta hipótesis sugiere que dichas respuestas son las directamente responsables de causar los daños asociados a HLB, de forma similar a las enfermedades inmunes de humanos.

**Respuestas transcriptómicas, proteómicas y metabólicas en cítricos tolerantes o susceptibles ante la infección con CLas.** Todo lo anteriormente descrito se ha propuesto con base en las respuestas y síntomas observados en cítricos susceptibles a HLB; sin embargo, aunque todos los cítricos son afectados en mayor o menor grado, se ha reportado que algunas especies o variedades exhiben tolerancia diferenciada a la enfermedad (Folimonova *et al.*, 2009). Naranjas, mandarinas y tangelos son altamente susceptibles, pero toronja, limón y naranjo agrio muestran cierto grado de tolerancia con una expresión de síntomas más lenta y continuando con su desarrollo aún con la enfermedad (Folimonova *et al.*, 2009; Albrecht y Bowman, 2012). A la fecha no se han reportado variedades o combinaciones de vástago-portainjerto comerciales resistentes a HLB, ni se han identificado genes de resistencia específicos a CLas; posiblemente porque en términos evolutivos es una enfermedad reciente (100 años) y los cítricos aún no han desarrollado dicha resistencia (Bové, 2006; Gottwald, 2010). Aunque recientemente se ha publicado la selección de híbridos descritos como resistentes (cruzas entre *Citrus sunki* ex Tan y *Poncirus trifoliata* Raf. cv Rubidoux) y se ha propuesto a un gen de quitinasa como posible gen de resistencia (Curtolo *et al.*, 2020a; b), no se cuenta con mayor información respecto a su comportamiento y productividad en campo.

La identificación de los mecanismos de defensa desplegados ante esta enfermedad en las varia-

des tolerantes e híbridos posiblemente resistentes, permitirá proponer mejores alternativas de manejo del HLB, incluso para los cítricos susceptibles; así como abrir la posibilidad de generar variedades genéticamente mejoradas. Diversos trabajos en los que se realizaron mapeos de datos en cítricos infectados con CLas, evaluando la expresión de loci de rasgos cuantitativos (eQTL) respaldan la hipótesis de que la tolerancia de algunas variedades al HLB es poligénica (Huang *et al.*, 2018; Soratto *et al.*, 2020; Curtolo *et al.*, 2020b; Hu *et al.*, 2021).

Especies, variedades, híbridos y combinaciones vástago/portainjerto con diferente grado de tolerancia o susceptibilidad han sido utilizadas de forma individual o comparativa para conocer sus respuestas transcriptómicas, proteómicas y metabólicas ante la infección con CLas; con el objetivo de identificar moléculas acumuladas diferencialmente, presuntamente asociadas a su diferente nivel de tolerancia ante la infección (Cuadro 1). El análisis global de estos estudios, sugiere que cítricos con diferente nivel de tolerancia a HLB, infectados con CLas, despliegan cambios en la expresión de genes y en la acumulación de proteínas y metabolitos de forma diferencial entre los genotipos evaluados, incluyendo homólogos a receptores, proteínas de resistencia, factores transcripcionales, enzimas antioxidantes, así como el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, fitohormonas, pared celular y otras rutas metabólicas. Así, la susceptibilidad o tolerancia de un particular genotipo se podría asociar con la sub o sobre expresión de un conjunto de genes y ciertas rutas metabólicas. A continuación, describimos patrones de respuesta que se afectan de forma diferencial en cítricos ante la infección con CLas, dependiendo del nivel de tolerancia de la variedad; agrupados según la posible función de las moléculas durante el proceso de inmunidad.

Cuadro 1. Estudios transcriptómicos, metabólicos y/o proteómicos de cítricos con diferente nivel de tolerancia ante la infección con CLAs.

Variedad	Tipo de estudio y Referencia	Ejemplos de transcritos, proteínas o metabolitos diferencialmente expresados potencialmente relacionados con la tolerancia o susceptibilidad
Limón Lisboa ( <i>C. limon</i> ) <sup>MT</sup> vs Naranja Navel ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> . Porta injerto: Carrizo citrange ( <i>X Citroncirus webberi</i> ) <sup>T</sup> .	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación de expresión transcriptómica, metabólica y proteómica. -Comparación entre hojas de plantas sanas y enfermas de limón vs Naranja. (Chin <i>et al.</i> , 2021)	-CLAs indujo la disrupción del metabolismo de cítricos tanto en la variedad tolerante como en la susceptible a nivel de transcritos, proteínas, metabolitos y micronutrientes: -Mayor acumulación de micronutrientes ( $\text{Cu}^{2+}$ y $\text{K}^+$ ) en hojas de plantas de limón y menor concentración de $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ y $\text{Ca}^{2+}$ en hojas de naranja infectadas con CLAs. -Expresión diferenciada de proteínas relacionadas con fotosíntesis, respuesta de defensa, inhibidores de tripsina tipo Kunitz, degradación de quitina y glucólisis en hojas positivas a CLAs, respecto a plantas sanas. -Mayor cantidad de Azúcares, aminoácidos y otros compuestos en hojas enfermas de naranjas respecto a limón. -Mayor expresión de transcritos de degradación de quitina en hojas de limón infectadas respecto a hojas infectadas de naranja. -En un estado pre-sintomático, la fotosíntesis fue afectada en menor grado en limón respecto a naranja. -Transcritos de inhibidores de proteasas (PI) se expresaron en mayor medida en hojas de limón respecto a naranja. -Mayores cambios metabólicos en naranja respecto a limón.
Mandarina Sugar belle <sup>T</sup> ( <i>C. reticulata</i> x <i>Minneola tangelo</i> ) <sup>T</sup> vs Mandarina Murcott ( <i>C. reticulata</i> Blanco) <sup>S</sup> . Porta injerto: Naranja agrio ( <i>Citrus aurantium</i> L.) <sup>MT</sup> .	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación metabólica. -Comparación entre hojas de plantas sanas y enfermas de Sugar belle vs Murcott. (Suh <i>et al.</i> , 2021)	-Algunas vías metabólicas (síntesis de aspartato, glutamato, purinas y biosíntesis de fitohormonas como auxinas y citoquininas) se incrementaron en el grupo tolerante tanto en plantas sanas como enfermas, pero no metabolitos relacionados con ácido salicílico (ácido salicílico, ácido salicílico $\beta$ -D-glucosido y ácido 2, 3-dihidroxibenzoico). -Las vías catabólicas asociadas al metabolismo productor de energía se incrementaron en el grupo tolerante. -Los autores sugieren que en la variedad tolerante el patrón asociado a la tolerancia está asociado con el crecimiento continuo y regeneración del floema; por el contrario, en la variedad susceptible se expresó una respuesta de defensa directa. -Las variedades susceptibles mostraron la expresión diferencial de un gran número de genes respecto a variedades tolerantes. Respecto a los híbridos, todos los grupos mostraron expresión diferenciada de genes, sin embargo, el grupo tolerante mostró la mayor expresión de genes, respecto a los grupos resistente y susceptible. Muchos de los genes diferencialmente expresados fueron regulados negativamente en plantas enfermas respecto a plantas sanas. -En <i>P. trifoliata</i> y el grupo resistente se observó una mayor expresión de receptores de reconocimiento como: <i>receptor cinasa rico en cisteína</i> , <i>proteína cinasa serina/treonina</i> , <i>cinasa transmembranal-LRR</i> y <i>LRR-RLK</i> , respecto a las variedades susceptibles. -En genotipos tolerantes y resistentes, CLAs indujo la expresión de genes relacionados con la degradación de giberelinas, en comparación con genotipos susceptibles. -La expresión de factores transcripcionales WRKY se relacionó con los mecanismos de defensa genética en <i>P. trifoliata</i> . -Respecto a los genes de defensa, el gen <i>endoquitinasa B</i> se expresó en mayor medida en el grupo resistente. -En <i>P. trifoliata</i> se expresaron genes relacionados con lignina y fenilpropanoides como ácido <i>cafeico O-metiltransferasa</i> , <i>chalcona sintasa</i> y <i>feruloil orto-hidroxilasa 1</i> entre otros. -En <i>P. trifoliata</i> se observó una modulación génica a nivel de floema como respuesta a CLAs, sin la deposición de calosa que ocurre en variedades susceptibles. -En variedades tolerantes no se observó inducción de genes relacionados con la síntesis de almidón.
<i>C. sinensis</i> <sup>S</sup> , <i>C. sunki</i> <sup>S</sup> , <i>P. trifoliata</i> <sup>T</sup> , 21 híbridos (tres grupos <sup>S,T,R</sup> ) obtenidos de la cruce de <i>C. sunki</i> x <i>Poncirus Trifoliata</i> . Porta injerto: Lima Rangpur ( <i>C. limonia</i> ) <sup>MT</sup> .	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación transcriptómica. -Comparación entre hojas de plantas sanas y enfermas de variedades susceptibles ( <i>C. sinensis</i> , <i>C. sunki</i> y grupo susceptible), tolerantes ( <i>P. trifoliata</i> y grupo tolerante) y resistente (grupo resistente). (Curtolo <i>et al.</i> , 2020a)	

Cuadro 1. Continúa...

Variedad	Tipo de estudio y Referencia	Ejemplos de transcritos, proteínas o metabolitos diferencialmente expresados potencialmente relacionados con la tolerancia o susceptibilidad
Naranja dulce ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> . Porta injerto: Carriazo citrange ( <i>C. sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i> ) <sup>MT</sup> . Plantas sanas vs enfermas.	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación transcriptómica en raíz de plantas sanas y enfermas. -Tratamientos de fertilización a base de macro y micro nutrientes. -Cuatro tratamientos de fertilización: 1) árboles sanos con fertilización (HLY-F), 2) árboles enfermos con fertilización (HLB-F), 3) árboles sanos sin fertilización (HLY-NF) y 4) árboles enfermos sin fertilización (HLB-NF). (Shahzad <i>et al.</i> , 2020)	-Ante la condición de deficiencia nutricional nueve genes codificantes de: transferencia de fosfoglicéridos, proteínas de la familia HPP, proteínas similares a dedos de zinc (Ran BP2/NZF), HVA22 homólogo C, dominio barrel A/B sensible al estrés, peroxidasas, transportadores de zinc y receptores LRR se expresaron de forma diferenciada en raíces de plantas inoculadas con HLB. -Ante la fertilización (una semana después) genes relacionados con transporte de iones, crecimiento y desarrollo de raíz, cambios anatómicos, muerte celular y apoptosis, se expresaron de manera diferenciada en raíces de plantas enfermas vs sanas. -Las plantas enfermas mostraron mayor eficiencia en la toma de nutrientes, sin embargo, el volumen de raíz fue menor que en plantas sanas, lo que limita la toma de nutrientes. -Los macronutrientes secundarios y micronutrientes son metabolizados en una tasa mayor en plantas enfermas. -Los autores sugieren que un suministro constante de fertilización con dosis ligeramente superiores a las recomendadas de macro nutrientes secundarios y micronutrientes sería beneficioso para el manejo de árboles enfermos con HLB.
Naranja Valencia ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> . Porta injertos: Swingle ( <i>Citrus paradisi</i> x <i>Poncirus trifoliata</i> ) <sup>S</sup> y 46x20-04-48 ( <i>C. grandis</i> x <i>C. reticulata</i> ) <sup>T</sup> .	-Plantas cultivadas en una parcela. -Inoculación mediante <i>D. citri</i> . -Evaluación proteómica en pulpa de frutos sintomáticos y asintomáticos (ambos HLB+). Comparación: porta injerto tolerante vs susceptible vs fruto sintomático vs fruto asintomático. Grupo de sanas vs enfermas. (Yao <i>et al.</i> , 2020)	-La naranja valencia mostró diferencias en las características del fruto y el perfil de expresión de proteínas ante la infección de CLas, tanto en el portainjerto susceptible como el tolerante: 525 proteínas tuvieron una regulación negativa en frutos del portainjerto Swingle y 257 en 46x20-04-48, respecto a los testigos sanos. -En Swingle se encontró una regulación negativa de proteínas asociadas a la biosíntesis de aleno óxido sintasa y a la señalización de jasmonatos como SKP1 (proteína cinasa asociada a fase S), ASK2 (similar a SKP1), RUB1 (similar a ubiquitina), proteínas de choque térmico HSP70T-2 y HSP90.1, subunidades del proteosoma como RPN8A y RPT2a y receptores para tráfico vesicular (SNAREs). -Se propone que las proteínas reguladas negativamente relacionadas a la vía de señalización de jasmonato y tráfico vesicular, podrían relacionarse con la sensibilidad de Swingle.
Naranja Valencia ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> .	-Plantas en invernadero. -Plantas sanas vs plantas inoculadas mediante injerto vs plantas infestadas con <i>D. citri</i> . -Evaluación metabólica en hojas. -Aplicación de melatonina exógena. (Nehela y Killiny, 2020a)	-La infección con CLas y la infestación con <i>D. citri</i> incrementó los niveles endógenos de melatonina y reguló positivamente sus genes de biosíntesis como <i>TDC</i> (tirosina decarboxilasa), <i>T5H</i> (triptamina-5-hidroxilasa), <i>SNAT</i> (serotonina N-acetiltransferasa), <i>ASMT</i> (N-Acetilserotonina O-metiltransferasa) y <i>COMT</i> (ácido cafeico O-metiltransferasa) en hojas de naranja Valencia. -El incremento en los niveles endógenos de melatonina se correlacionó positivamente con el contenido de ácido salicílico. -La aplicación exógena de melatonina potenció el contenido de fitohormonas asociadas a estrés (salicilatos, auxinas, ácido <i>trans</i> -jasmónico y ácido abscísico), así como la transcripción de los genes de sus biosíntesis. -La aplicación de melatonina disminuyó significativamente los títulos de CLas en hojas sintomáticas de <i>C. sinensis</i> . -Se propone a la melatonina como mediador de la respuesta de defensa de cítricos contra HLB mediante la modulación vías de señalización de fitohormonas.
14 variedades de cítricos clasificadas en cuatro grupos de acuerdo con su grado de tolerancia a CLas <sup>F</sup> .	-Plantas en invernadero. -Plantas sanas. -Evaluación metabólica de savia del floema de brotes colectados en tres alturas del dosel. -Tolerantes vs susceptibles. (Killiny, 2017)	-La variedad tolerante <i>Citrus latipes</i> tuvo niveles altos de $\gamma$ -ABA, ácido L-aspartico, L-asparagina, L-Treonina, L-Valina, ácido fumárico, maltosa y fructosa. -La galactosa, $\beta$ -L-arabinopiranosas, arabinosa, sorbosa y los ácidos orgánicos, se correlacionaron negativamente con la tolerancia. -El ácido fumárico, $\alpha$ -D-galactopiranosas, $\alpha$ -D-manopiranosas, maltosa, manosa y disacáridos se correlacionaron positivamente con la tolerancia de los cítricos a CLas.

Cuadro 1. Continúa...

Variedad	Tipo de estudio y Referencia	Ejemplos de transcritos, proteínas o metabolitos diferencialmente expresados potencialmente relacionados con la tolerancia o susceptibilidad
US-812 <sup>T</sup> , US-897 <sup>T</sup> , US-942 <sup>T</sup> , <i>C. sinensis</i> <sup>S</sup> , <i>C. Paradisi</i> (Duncan) <sup>S</sup> , <i>C. paradisi</i> (Ruby Red) <sup>S</sup> .	-Plantas sanas en invernadero vs plantas enfermas cultivadas en parcela. -Inoculación natural mediante <i>D. citri</i> . -Evaluación transcriptómica en hojas. -Tolerantes vs susceptibles. (Rawat <i>et al.</i> , 2017)	Mayor actividad de los genes PtCDR2 y PtCDR8, relacionados con la activación constitutiva de respuesta de defensa en <i>P. trifoliata</i> infectadas con CLas, respecto a variedad es susceptibles.
Mandarina Sun Chu Sha <sup>T</sup> vs Pomelo Duncan <sup>S</sup>	-Plantas en invernadero. -Evaluación transcriptómica en hojas. -Aplicación exógena del péptido Flg22 en hojas. -Tolerante vs susceptible. (Shi <i>et al.</i> , 2017)	-La aplicación de Flg22 indujo la expresión de 86 genes en el genotipo de mandarina tolerante, de los que destacan citocromo P450, glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y proteínas de resistencia a enfermedades. -24 horas después del tratamiento se encontró una mayor expresión de genes <i>EDR1</i> , <i>EDS1</i> , <i>NDR1</i> , <i>PBS1</i> , <i>RARI</i> y <i>SGT1</i> , biosíntesis de fenilpropanoides ( <i>PAL1</i> ), reguladores transcripcionales de PRs (NPR2 y NPR3), inductores de SAR ( <i>AZII</i> ) y genes de patogenicidad (RdRp1) en el genotipo tolerante. Por otro lado, en el genotipo susceptible solo se indujo la expresión de un gen PR ( <i>PR1</i> ).
Varetas tolerantes de lima Kaffir ( <i>C. hystrix</i> ) <sup>T</sup> vs naranja dulce 'pineapple' ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> . Porta injerto: Carrizo citrange ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> ) <sup>T</sup> . Inoculo: Pomelo Guanximiyou ( <i>C. grandis</i> ) <sup>NR</sup> .	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación transcriptómica en hojas. -Tolerante vs susceptible. (Hu <i>et al.</i> , 2017b)	-Se encontró una respuesta diferenciada en el metabolismo de carbohidratos, procesos fotosintéticos, metabolismo de la pared celular, metabolismo secundario, procesos de oxido-reducción en <i>C. hystrix</i> respecto a <i>C. sinensis</i> . -Los autores no encontraron cambios en la síntesis de almidón y procesos fotosintéticos en <i>C. hystrix</i> , por el contrario, éstas vías fueron reguladas positivamente en <i>C. sinensis</i> . -Familias de proteínas similares a celulosa sintasa que participan en la síntesis de la pared celular se expresaron en mayor medida en <i>C. hystrix</i> , respecto a <i>C. sinensis</i> . -Genes involucrados en rutas del metabolismo secundario se expresaron en <i>C. hystrix</i> y reprimidos en <i>C. sinensis</i> . -La expresión de peroxidasas (Cu/Zn-SOD y POD4) se asociaron con la tolerancia de <i>C. hystrix</i> a CLas, probablemente por su actividad como proteínas de detoxificación de ROS.
Limón mexicano ( <i>C. aurantifolia</i> ) <sup>MT</sup> vs lima Persa ( <i>C. latifolia</i> ) <sup>MT</sup> vs naranja dulce ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> .	-Plantas en parcela bajo condiciones de temporal. -Infección natural con <i>D. citri</i> . -Evaluación proteómica de hojas de árboles infectados con HLB. -Árboles sintomáticos vs a sintomáticos. (Torres <i>et al.</i> , 2017)	-Mayor expresión de proteínas totales en limón mexicano infectado con CLas. -Mayor actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL) en naranja dulce infectada con CLas. -La actividad $\alpha$ -amilasa fue mayor en limón persa.
13 variedades de cítricos clasificadas en cuatro grupos de acuerdo con su grado de tolerancia a CLas <sup>F</sup> .	-Plantas en invernadero. -Plantas sanas. -Evaluación metabólica en hojas. -Tolerantes vs susceptibles. (Killiny e Hijaz, 2016)	-La mayoría de los aminoácidos encontrados en la savia del floema como fenilalanina, tirosina, triptófano, valina, leucina, histidina, lisina, cisteína, metionina, serina y glutamato se relacionaron positivamente con la tolerancia de cítricos a CLas. -Los ácidos orgánicos se correlacionaron negativamente con la tolerancia y los ácidos grasos no mostraron correlación.

Cuadro 1. Continúa...

Variedad	Tipo de estudio y Referencia	Ejemplos de transcritos, proteínas o metabolitos diferencialmente expresados potencialmente relacionados con la tolerancia o susceptibilidad
<i>C. volkameriana</i> <sup>MT</sup> , <i>C. sinensis</i> (Nabel) <sup>S</sup> , patrón <i>C. sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i> <sup>T</sup> . Inoculo: <i>C. limon</i> .	-Plantas en invernadero -Inoculación mediante injerto. -Análisis proteómico de nervaduras y peciolos. -Tolerante vs susceptible. (Martinelli <i>et al.</i> , 2016)	-En el genotipo susceptible, la enfermedad del HLB inhibió la fotosíntesis, la ruta de isoflavonas, síntesis de tetrapirrol, metabolismo de galactosa. Disminuyó la biosíntesis de ácidos grasos y metabolismo de nitrógeno, además, se incrementó la degradación de aminoácidos, metabolismo de lípidos, jasmonatos, proteínas PR y metabolismo de ácido linoleico. -En el genotipo tolerante disminuyó la actividad de isoprenoides, unión de ARN y activación de aminoácidos. Además, incremento en el metabolismo de galactosa, modificaciones en la pared celular y proteínas de choque, también, se activaron tres proteínas involucradas en la transducción de señalización de auxinas y cuatro glutatión S-transferasas. -En ambos cultivares se expresaron receptores cinasa tipo LRR ante la infección de CLas. -Sobre expresión de genes SAUR y NPR1 relacionados con la resistencia sistémica en los híbridos tolerantes, respecto a susceptibles. -Expresión diferenciada de genes asociados a la pared celular, tetrapirrol y metabolismo secundario entre los híbridos tolerantes y susceptibles. -Mayor expresión de genes de patogénesis (PR) en la variedad tolerante.
Tres híbridos de Toronja Jackson (R20T17, R20T18 y R19T17) <sup>T</sup> vs tres híbridos de Toronja Marsh (R19T23, R19T24 y R20T24) <sup>S</sup> .	-Plantas cultivadas en campo. -Infección natural con <i>D. citri</i> . -Análisis transcriptómico en brotes jóvenes. -Tolerantes vs susceptibles. (Wang <i>et al.</i> , 2016)	-La expresión de genes asociados a la pared celular como celulosa sintasa y transferasa, celulasa, expansinas y pectín esterases se relacionaron con el desarrollo de síntomas en la variedad susceptible. -La mayor expresión de genes asociados a receptores RLK se presentó en la variedad tolerante. -Los mayores cambios encontrados a nivel de sobre expresión de factores transcripcionales se observaron en la variedad susceptible. -Se encontró una baja expresión de genes relacionados a la biosíntesis de brasinoesteroides en la variedad tolerante.
I: Mandarina Cleopatra ( <i>C. reticulata</i> ) <sup>S</sup> , vs híbrido US-897 ( <i>C. reticulata</i> 'Cleopatra' x <i>P. trifoliata</i> 'Dragón volador') <sup>T</sup> . II: Mandarina Cleopatra ( <i>C. reticulata</i> ) <sup>S</sup> vs Carrizo citrange ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> ) <sup>T</sup> , US-802 ( <i>C. grandis</i> 'Siamese pummelo' x <i>P. trifoliata</i> 'Gotha Road') <sup>T</sup> , US-812 ( <i>C. reticulata</i> 'Sunki' x <i>P. trifoliata</i> 'Benecke') <sup>T</sup> , US-897, US-942 ( <i>C. reticulata</i> 'Sunki' x <i>P. trifoliata</i> 'Flying Dragon') <sup>T</sup> .	-Estudio en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación metabólica en hojas. -Cinco híbridos tolerantes vs un cultivar susceptible. -Plantas sanas vs enfermas. -Dos experimentos independientes. (Albrecht <i>et al.</i> , 2016)	-I: Ante la infección de CLas el híbrido tolerante US-897 mostró altos niveles de palatinosa, carbohidratos, (glucosa, fructosa y rafinosa), ácido hidroxicinámico, ácido láurico y algunos otros compuestos desconocidos. Además, la mandarina cleopatra mostró mayores niveles de arginina, sinefrina, ornitina citrulina y prolina, además, ácidos orgánicos (ácido sacárico, ácido pirrol-2-carboxílico y ácido maleico) y aminoácidos (lisina, tirosina y glicina), así como, compuestos desconocidos. Los metabolitos se expresaron de forma diferenciada en plantas infectadas respecto a sanas y fue mayor en Cleopatra respecto a US-897. -II: Los metabolitos que se expresaron en mayor cantidad en el cultivar susceptible fueron inulobiose, trans-4-Hidroxi prolina y prolina, además, también se encontró una menor expresión de treitol, rafinosa, ácido isotreónico, salicina, ácido $\alpha$ -cetoglutárico, galactinol, glucosa y fructosa. El único metabolito encontrado en altas concentraciones en cuatro de los seis cultivares (Cleopatra, Carrizo, US-802, US-812) fue la prolina, además, en los mismos cultivares el ácido 2-hidroxiglutárico, ácido $\alpha$ -cetoglutárico, salicina, además, de metabolitos de estructura desconocida se expresaron en menor cantidad. -Los autores señalan que la tolerancia a la enfermedad del HLB no parece estar asociada con la acumulación de altas cantidades de metabolitos como respuesta la infección.
Naranja Valencia y Hamling ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> .	-Plantas cultivadas en campo. -Infección natural con <i>D. citri</i> . -Evaluación metabólica en frutos. -Plantas sanas, plantas sintomáticas y asintomáticas (ambas HLB+). (Chin <i>et al.</i> , 2014)	-Diferencias en la concentración de metabolitos como fenilalanina, histidina, limonina y sinefrina se encontraron frutos provenientes de árboles sanos y asintomáticos respecto a frutos de árboles sintomáticos. -La concentración de fructosa, glucosa, sacarosa y prolina fue menor en comparación con testigos sanos. -Los autores señalan que los estudios metabólicos podrían ser útiles para detectar árboles enfermos en estados iniciales de la enfermedad.

Cuadro 1. Continúa...

Variedad	Tipo de estudio y Referencia	Ejemplos de transcritos, proteínas o metabolitos diferencialmente expresados potencialmente relacionados con la tolerancia o susceptibilidad
Naranja Valencia ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> .	-Plantas cultivadas en campo. -Infección natural con <i>D. citri</i> . -Expresión transcriptómica en hojas maduras, hojas inmaduras y cáscara de frutos inmaduros. -Sintomáticas vs asintomáticas vs sanas. (Martinelli <i>et al.</i> , 2013)	-La infección de CLas afectó la expresión de factores transcripcionales (TFs) como AP2-EREBP, factores de dominio MYB, dedos de zinc tipo C2H2 y WRKY en hojas inmaduras, sin embargo, ante la aparición de síntomas los TFs CAL1, AGL14, LBD37, ERF23 y ERF26 fueron menos abundantes. -En hojas maduras la infección afectó la transcripción de genes de las familias AP2-EREBP, MYB, bZIP, AS2, ABI3/VP1, y WRKY. -En frutos sintomáticos se sobre expresaron genes asociados a la fotosíntesis, metabolismo de sacarosa y rafinosa, además, de regulación negativa de genes de biosíntesis de almidón. -Los genes asociados con la respuesta de defensa sistémica fueron mayormente afectados en hojas inmaduras.
Limón ( <i>C. lemon</i> ) <sup>MT</sup> . Porta injerto: Pomelo Duncan ( <i>C. paradisi</i> ) <sup>S</sup> .	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación proteómica en hojas. -Plantas enfermas vs sanas. (Nwugo <i>et al.</i> , 2013)	-En plantas de limón infectadas se mostró la acumulación diferencial de 27 proteínas, incluyendo incremento de almidón sintasa y una disminución en proteínas asociadas con fotosíntesis. -La infección de CLas afectó negativamente la expresión de proteínas de respuesta a estrés como chaperonas, homeostasis celular y proteínas de respuesta a patógenos, lectina, quitinasa I y miraculina. Además, regulación negativa de proteínas asociadas con procesos fotosintéticos como RuBisCO y fotosistema I entre otras.
Híbrido US-897 ( <i>C. reticulata</i> x <i>P. trifoliata</i> ) <sup>T</sup> vs Mandarina Cleopatra ( <i>C. reticulata</i> ) <sup>S</sup> . Inoculo: <i>C. sinensis</i> <sup>S</sup> .	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación transcriptómica en hojas. -Resistente vs susceptible. -Enfermas vs sanas. (Albrecht y Bowman, 2012)	-Sobreexpresión de 326 genes en el genotipo susceptible respecto al híbrido tolerante US-897. -Mayor expresión de reguladores transcripcionales (TF) Myb tipo HH, mayor acumulación de almidón y carencia de expresión de proteínas de la familia Thioredoxina en Cleopatra respecto al híbrido US-897. -En el híbrido US-897 se observó mayor expresión de genes que codifican enzimas relacionadas con la biosíntesis de metabolitos secundarios como 2-oxoglutarato dioxigenasa dependiente de Fe(II), respecto a la mandarina Cleopatra y a los testigos sanos.
Naranja Madam Vinous ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> , Pomelo Duncan ( <i>C. paradisi</i> ) <sup>S</sup> , Carrizo citrange (x <i>Citroncirus webberi</i> ) <sup>T</sup> y <i>Poncirus trifoliata</i> <sup>T</sup> .	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación metabólica en hojas. -Tolerantes vs susceptibles. (Cevallos-Cevallos <i>et al.</i> , 2012)	-Las variedades susceptibles mostraron mayores niveles de aminoácidos como: L-prolina, L-serina y L-ácido aspártico y de ácidos orgánicos como butanodiólico y tetradecanólico y acumulación de galactosa. -En Pomelo Duncan se encontraron altos niveles de galactosa con respecto a Carrizo y <i>P. trifoliata</i> . -Las variedades tolerantes mostraron mayores niveles de L-glicina y manosa respecto a variedades susceptibles. En pomelo Duncan se observaron cambios significativos en mioinositol en brotes maduros y L-prolina y xilosa en brotes tiernos.
Limón rugoso ( <i>Citrus jambhiri</i> ) <sup>T</sup> vs Naranja Madam Vinous ( <i>C. sinensis</i> ) <sup>S</sup> . Infección con: Carrizo citrange ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> ) <sup>T</sup> .	-Plantas en invernadero. -Inoculación mediante injerto. -Evaluación transcriptómica en hojas. Tolerante vs susceptible. (Fan <i>et al.</i> , 2012)	-Expresión diferenciada de genes relacionados con funciones de la pared celular y un grupo de genes codificantes de $\beta$ -1, 3-Glucanasa en la variedad tolerante. -Mayor expresión de genes en limón rugoso que en naranja en una etapa inicial de infección y menor en una etapa avanzada de infección. -El limón rugoso mostró menores afectaciones al floema que la naranja.

<sup>F</sup>Clasificación de Folimonova *et al.*, 2009: <sup>I</sup>Inconsistente, <sup>MT</sup>Moderadamente tolerante, <sup>NR</sup>No reportado, <sup>R</sup>Resistente, <sup>S</sup>Susceptible, <sup>T</sup>Tolerante, <sup>V</sup>Variable.

**Receptores:** Para el caso de variedades susceptibles, se han reportado cambios en la expresión de posibles receptores de reconocimiento PRRs, como la regulación negativa de algunos receptores transmembranales homólogos a RLKs cinasas ricas en cisteína, cinasa similar a FERONIA, receptores similares a serina/treonina/cinasa y cinasas con repetidos ricos en leucina (Curtolo; *et al.*, 2020a), con lo cual sugieren un posible reconocimiento tardío de CLas. Sin embargo, los mismos autores y Hu *et al.* (2017b) reportaron una regulación positiva de otros receptores cinasa posiblemente relacionados con la respuesta a estrés biótico, como el receptor LRR-serina/treonina/cinasa GSO1, ERL2 y un RLP similar a la proteína 12, los cuales podrían reconocer PAMPs y desencadenar PTI. En variedades tolerantes infectadas con CLas se reporta aumento en la expresión de homólogos a PRRs como los receptores de flagelina CiFLS2-1 y CiFL2-2, los cuales se han relacionado con la activación de PTI y la resistencia a bacterias en cítricos (Shi *et al.*, 2017). Otros posibles receptores sobreexpresados en variedades tolerantes incluyen homólogos a RLK como el receptor-S de lectina tipo G, receptor cinasa rico en cisteína, proteína serina/treonina/cinasa y cinasa transmembranal con repetidos ricos en leucina (Hu *et al.*, 2017a; Curtolo *et al.*, 2020a). La expresión de estos genes podría asociarse con el reconocimiento, señalización y activación de genes de respuesta contra CLas; sin embargo, su papel como receptores queda por ser demostrado de manera experimental.

**Homeostasis de estado REDOX:** A pesar de la relevancia de las ROS en la defensa y señalización durante los procesos de patogénesis, y de HLB en particular; en variedades susceptibles se observó disminución de compuestos reductores como tioredoxina y de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) y peroxidasas (POD4), componentes fundamentales para

disminuir el daño oxidativo provocado por ROS (Hu *et al.*, 2017a); por lo que éstas variedades estarían expuestas al estrés oxidativo disparado por las defensas de la planta ante la infección de CLas, conduciendo hacia una ETS. En cambio, en variedades tolerantes se ha reportado una mayor expresión de glutatión S-transferasa (Wang *et al.*, 2016), genes de glutarredoxina como GRXC6, GRXC9 y GRXS9 y de peroxidasas (Cu/Zn-SOD y POD4) (Hu *et al.*, 2017a). Además, hay inducción de genes de biosíntesis de 2-oxoglutarato dioxigenasa dependiente de Fe(II); las cuales catalizan numerosas reacciones oxidativas en las células y participan en la biosíntesis (GA y Etileno) y catabolismo (Aux y SA) de fitohormonas así como biosíntesis de metabolitos secundarios; así como de tioredoxina, proteína del sistema antioxidante Trx (Albrecht y Bowman, 2012); por lo que estas variedades podrían estar más protegidas contra el daño por estrés oxidativo, así como por el daño que provoca el sistema inmune inducido por las vías de señalización de las ROS.

**Genes y Proteínas de resistencia:** En genotipos susceptibles los genes homólogos a genes de patogénesis (PR) no muestran grandes cambios ante la presencia de la bacteria. Shi *et al.* (2017) señalan que en toronja Duncan solo se indujo la expresión del homólogo al gen PR1, mientras que tres PR1 se observan inducidos en la toronja Jackson tolerante (Wang *et al.*, 2016). Además, en mandarina Sun Chu Sha, variedad tolerante tratada con Flg22, se observó mayor expresión de NPR2 y NPR3, reguladores de la expresión de PRs (Shi *et al.*, 2017). Los genes de resistencia constitutiva (CDR1) se expresaron en menor medida en las variedades susceptibles de mandarina Cleopatra, con respecto al híbrido US-897 (Albrecht y Bowman, 2012) y *C. sinensis* (Rawat *et al.*, 2017). Por el contrario, en variedades e híbridos tolerantes de *Poncirus*, CDR1, CDR2 y CDR8 mostraron altos niveles

Cuadro 2. Significado de abreviaciones comúnmente utilizadas en la literatura y en esta revisión.

Abreviación	Significado	Descripción y/o función molecular, bioquímica y/o fisiológica
ABI3/VP1	Factor transcripcional Insensible al ABA 3 ( <i>abscisic acid insensitive3</i> ) / Viviparous1.	Participa en la regulación transcripcional durante el crecimiento, desarrollo y respuestas al estrés abiótico mediando respuestas al ABA.
AGL14	Factores transcripcionales ( <i>Agamous-like</i> ).	AGL Genes homeóticos florales tipo MADS-box.
AP2-EREBP	Factores transcripcionales tipo APETALA 2 / proteínas que unen elementos de respuesta al etileno ( <i>ethylene-responsive element binding proteins</i> ).	Factores transcripcionales de genes que participan diversos procesos en plantas como crecimiento, desarrollo y en la respuesta a estrés.
AS2	Factor transcripcional AS2 (hojas asimétricas).	Participa en la formación de un complejo represores de transcripción de genes KNOX.
Avr2	Efactor de avirulencia 2.	Factor de virulencia que puede inhibir varias Cys proteasas requeridas para la defensa basal de las plantas, incluyendo RCR3. Juega un papel como factor de avirulencia disparando respuestas de inmunidad en plantas que contienen el gen de resistencia I-2.
bZIP	Factor transcripcional con dominio tipo cierre de leucinas ( <i>basic leucine zipper</i> ).	Participa en la regulación de transcripción de genes de desarrollo, crecimiento, estrés biótico y abiótico en plantas.
C2H2	Proteínas con dedos de zinc C2H2 (2 Cisteínas y 2 histidinas).	Participan en diversos procesos en plantas, incluyendo la regulación transcripcional de genes de resistencia a estrés.
Ca <sup>2+</sup>	Iones de calcio.	Segundo mensajero en la respuesta inmune de las plantas.
CAL1	Factores transcripcionales (CAULIFLOWER) tipo MADS-box.	CAL Participan en la regulación de la transcripción de genes que se expresan en procesos fisiológicos como la floración.
CC	Hélice superenrollada ( <i>Coiled coil</i> ).	Dominios de proteínas formados por 2-7 $\alpha$ hélices enroscadas como hilos de una cuerda.
CCAAT-HAP2	Factor de unión CCAAT/ subunidad HAP2.	Factores transcripcionales que participan en diversos procesos durante el desarrollo de las plantas, incluyendo senescencia y respuestas a estrés.
Cf-2	Receptor de tomate homólogo al gen de resistencia de <i>Cladosporium fulvum</i> .	Participa en el reconocimiento de PAMPs e inicia la transducción de señales intracelulares.
CLas	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> .	Patógeno causal de la enfermedad del HLB, cepa asiática.
Ct	Extremo C terminal.	En los PRRs es un dominio intracelular que participa en la señalización de la percepción de PAMPs hacia el interior de la célula.
Dt	Dominio transmembranal.	Parte de del PRRs que atraviesa la bicapa de la membrana.
EDS1/PAD4	Dímero de la proteína que incrementa la susceptibilidad a enfermedad y su coregulador deficiente a fitoalexina ( <i>Enhanced Disease Susceptibility1/ Phytoalexin Deficient 4</i> ).	Proteínas tipo lipasa que coadyuvan con receptores LRR activando cascadas de señalización y confieren inmunidad a patógenos.
ERF23, 26	Factor de respuesta a etileno ( <i>Ethylene response factors</i> )	Factores transcripcionales que regulan la expresión de genes en respuesta a etileno, incluyendo respuestas al ataque de patógenos.



Cuadro 2. Continúa...

Abreviación	Significado	Descripción y/o función molecular, bioquímica y/o fisiológica
ETI	Inmunidad mediada por efectores ( <i>effector-triggered immunity</i> ).	Se activa ante la interacción y reconocimiento específico entre productos de genes de avirulencia de patógenos y los correspondientes genes de resistencia de las plantas
Fla	Flagelina.	Proteína principal del flagelo de bacterias, que actúa como PAMP y al ser reconocida por PRRs elicit la respuesta de defensa de las plantas.
GSL5/PMR4	Glucano sintasa <i>like 5</i> (calosa sintasa) / resistente al moho polvoriento 4.	Participa en la síntesis y deposición de calosa.
HLB	Huanglongbing.	Enfermedad de los cítricos causada por bacterias del género <i>Candidatus Liberibacter</i> .
JA	Ácido jasmónico.	Fitohormona que participa en la respuesta de defensa ante insectos como <i>D. citri</i>
JA-Ile	Jasmonil-isoleucina	Conjugado de JA y el aminoácido isoleucina que participa en la vía de señalización de defensa mediada por SA/JA.
JAZ	Dominio ZIM de jasmonato ( <i>Jasmonate ZIM-domain</i> ).	Dominio de proteínas involucradas diversos procesos de plantas, incluida la respuesta de defensa participando en la señalización de JA.
LBD37	Dominio de proteínas límite de órganos laterales LOB ( <i>protein Lateral Organ boundaries</i> ).	Familia de factores transcripcionales específicos de plantas que participan en la regulación de genes de desarrollo, respuesta a patógenos y metabolismo de nitrógeno y antocianinas.
LORE	Elicitación reducida específica para lipopolisacáridos. ( <i>lipooligosaccharide-specific reduced elicitation</i> ).	PRR tipo receptor cinasa de lectina G, que reconoce lipopolisacáridos o PAMPs tipo ácidos grasos 3-OH de cadena mediana de bacterias dando lugar a una respuesta inmune.
LPS	Lipopolisacáridos.	Componente de la membrana de bacterias que participa como factor de virulencia que interactúa con los receptores LORE de la superficie celular.
LRR	Repeticiones ricas en leucina ( <i>leucine-rich repeats</i> ).	Dominios proteicos con repeticiones ricas en el aminoácido leucina, participan en la interacción proteína-proteína.
LysM-RLK	Receptor tipo RLK con motivos de lisina.	Receptores cinasa con motivos extracelulares que interactúan con MAMPs activando respuestas en plantas que conducen a simbiosis o defensa contra patógenos.
MAMPs/PAMPs	Patrones moleculares asociados a microorganismos/patógenos ( <i>microbe- or pathogen-associated molecular patterns</i> ).	Moléculas señal provenientes de bacterias como lipopolisacáridos, flagelina o lipoproteínas detectados por los receptores.
MAPK	Proteínas cinasa activadas por mitógenos ( <i>Mitogen-activated protein kinase</i> ).	Participan en la transducción de señales en la respuesta inmune de las plantas.
MIC2	Factor transcripcional.	Factor transcripcional bHLH (basic helix-loop-helix) que regula la transcripción de genes que responden a la señal de JA.
MYB	Factores transcripcionales tipo MYB.	En plantas participan en numerosos procesos, incluyendo la regulación de las respuestas a hormonas y a estrés.
NBS	Sitio de unión a nucleótido ( <i>Nucleotide-binding site</i> ).	El dominio NBS en genes R (NBS-LRR) es responsable de la unión e hidrólisis de ATP para la señalización al detectar patógenos.
NPR1	Gen supresor de patogénesis ( <i>Non-expressor of pathogenesis-related genes 1</i> ).	Cofactor transcripcional que actúa como regulador maestro de la resistencia sistémica adquirida (SAR) mediada por SA.
Nt	Extremo N terminal.	En los PRRs el Nt es un dominio extracelular que participa en el reconocimiento de PAMPs para iniciar la señalización.

Cuadro 2. Continúa...

Abreviación	Significado	Descripción y/o función molecular, bioquímica y/o fisiológica
PRRs	Receptores de reconocimiento de patógenos ( <i>Pattern Recognition Receptors</i> ).	Receptores celulares que perciben a moléculas asociadas a patógenos.
PTI	Inmunidad desencadenada por PAMPs ( <i>PAMP-triggered immunity</i> ).	Activación de genes de defensa ante el reconocimiento de PAMPs y posterior señalización.
PTO	Serina/treonina cinasa que confiere resistencia a <i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato.	Gen de resistencia que participa en el reconocimiento de proteínas Avr, transducción de señalización y activación de respuesta de defensa.
RbohD	Proteína D homóloga a oxidasa del <i>burst</i> respiratorio ( <i>respiratory burst oxidase homolog protein</i> ).	Proteína transmembranal que ante la percepción de PAMPs por los receptores, se fosforila y participa en la producción de ROS.
RRC3	Cisteína-proteasa extracelular de tomate homóloga a las Cys-proteasas similares a papaína.	Proteasa extracelular que actúa como correceptor formando un complejo con el PAMP Avr2 para unirse al receptor Cf-2 y disparar la respuesta de hipersensibilidad HR.
RIN4	Proteína que interactúa con RPM1 ( <i>RPM1-interacting protein 4</i> ).	Proteína de membrana que interactúa con efectores de patogenicidad y se une a proteínas de resistencia como RPM1 lo que activa la respuesta inmune.
RLK	Receptor similar a cinasa ( <i>receptor-like kinases</i> ).	Proteínas transmembranales con extremo C-terminal intracelular. Participan en el reconocimiento de PAMPs e inician la transducción de señales fosforilando otras moléculas.
RLP	Receptor similar a proteínas ( <i>Receptor-like proteins</i> ).	Proteínas transmembranales que carecen de extremo C-terminal intracelular. Participan en el reconocimiento de PAMPs e inician la transducción de señales.
ROS	Especies reactivas a oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> ).	Moléculas derivadas del oxígeno molecular altamente oxidantes que participan en la vía de señalización y respuesta inmune.
SA	Ácido salicílico.	Fitohormona que participa en la respuesta de defensa de cítricos ante CLas.
SCF/COII	SCF/COII ubiquitin ligasa.	Complejo mediador de la degradación de JAZ.
7-TM	Receptores transmembranales 7.	Proteínas receptoras con 7 dominios transmembranales que atraviesan la bicapa de la membrana celular y responden a estímulos extracelulares.
Ser/Thr kinasa	Serina/Treonina cinasa.	Enzima que fosforila el hidroxilo (-OH) de la Serina o Treonina. En los receptores RLK es un dominio intracelular con participación en la transducción de señales para la respuesta de defensa de las plantas.
TGAs	Factores transcripcionales tipo bZIP ( <i>basic leucine zipper</i> ).	Forma un complejo transcripcional con NPR1 para inducir la transcripción de genes de defensa PR1.
TIR	Dominio homólogo a receptores de Toll o interleucina-1 ( <i>Toll/Interleukin-1 receptor</i> ).	Dominio N-terminal de receptores NBS-LRR, con repeticiones de leucina que interactúan con los efectores de patógenos.
WRKY	Factores transcripcionales tipo WRKY.	Factores transcripcionales que activan o reprimen la transcripción de genes de muchos procesos en plantas, incluidas las respuestas de defensa.

de expresión (Rawat *et al.*, 2017; Curtolo *et al.*, 2020a). Además, Shi *et al.* (2017) reportaron que ante el tratamiento con Flg22, plantas de mandarina tolerante mostraron una mayor expresión de los genes asociados a resistencia respecto al Pomelo susceptible, como *EDRI* (incremento de resistencia a enfermedades), *EDSI* (incremento de la susceptibilidad a enfermedades), *NDRI* (resistencia a enfermedades no específica a raza), *PBSI* (cinasa que detecta al efector avrPphB), *RARI* (requerido para resistencia a Mla12), *SGTI* (supresor del alelo G2 de *skp* que promueve la HR).

Factores de transcripción: Las familias WRKY y MYB se han considerado como reguladores fundamentales de la respuesta de defensa de plantas contra patógenos. En variedades susceptibles como *C. sinensis* y *C. reticulata* múltiples TFs de la familia WRKY fueron regulados positivamente ante la infección con CLAs, respecto al híbrido US-897 (Albrecht y Bowman, 2012; Fu *et al.*, 2016). Por su parte Curtolo *et al.* (2020a) reportan que alrededor de dos centenas de factores de transcripción son menor o mayormente expresados en variedades susceptibles de cítricos infectados con CLAs mientras que, con notoria diferencia, solo cinco o dos son diferencialmente expresados en la tolerante *P. trifoliata* o el híbrido resistente, respectivamente. Esta enorme diferencia en el número de factores transcripcionales afectados sugiere que los procesos metabólicos y de desarrollo están solo siendo afectados en las variedades susceptibles y no en las tolerantes. Además, Curtolo *et al.* (2020a) encontraron que, en las variedades susceptibles, la mayoría de los WRKY que identificaron con cambios fueron reprimidos ante la infección de CLAs, aunque son distintos a los reportados por Fu *et al.*, (2016). Mientras que en los híbridos tolerantes de *P. trifoliata*, algunos WRKY fueron inducidos, entre ellos los relacionados con la respuesta de defensa mediada por MAPK. Además, otros TFs fueron

reprimidos, particularmente aquellos con dominio SCL (Scarecrow). Los autores sugieren que algunos WRKY podrían estar asociados con los mecanismos de resistencia genética en *P. trifoliata*; sin embargo, su participación en la inducción de las respuestas inmunes y/o en los mecanismos de tolerancia, aún no ha sido demostrada.

Genes de defensa expresados en floema potencialmente asociados a los síntomas de HLB: En la mayoría de los estudios realizados, las variedades susceptibles mostraron obstrucción por calosa asociado al incremento en la expresión de genes relacionados con la síntesis de calosa, así como de proteínas de floema como PP2-B15, las cuales se propone participan junto a la calosa como barrera física que evita la dispersión de CLAs, pero también causan alteraciones en el flujo del floema. Así mismo se indujeron genes codificantes de proteínas cristaloides del floema que participan en la obstrucción de los tubos del tamiz, como *SEOc* y *SEOd* (Curtolo *et al.* 2020a). Además, el metabolismo de carbohidratos es ampliamente afectado en variedades susceptibles con HLB, sobre expresándose genes de la biosíntesis de almidón como los de almidón sintasa (*glgA*) y enzima ramificante del almidón II, y suprimiéndose genes de enzimas que degradan el almidón como las  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas (Martinelli *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017b; Curtolo *et al.*, 2020a). Por el contrario, en genotipos tolerantes no se observa bloqueo en el floema inducido por la calosa y los genes de calosa sintasa no se observan sobre expresados en el híbrido de *P. trifoliata* reportado como resistente (Curtolo *et al.* 2020a); aunque sí hay modulación de genes de proteínas de floema. Además, el metabolismo de carbohidratos se altera en menor grado en *P. trifoliata* según Curtolo *et al.* (2020a) y Hu *et al.* (2017b) reportan la expresión de un gen de  $\alpha$  amilasa (*AAM*), asociado con la degradación de almidón en la variedad tolerante *C. hystrix*. Los perfiles diferenciales

de los genes que afectan el flujo del floema, entre los genotipos susceptibles y tolerantes, sugiere que las variedades tolerantes tienen la capacidad de suprimir la respuesta de defensa ante la infección de CLas, evitando en consecuencia el bloqueo del floema y la acumulación de almidón en cloroplastos, lo que contribuye a que estas variedades no expresen los síntomas foliares.

**Fotosíntesis:** En plantas susceptibles, y acorde con los síntomas de amarillamiento a nivel foliar, se observa disminución de la expresión de proteínas involucradas en reacciones fotosintéticas como proteína de unión a clorofila a/b del complejo cosechador de luz II, proteína del fotosistema II que contiene el dominio psbP y subunidad O del fotosistema I; mientras que en tolerantes como *H. hystrix* los genes que codifican estas proteínas no fueron afectados ante la infección de CLas (Albrecht y Bowman, 2012; Hu *et al.*, 2017a; Curtolo; *et al.*, 2020a).

**Pared celular:** El reforzamiento de la pared celular es una de las respuestas iniciales de defensa de las plantas ante el ataque de patógenos. En variedades susceptibles infectadas con CLas, se observa una regulación negativa de genes relacionados con funciones de la pared celular como los de la biosíntesis de lignina (Curtolo; *et al.*, 2020a), fundamental para la rigidez de la pared celular. Además, se ha reportado una mayor expresión de genes asociados al metabolismo y disrupción pared celular como celulosa sintasa, celulasa, expansinas, pectín esterases y pectin-metiltransferasas (Martinelli *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Curtolo *et al.*, 2020a). Estos cambios sugieren que la colonización de CLas podría ser más rápida en variedades susceptibles debido a una pared celular menos rígida. Por el contrario, en variedades tolerantes la ruta de la biosíntesis de lignina y sus precursores es una de la más sobreexpresada, incluyendo genes como la O-metiltransferasa del ácido cafeico, la feruloil or-

to-hidroxilasa, la hidroxicinamoil transferasa, y el precursor de lacasa (Curtolo *et al.*, 2020a), el cual está involucrado en la degradación de lignina y fue altamente inducido en *P. trifoliata*, mientras que un gen involucrado en la degradación de pectina mostró expresión disminuida. También se reportó una mayor expresión una  $\beta$ -1,3-Glucanasa (Chin *et al.*, 2021) y de proteínas similares a celulosa sintasa (CSLA2 y CSLA9) (Hu *et al.*, 2017a). Con todo ello, se sugiere que los cambios asociados a la estructura de la pared celular en variedades tolerantes podrían contribuir al reforzamiento de barreras físicas para restringir la invasión de CLas (Hu *et al.*, 2017a). Otros genes y metabolitos de defensa: En híbridos considerados como resistentes a CLas por Curtolo *et al.* (2020a), se expresó diferencialmente el gen de la endoquitinasa B. Las endoquitinasas desempeñan un papel importante como bactericidas y algunas tienen la habilidad de romper cadenas de peptidoglicano, conduciendo a la lisis de células bacterianas (De Medeiros *et al.*, 2018). Este híbrido muestra muy pocos cambios transcriptómicos al ser infectado con CLas, comparativamente con la variedad parental y otros híbridos tolerantes. Los autores proponen que el gen de la endoquitinasa juega el papel de gen de resistencia en este genotipo. Además, en el parental tolerante *P. trifoliata* la transcripción de muchos genes involucrados en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides se mostraron afectados, a diferencia de lo observado en las variedades susceptibles (Curtolo *et al.*, 2020a). La fenilamina amonio liasa (PAL) participa en la biosíntesis de moléculas importantes para la defensa de las plantas como los fenilpropanoides, la lignina y el SA, por lo que se ha propuesto que participa en la resistencia a enfermedades mediando la producción de compuestos antimicrobianos y moléculas de señalización. Sin embargo, en la variedad susceptible *C. sinensis* infectada con CLas los niveles de PAL también se incrementaron, por encima de

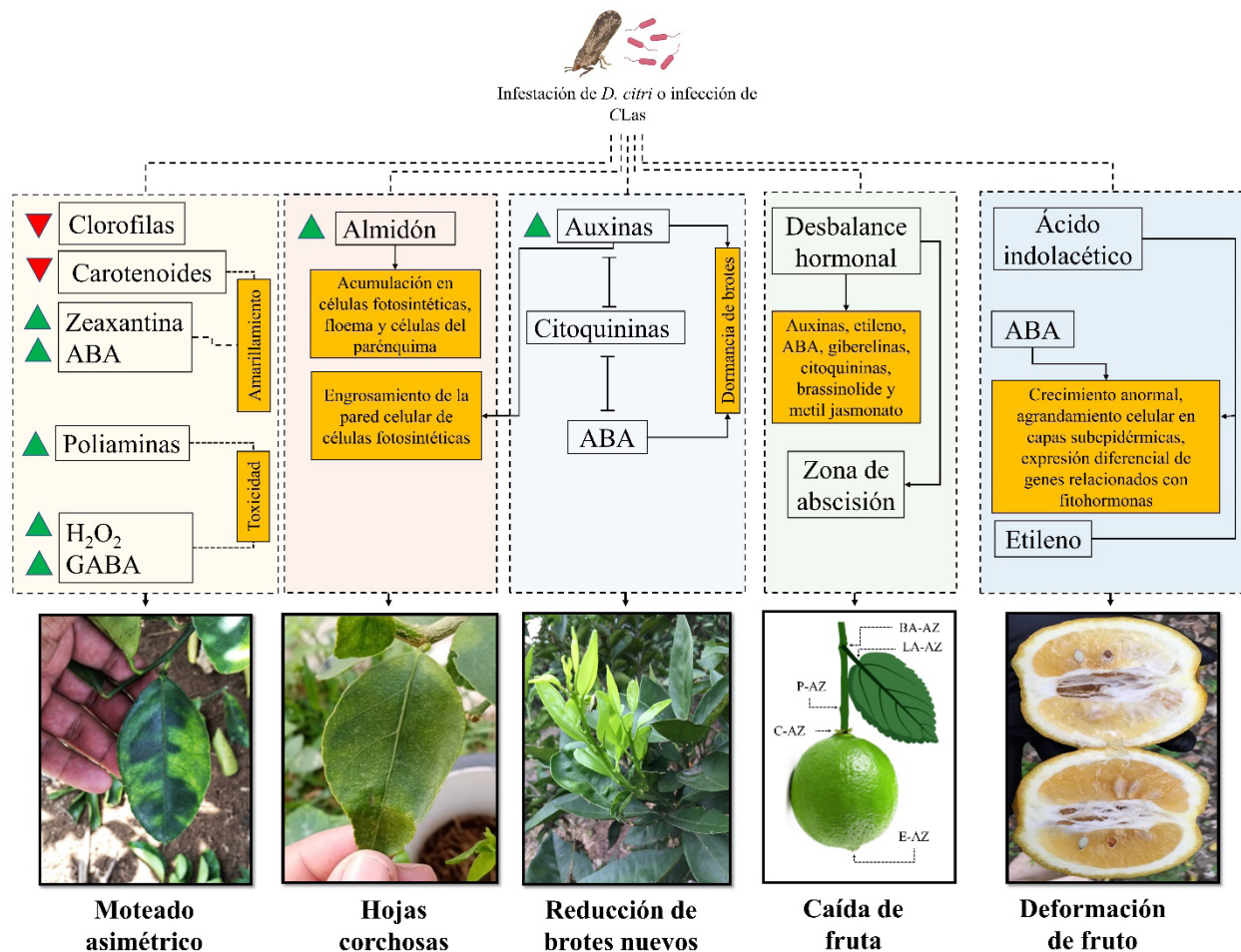


Figura 4. Desbalances metabólicos y de fitohormonas en cítricos ante la infección con CLas o infestación con *D. citri* y su posible relación con los síntomas característicos, como moteado asimétrico, hojas corchosas, reducción de brotes, caída prematura y deformación de fruto. Adaptado de Nehela y Killiny (2020a). BA-AZ= Zona de abscisión basal, LA-AZ= Zona abscisión laminar, P-AZ= Zona abscisión del pedúnculo, C-AZ= Zona abscisión del cáliz, E-AZ= Zona abscisión del estilo, ABA= ácido abscísico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= Peróxido de hidrógeno, GABA= Ácido gama aminobutírico.

los niveles detectados en variedades medianamente tolerantes como *C. aurantifolia* y *C. latifolia* (Torres *et al.*, 2017). Además, en variedades e híbridos susceptibles Curtolo *et al.* (2020a) observaron la inducción de homólogos a proteínas transportadoras de lípidos, las cuáles podrían inhibir el crecimiento de patógenos. El timol es un metabolito reconocido por sus propiedades antimicrobianas (Kachur y Suntres, 2020). Killiny *et al.* (2017) reportaron

que la Mandarina tolerante Sugar belle mostró una mayor concentración de timol y sus precursores  $\gamma$ -terpineno y p-cimeno, comparado con variedades susceptibles como toronja Duncan, tanjerina Dancy, tangelo Minneola y mandarina Clementina. Las proteínas de choque térmico (*Heat shock protein* HSP) participan en la respuesta de defensa de las plantas a estrés biótico y abiótico protegiendo a otras proteínas de desnaturalización y regulan-

do su plegamiento, localización, aglomeración y degradación bajo condiciones de estrés (Balfagón *et al.*, 2018). En el híbrido tolerante US-897 se ha reportado una expresión diferenciada de HSP70 y HSP20 respecto a la mandarina Cleopatra susceptible, aunque con valores de expresión similares entre plantas sanas y enfermas de cada cultivar (Albrecht y Bowman, 2012).

**Fitohormonas:** En cítricos susceptibles infectados con CLas se ha reportado que en hojas se incrementan los niveles endógenos de fitohormonas cuya participación como señales de defensa es bien conocida, como salicilatos (SAs) y jasmonatos (JAs), además de ácido abscísico (ABA) y auxinas (AUX), así como sus genes de biosíntesis; mientras que en frutos enfermos se han observado niveles más bajos de etileno (ET) respecto a frutos sanos (Rosales y Burns, 2011; Nehela *et al.*, 2018). La señalización disparada por las fitohormonas durante procesos de defensa puede activar o reprimir factores transcripcionales que regulan la transcripción de genes de inmunidad.

Respecto a SAs, Nehela *et al.* (2018) reportaron abundancia de ácido benzoico, ácido trans-cinámico y ácido salicílico en cítricos susceptibles, sin embargo, no existen otros reportes sobre la expresión de SAs en cítricos tolerantes con HLB. Además, se ha observado la regulación negativa de la salicilato-carboxil metiltransferasa (SAMT) que produce el Me-SA (Zou *et al.*, 2012) y de UDP-Glicosiltransferasa que modula los niveles y distribución de moléculas de señalización endógenas (Albrecht y Bowman, 2012). En plantas tolerantes como la mandarina Sun Chu Sha, Shi *et al.* (2017) reportaron que la infección con CLas induce genes relacionados con el metabolismo de SA como PAL1 y AZI1 (metabolito móvil requerido para la SAR, inducido por ácido azelaico y asociado a la acumulación de SA ante infecciones). Sin embargo, Curtolo *et al.* (2020a) no encontraron cambios im-

portantes en la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de SA en genotipos tolerantes. Suh *et al.* (2021) reportaron que las vías metabólicas de biosíntesis de hormonas se incrementaron, excepto el SA que fue regulado negativamente en plantas tolerantes. Los autores sugieren que la reducción de SA podría estar asociada con la estrategia de defensa en estos cultivares, evitando la respuesta inmune que genera síntomas.

Respecto a jasmonatos, Yao *et al.* (2020) encontraron una regulación negativa de genes de biosíntesis y señalización de ácido jasmónico JA en frutos sintomáticos de naranja Valencia, como la aleno-óxido ciclasa 3 y 4 (AOC3 y AOC4). En hojas infectadas de variedades susceptibles Curtolo *et al.* (2020a) no encontraron grandes cambios en transcritos relacionados con jasmonatos.

Respecto a las GAs, en genotipos susceptibles Curtolo *et al.* (2020a) reportan inducción de genes de biosíntesis y disminución de transcripción de proteínas que participan en su degradación. Lo opuesto se observó en el genotipo tolerante *P. trifoliata*, donde disminuyen los genes de biosíntesis y se sobre expresan genes clave para la degradación de GAs. El gen *inducido por giberelinas* es uno de los más afectados negativamente. Las GAs son consideradas moduladores de la señalización del SA durante la respuesta a patógenos. Los autores proponen que las GAs juegan un papel relevante en la interacción CLas-cítricos afectando la fisiología de las plantas y el desarrollo de los síntomas. Sin embargo, estos resultados transcripcionales difieren de la propuesta de Ma *et al.* (2022) sobre tratar árboles enfermos susceptibles con GAs para aliviar el daño oxidativo por ROS, así como para manipular la floración y caída prematura de fruta (Tang *et al.*, 2021), por lo que se requieren pruebas en campo respecto a la participación y efecto de las GAs sobre el desarrollo de los síntomas.

La infección por CLas provoca alteraciones en la señalización mediada por AUX en variedades susceptibles, como la regulación negativa de los genes SAUR72 (ARN pequeño regulado positivamente por auxina) y IAA1 (proteína responsiva a ácido indolacético que reprime la función de ARFs, factores transcripcionales que responden a AUX), así como de reguladores negativos de la síntesis de auxinas, lo cual podría ocasionar mayor expresión de expansina y rupturas de la pared celular (Hu *et al.*, 2017b). Curtolo *et al.* (2020a) reportan que muchos genes relacionados a auxinas y etileno fueron diferencialmente expresados en cítricos susceptibles; incluida la sobreexpresión de genes inducidos por auxinas y la disminución de factores responsivos a auxinas; mientras que ambas vías no se afectan en la tolerante *P. trifoliata*. Sin embargo, Wang *et al.* (2016) reportaron una regulación negativa de genes similares a *DMR6* (gen de resistencia al mildew 6) en la tolerante toronja Jackson, el cual participa en la biosíntesis de etileno y ha sido catalogado como supresor de inmunidad en *Arabidopsis*; además de mayor expresión de genes de respuesta a auxinas (SAUR), lo que podría contribuir a una menor expresión de expansina. También, se observó la regulación positiva del factor transcripcional de respuesta a etileno y proteína 1 de la caja F con unión a EIN3 (Wang *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017b).

La melatonina (MEL) también puede tener un papel importante como mediadora de la respuesta de defensa ante la infección de CLas, mediante la modulación de la biosíntesis de otras fitohormonas. Se ha reportado una mayor concentración de MEL en variedades tolerantes (Nehela y Killiny, 2020a). Adicionalmente, la aplicación exógena de MEL mejoró el contenido endógeno de las fitohormonas asociadas con la respuesta al estrés (salicilatos, auxinas, ácido trans-jasmónico y ácido abscísico), por lo que concluyeron que la MEL es mediadora de la respuesta defensiva de plantas contra el HLB (Nehela y Killiny, 2020a).

Carbohidratos simples, aminoácidos y ácidos orgánicos: El metabolismo de carbohidratos es afectado en mayor medida en variedades susceptibles a CLas, principalmente en estados iniciales de infección. Hu *et al.* (2017b) reportaron que en *C. sinensis* se induce la transcripción de genes biosintéticos de almidón como glicógeno sintasa (*glgA*), y disminuye la expresión de genes involucrados en su degradación. Por el contrario, estos genes no sufrieron cambios significativos ante la infección de CLas en *C. hystrix*, genotipo tolerante. Killiny (2017) reportó que las variedades tolerantes mostraron mayor concentración de  $\alpha$ -D-galactopiranosas,  $\alpha$ -D-manopiranosas, maltosa y disacáridos, mientras que los ácidos orgánicos se encontraron en mayor medida en variedades susceptibles. Albrecht *et al.* (2016) reportaron incremento de ácido sacárico, ácido pirrol-2-carboxílico y ácido maleico en variedades susceptibles; mientras que Cevallos-Cevallos *et al.* (2012) observaron incremento en los niveles del ácido butanodioico o succínico. Por otra parte, en variedades susceptibles infectadas con CLas se reportó incremento en la concentración de aminoácidos como lisina, tirosina y glicina en mandarina Cleopatra (Albrecht *et al.*, 2016); o prolina, serina y ácido aspártico en naranja Madam Vinous (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2012). Las variedades tolerantes también expresaron mayor cantidad de aminoácidos como fenilamina, tirosina, triptófano, valina, leucina, histidina, lisina, cisteína, metionina, serina y glutamato (Killiny e Hijaz, 2016), glicina y manosa (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2012); mientras que Suh *et al.* (2021) reportaron que las vías del metabolismo de glutamato y aspartato se regularon positivamente.

Transportadores: Según Curtolo *et al.* (2020a), los genes relacionados al transporte de carbohidratos, aminoácidos e iones es una de las funciones biológicas más afectadas por CLas en variedades susceptibles, respecto a las tolerantes; entre ellos, los genes de transportadores de zinc.

En resumen, la observación general a partir de la comparación de resultados reportados en los diversos trabajos ómicos, es que relativamente pocas rutas y funciones cambian su expresión en las plantas tolerantes, mientras que muchas son afectadas en plantas susceptibles; tanto a nivel transcriptómico, como proteómico y metabolómico. En algunas variedades tolerantes de cítricos, podría existir un sistema de reconocimiento específico de CLas y de detoxificación más eficiente, que evite el daño por ROS y la inducción del sistema inmune ante la infección. Además, parecen incrementar el metabolismo productor de energía, favoreciendo el crecimiento continuo y la regeneración de floema (Deng *et al.*, 2019). La señalización vía fitohormonas parece ser distinta a lo que ocurre en las variedades susceptibles, podría estar mediada por jasmonatos y por la supresión de la señalización de auxinas y degradación de giberelinas, conduciendo a una respuesta de defensa rápida y eficiente a través de la síntesis de fenilpropanoides, endoquitinasas y el fortalecimiento de la pared celular; además de prevenir los eventos que conducen a la disfunción del floema y síntomas derivados (Curtolo *et al.* (2020a). Alternativamente, las variedades tolerantes podrían no responder a la presencia de CLas; o bien, suprimir la respuesta inmune; estableciendo una convivencia con la bacteria en la que la planta no reprograma su expresión génica ni altera sus perfiles proteómicos y metabólicos evitando dañarse a sí misma durante el proceso de defensa, lo que estaría acorde con la propuesta de Ma *et al.* (2022) respecto a que HLB es una enfermedad ocasionada por el sistema inmune de la planta. En ese sentido, da Graça *et al.* (2016) propuso que en las variedades e híbridos tolerantes la respuesta inmune elicitada por los posibles factores de virulencia de CLas es una “potencial ETI”, ya que que no existe suficiente evidencia de que estas variedades desplieguen una ETI.

**Relación de los cambios metabólicos y hormonales con los síntomas de HLB.** Ante la infección por CLas, los árboles infectados de las especies susceptibles responden con un amplio rango de procesos fisiológicos, lo que resulta en la aparición de síntomas característicos asociados al aumento de la concentración bacteriana. En la Figura 4 se resume cómo el desequilibrio y señalización de las fitohormonas, la alteración de metabolitos como carbohidratos, pigmentos, poliaminas o moléculas de señalización como el ácido gama aminobutírico (GABA) y ROS ( $H_2O_2$ ), podrían estar relacionados con el desarrollo de los síntomas fisiológicos o de desarrollo asociados al HLB, como la floración temprana, deformidades de hojas y frutos, o el aborto de semillas (Kim *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2013). Lo anterior coincide con Rosales y Burns (2011), quienes reportaron que la presencia de ABA fue cuatro veces más alta en cáscara de frutos de *C. sinensis* con HLB, y el contenido de ácido indolacético (IAA) fue significativamente mayor en las zonas deformes de la cáscara.

La caída prematura de frutos es también un síntoma comúnmente asociado al HLB. Zhao *et al.* (2019) encontraron que está relacionado con la señalización hormonal, la respuesta de defensa y el metabolismo secundario. Reportan la expresión de genes relacionados con la síntesis y señalización de etileno, así como de ácido jasmónico; además, los niveles de etileno y ácido jasmónico fueron significativamente más altos, mientras que el ácido abscísico fue significativamente más bajo en frutos caídos provenientes de árboles enfermos respecto a frutos provenientes de árboles sanos. Al respecto, Nehela y Killiny (2020b) señalan que la caída prematura de fruta podría estar relacionada con una alteración en la homeostasis del metabolismo en las zonas de abscisión (AZ) del fruto, lo que se relaciona con una limitada disponibilidad de carbohidratos y con la regulación de los procesos de división celular (Figura 4).



La reducción de brotes en estados avanzados de la enfermedad también se ha asociado a un desbalance hormonal, particularmente de la relación auxinas/citoquininas, así como a un incremento en los niveles de ácido abscísico. El moteado asimétrico está asociado con un incremento en la acumulación de zeaxantina y una disminución de pigmentos como clorofila a y carotenoides (Killiny y Nehela, 2017b). Además, ante la infección con CLAs se induce la producción de poliaminas, lo cual se relaciona con la acumulación de  $H_2O_2$  y ácido abscísico en hojas. CLAs logra sobrevivir a la toxicidad del  $H_2O_2$ , sin embargo, la acumulación de altas cantidades de  $H_2O_2$  resulta eventualmente tóxico para el tejido de hojas y ocasiona el moteado asimétrico (Pitino *et al.*, 2017; Killiny y Nehela, 2020).

Por otra parte, la acumulación de almidón en células fotosintéticas, tubos cribosos del floema y células del parénquima en hojas del peciolo se relaciona con el síntoma de hojas corchosas (Whitaker *et al.*, 2014). Nehela y Killiny (2020b) revisaron la participación de diversos metabolitos de cítricos en el desarrollo de los síntomas del HLB. Los autores señalan que los metabolitos juegan un papel vital en el desarrollo de síntomas del HLB en cítricos mediante la modulación del metabolismo de carbohidratos, homeostasis de fitohormonas, vías antioxidantes o interacción con otras vías metabólicas donde participan aminoácidos, pigmentos de hojas y poliaminas (Figura 4).

Con todo lo anterior, se evidencia que la aplicación exógena de hormonas en campo podría ser una alternativa viable para corregir los desequilibrios fitohormonales y metabólicos de las plantas enfermas, además de potenciar las vías de defensa sistémica (Nehela y Killiny, 2020a; Tang *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2022). Para ello, es necesario realizar ensayos bajo condiciones controladas, con las diversas variedades, que permitan comprender a fondo la participación de las fitohormonas y determinar el

manejo apropiado para la contención del desarrollo de la enfermedad.

**Perspectivas futuras.** El estudio de la interacción entre CLAs y las diferentes especies de cítricos con mayor o menor grado de susceptibilidad al HLB a través de herramientas ómicas, han permitido comprender algunos de los recursos genéticos y bioquímicos que utilizan, por un lado el patógeno para mejorar su aptitud en la colonización de las plantas, y por el otro lado las plantas infectadas para mantener la homeostasis celular. En la relación CLAs-cítricos se establece una compleja red de señalización inducidas por potenciales efectores de la bacteria, que provocan cambios cuantiosos como respuestas de defensa en las plantas, incluyendo desbalances metabólicos de aminoácidos, ácidos orgánicos, fitohormonas, poliaminas y metabolitos secundarios; así como la participación de factores transcripcionales, proteínas regulatorias y de defensa; los cuáles, en conjunto, determinan la capacidad de tolerancia o susceptibilidad de los cítricos ante la infección.

Comprender a fondo la etiología de la enfermedad y los mecanismos de susceptibilidad *versus* tolerancia, clarifica opciones para el diseño de estrategias de manejo del HLB en campo con aplicación de micronutrientes, antioxidantes, fitohormonas, elicitores y reguladores de la respuesta inmune o promotores de crecimiento que prolonguen la vida productiva de los árboles infectados; así como para desarrollar variedades genéticamente mejoradas por vía convencional, molecular o por edición génica, que sobre expresen receptores u otros genes de resistencia para confieran respuesta sistémica que prevenga la infección, genes que modulen la respuesta inmune de las plantas, que mitiguen el efecto de las ROS, o controlen al patógeno como péptidos antimicrobianos. Las diversas estrategias a implementar deberán ser adaptadas a las diferen-

tes especies y variedades de cítricos, así como a las diversas regiones cítricas.

Aunque se ha progresado en la comprensión de la compleja relación patógeno-hospedero del patosistema HLB, la capacidad destructiva de la enfermedad maximiza la necesidad de investigación aplicada a la comprensión no solo de los factores moleculares, metabólicos y genéticos asociados a la enfermedad del Huanglongbing, sino también del impacto de la asociación con otras enfermedades como el VTC, y el efecto del ambiente y de aspectos socioculturales en el manejo del HLB; ya que la percepción de los productores sobre la enfermedad y las estrategias de manejo, así como su conocimiento sobre la plaga o del buen uso y manejo de plaguicidas, influye en la efectividad de los agentes utilizados para el control de *D. citri* (Pérez-Zarate *et al.*, 2016; Hernández-Landa *et al.*, 2017; Pérez-Zarate *et al.*, 2020). Así, el desarrollo y la adopción de alternativas de manejo en el campo mexicano, incluyendo tecnologías novedosas y manejos sustentables, requiere que el conocimiento de frontera sea transferido de forma eficiente, rápida y accesible a productores y técnicos de las dependencias de gobierno especializadas, para reforzar la primera línea de batalla en el manejo del Huanglongbing en México y generar políticas que permitan la adopción de las tecnologías venideras.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de doctorado otorgada al primer autor.

#### LITERATURA CITADA

- Albert I, Hua C, Nürnberger T, Pruitt RN and Zhang L. 2020. Surface sensor systems in plant immunity. *Plant Physiology* 182: 1582-1596. <https://doi.org/10.1104/pp.19.0>
- Albrecht U and Bowman KD. 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science* 185-186: 118-130. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.09.008>
- Albrecht U, Fiehn O and Bowman KD. 2016. Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry* 107: 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.030>
- Alder MN, Rogozin IB, Iyer LM, Glazko GV, Cooper MD and Pancer Z. 2005. Diversity and Function of Adaptive Immune Receptors in a Jawless Vertebrate. *Science* 310, 1970-1973. <https://doi.org/10.1126/science.1119420>
- Álvarez S, Rohrig E, Solís D and Thomas MH. 2016. Citrus greening disease (Huanglongbing) in Florida: economic impact, management and the potential for biological control. *Agricultural Research* 5: 109-118. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40003-016-0204-z>
- Ammar ED, Ramos EJ, Hall GD, Dawson OW and Shatters RG, Jr. 2016. Acquisition, replication and inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* following various acquisition periods on huanglongbing-infected citrus by nymphs and adults of the asian citrus psyllid. *PLOS ONE* 11: e0159594. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159594>
- Achor DS, Welker S, Ben-Mahmoud S, Wang C, Folimonova SY, Dutt M, Gowda S and Levy A. 2020. Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement and sieve-pore plugging in citrus sink cells. *Plant Physiology* 182(2): 882-891. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01391>
- Andrade OM, Pang Z, Achor SD, Wang H, Yao T, Singer HB and Wang N. 2020. The flagella of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and its movement in planta. *Molecular Plant Pathology* 21: 109-123. <https://doi.org/10.1111/mpp.12884>
- Aritua V, Achor D, Gmitter GF, Albrigo G and Wang N. 2013. Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. *PLOS ONE* 8: e73742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073742>
- Atta AA, Morgan KT, Kadyampakeni DM and Mahmoud KA. 2021. The effect of foliar and ground-applied essential nutrients on huanglongbing-affected mature citrus trees. *Plants* 10: 925. <https://doi.org/10.3390/plants10050925>
- Balfagón D, Zandalinas SI, Balaño P, Muriach M and Gómez-Cadenas A. 2018. Involvement of ascorbate peroxidase and heat shock proteins on citrus tolerance to combined conditions of drought and high temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* 127: 194-199. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.029>
- Bagio TZ, Canteri MG and Leite-Júnior RP. 2020. Revisiting seed transmission of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in different citrus species and hybrids. *Tropical Plant Pathology* 45: 334-341. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00348-7>
- Bart PHJT, Nürnberger T and Matthieu HAJJ. 2011. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell* 23(1): 4-15. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082602>
- Bassanezi RB, Montesino LH and Stuchi ES. 2009. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 125:565. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9506-3>

- Boina DR and Bloomquist JR. 2015. Chemical control of the asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. *Pest Management Science* 71: 808–823. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25491482/>
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>
- Bové JM. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo, State, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 94: 465-467. <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/2629/1305>.
- Cen Y, Zhang L, Xia Y, Guo J, Deng X, Zhou W, Sequeira R, Gao J, Wang Z, Yue J and Gao Y. 2012. Detection of ‘*Candidatus Liberibacter Asiaticus*’ in *Cacopsylla (Psylla) citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 95: 304-311. <https://doi.org/10.1653/024.095.0210>
- Cevallos-Cevallos JM, Futch DB, Shilts T, Folimonova SY and Reyes-De-Corcuera JI. 2012. GC–MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.010>
- Chin EL, Mishchuk DO, Breksa AP and Slupsky CM. 2014. Metabolite signature of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection in two citrus varieties. *Journal of agricultural and food chemistry* 62: 6585–6591. <https://doi.org/10.1021/jf5017434>
- Chin EL, Ramsey J, Saha S, Mishchuk D, Chavez J, Howe K, Zhong X, Flores-Gonzalez M, Mitrovic E, Polek M, Godfrey K, Mueller LA, Bruce J, Heck M and Slupsky CM. 2021. Multi-omics comparison reveals landscape of *Citrus limon* and *Citrus sinensis* response to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*.’ *PhytoFrontiers*™ 1: 76–84. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-09-20-0018-R>
- Clark K, Franco JY, Schwizer S, Pang Z, Hawara E, Liebrand TWH, Pagliaccia D, Zeng L, Gurung FB, Wang P, Shi J, Wang Y, Ancona V, van der Hoorn RAL, Wang N, Coaker G and Ma W. 2018. An effector from the huanglongbing-associated pathogen targets citrus proteases. *Nature Communications* 9: 1718. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04140-9>
- Cong Q, Kinch LN, Kim B-H and Grishin NV. 2012. Predictive sequence analysis of the *Candidatus Liberibacter asiaticus* proteome. *Plos One* 7: e41071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041071>
- Coyle JF, Lorca GL and Gonzalez CF. 2018. Understanding the physiology of *Liberibacter asiaticus*: an overview of the demonstrated molecular mechanisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 28: 116-127. <https://doi.org/10.1159/000492386>
- Curtolo M, de Souza Pacheco I, Boava LP, Takita, MA, Granato LM, Galdeano DM, de Souza AA, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2020a. Wide-ranging transcriptomic analysis of Poncirus trifoliata, *Citrus sunki*, *Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. *Scientific Reports* 10: 20865. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77840-2>
- Curtolo M, Granato LM, Soratto TAT, Curtolo M, Gazaffi R, Takita MA, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2020b. Expression quantitative trait loci (eQTL) mapping for callose synthases in intergeneric hybrids of *Citrus* challenged with the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Genetics and Molecular Biology* 43: e201990133 <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2019-0133>
- da Graça JV, Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G and Zhao H. 2016. Huanglongbing: an overview of a complex pathosystem ravaging the world’s citrus. *Journal of Integrative Plant Biology* 58: 373-387. <https://doi.org/10.1111/jipb.12437>
- Dalio RJD, Magalhães DM, Rodrigues CM, Arena GD, Oliveira TS, Souza-Neto RR, Picchi SC, Martins PMM, Santos PJC, Maximo HJ, Pacheco IS, De Souza AA and Machado MA. 2017. PAMPs, PRRs, effectors and R-genes associated with citrus–pathogen interactions. *Annals of Botany* 119: 749-774. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw238>
- De Medeiros SC, Onteiro-Júnior JE, Passos Sales GW, rangeto TB and Pinto Nogueira NA. 2018. Chitinases as Antibacterial Proteins: A Systematic Review. *Journal of Young Pharmacists* 10: 144–148. <https://doi.org/10.5530/jyp.2018.10.33>
- Deng H, Achor D, Exteberria E, Yu Q, Du D, Stanton D, Liang G and Gmitter FG. 2019. Phloem regeneration is a mechanism for Huanglongbing-tolerance of “Bearss” Lemon and “LB8-9” Sugar Belle® Mandarin. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00277>
- Dik AJ and Albajes R. 1999. Principles of epidemiology, population biology, damage relationships and integrated control of diseases and pests. Pp: 69-81. *In: Albajes R, Lodovica-Gullino M, van Lenteren JC and Elad Y (Eds.). Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops, Developments in Plant Pathology.* Springer Netherlands, Dordrecht. 545p. [https://doi.org/10.1007/0-306-47585-5\\_6](https://doi.org/10.1007/0-306-47585-5_6)
- Dodds PN and Rathjen, JP. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11: 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y and Gottwald T. 2009. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1011-1020. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>
- Durrant WE and Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 42: 185–209. [10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421)
- Dutt M, Barthe G, Irely M and Gresser J. 2015. Transgenic citrus expressing an *Arabidopsis* NPR1 gene exhibit enhanced resistance against huanglongbing (HLB; citrus gree-

- ning). PLoS ONE 10: e0137134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769–782. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/992/992>.
- Fan J, Chen C, Yu Q, Khalaf A, Achor DS, Brlansky RH, Moore GA, Li Z-G and Gmitter FG. 2012. Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:1396-1407. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-12-0150-R>
- Farnsworth D, Grogan KA, van Bruggen AHC and Moss CB. 2014. The potential economic cost and response to greening in Florida citrus. *Choices: The Magazine of Food, Farm, and Resource Issues* 29. [https://www.choicesmagazine.org/UserFiles/file/cmsarticle\\_393.pdf](https://www.choicesmagazine.org/UserFiles/file/cmsarticle_393.pdf) (consulta, febrero 2022)
- Fleites LA, Jain M, Zhang S and Gabriel DW. 2014. “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” prophage late genes may limit host range and culturability. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 6023-6030. <https://doi.org/10.1128/AEM.01958-14>
- Flor HH. 1971. Current Status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>
- Flores-de la Rosa FR, Santillán-Mendoza R, Rodríguez-Quibarrera CG, Martínez-Ruiz A, Adame-García J and Luna-Rodríguez M. 2021. Antioxidant gene expression, chlorophyll, and starch content in Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka Ex Q. Jiménez) trees with HLB by application of elicitors of plant resistance. *Mexican Journal of Biotechnology* 6: 86–102. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2021.6.2.86>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2015. Pérdidas en producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Gutiérrez-Espinosa MA, Velázquez-Monreal JJ, Domínguez-Monge S, Bassanezi RB, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2017. Diffusion model for describing the regional spread of Huanglongbing from first-reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101: 1119–1127. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- Folimonova SY and Achor DS. 2010. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100: 949–958. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-9-0949>
- Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S and Dawson WO. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99: 1346-1354. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1346>
- Franc L. 2001. The Disease Triangle: A plant pathological paradigm revisited. *Plant Heal. Instr.* DOI: 10.1094/PHIT-2001-0517-01
- Fu S, Shao J, Zhou C and Hartung JS. 2016. Transcriptome analysis of sweet orange trees infected with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and two strains of Citrus tristeza virus. *BMC Genomics* 17: 349. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2663-9>
- Fu ZQ and Dong X. 2013. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64: 839–863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- Ghanim M, Achor D, Ghosh S, Kotsedalov S, Lebedev G and Levy A. 2017. *Candidatus Liberibacter asiaticus* accumulates inside endoplasmic reticulum associated vacuoles in the gut cells of *Diaphorina citri*. *Scientific Reports* 7: 16945. [10.1038/s41598-017-16095-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-16095-w)
- Gottwald TR. 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48:119-139. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114418>
- Granados-Ramírez RG and Hernández-Hernández R. 2018. Reconversión de cultivos como resultado de la presencia del huanglongbing en Colima, México. *Revista Geográfica de América Central* 3: 413-431. <https://doi.org/10.15359/rgac.61-3.21>
- Granato LM, Galdeano DM, D’Alessandre NDR, Breton MC and Machado MA. 2019. Callose synthase family genes plays an important role in the *Citrus* defense response to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *European Journal of Plant Pathology* 155: 25–38. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01747-6>
- Guidetti-Gonzalez S and Carrer H. 2007. Putative resistance genes in the CitEST database. *Genetics and Molecular Biology* 30: 931–942. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000500021>
- Ha PT, He R, Killiny N, Brown JK, Omsland A, Gang DR and Beyenal H. 2019. Host-free biofilm culture of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” the bacterium associated with huanglongbing. *Biofilm* 1: 100005. <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100005>
- Hall DG, Richardson ML, Ammar E-D and Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus Huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 146: 207–223. <https://doi.org/10.1111/eea.12025>
- Hao G, Boyle M, Zhou L and Duan Y. 2013. The intracellular citrus huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter*

- asiaticus' encodes two novel autotransporters. *Plos One* 8: e68921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068921>
- He P, Shan L and Sheen J. 2007. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microbiology* 9: 1385–1396. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00944.x>
- Hernández-Hernández R, Granados-Ramírez RG, Mora-Aguilera G, Aguirre-Gómez R and León-García I. 2019. Reconversión de cultivos como resultado de la presencia de Huanglongbing en Colima, México. *Acta Universitaria* 29: e1921. <http://doi.org/10.15174.au.2019.1921>
- Hernández-Landa L, López-Collado J, Nava-Tablada ME, García-García CG and Osorio-Acosta F. 2017. Percepción de la problemática del Huanglongbing por agentes relevantes en zonas urbanas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 993–1000. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i4.23>
- Hernández-Morales LM, García-Pérez E, Cortés-Flores JJ, Villegas-Monter Á and Mora-Aguilera JA. 2021. Fertilización integral en árboles de naranjo 'Marrs' en producción con síntomas de virus de la tristeza de los cítricos (VTC) y Huanglongbing (HLB). *Revista Fitotecnia Mexicana* 44: 59–66. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.1.59>
- Hodges AW and Spreen TH. 2012. Economic impacts of citrus greening (HLB) in Florida, 2006/07-2010/11. *Electronic Data Information Source FE903*. [https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/23\\_Hodges\\_11.pdf](https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/23_Hodges_11.pdf)
- Hoffman MT, Doud MS, Williams L, Zhang M-Q, Ding F, Stover E, Hall D, Zhang S, Jones L, Gooch M, Fleites L, Dixon W, Gabriel D and Duan Y-P. 2013. Heat treatment eliminates *Candidatus Liberibacter asiaticus* from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology* 103:15–22. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0138-R>
- Hu B, Rao MJ, Deng X, Pandey SS, Hendrich C, Ding F, Wang N and Xu Q. 2021. Molecular signatures between citrus and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plos Pathogens* 17: e1010071. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010071>
- 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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-17-0175-R>
- Hu K, Cao J, Zhang J, Xia F, Ke Y, Zhang H, Xie W, Liu H, Cui Y, Cao Y, Sun X, Xiao J, Li X, Zhang Q and Wang S. 2017a. Improvement of multiple agronomic traits by a disease resistance gene via cell wall reinforcement. *Nature Plants* 3: 1–9. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189229](https://doi.org/10.1038/nplants.2017Hu Y, Zhong X, Liu X, Lou B, Zhou C, Wang X. 2017b. Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of <i>Citrus hystrix</i> in response to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection. <i>PLOS ONE</i> 12: e0189229. <a href=)
- Huang C-Y, Araujo K, Sánchez JN, Kund G, Trumble J, Roper C, Godfrey KE and Jin H. 2021. A stable antimicrobial peptide with dual functions of treating and preventing citrus huanglongbing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 118: e2019628118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019628118>
- Huang M, Roose ML, Yu Q, Du D, Zhang Y, Deng Z, Irely M, Stover E and Gmitter FG Jr. 2018. Construction of high-density genetic maps and detection of QTLs associated with huanglongbing infection in citrus. *Frontiers in Plant Science* 9: 1694. <https://doi.org/10.1101/330753>
- Hurni S, Scheuermann D, Krattinger SG, Kessel B, Wicker T, Herren G, Fitze MN, Breen J, Presterl T, Ouzunova M and Keller B. 2015. The maize disease resistance gene *Htn1* against northern corn leaf blight encodes a wall-associated receptor-like kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112: 8780–8785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502522112>
- Iqbal S, Mahmood S, Mubeen I, Khalid Z and Ayaz M. 2020. Molecular interaction between *Candidatus Liberibacter asiaticus* and citrus: a review. *International Journal of Science and Nature* 11: 17-23. [http://scienceandnature.org/IJSN/IJSN\\_Vol11\(2\)2020/IJSN-Vol11\(2\)20-1.pdf](http://scienceandnature.org/IJSN/IJSN_Vol11(2)2020/IJSN-Vol11(2)20-1.pdf) (Consulta, marzo 2022).
- Jagoueix S, Bove J-M and Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* 44: 379-386. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-379>
- Jain M, Fleites LA and Gabriel DW. 2015. Prophage-encoded peroxidase in 'Candidatus Liberibacter asiaticus' is a secreted effector that suppresses plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 1330-1337. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-15-0145-R>
- Jain M, Munoz-Bodnar A and Gabriel DW. 2019. *Candidatus Liberibacter asiaticus* peroxidase (LasBCP) suppresses oxylipin-mediated defense signaling in citrus. *Journal of Plant Physiology* 236: 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.03.001>
- Jain M, Munoz-Bodnar A, Zhang S and Gabriel DW. 2018. A Secreted 'Candidatus Liberibacter asiaticus' peroxidase simultaneously suppresses both localized and systemic innate immune responses in planta. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31: 1312-1322. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-18-0068-R>
- Jones JGD and Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kachur K and Suntres Z. 2020. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60: 3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Kaloshian I. 2004. Gene-for-gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. *Journal of Chemical Ecology* 30: 2419–2438. <https://doi.org/10.1007/s10886-004-7943-1>
- Killiny N and Hijaz F. 2016. Amino acids implicated in plant defense are higher in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-tolerant citrus varieties. *Plant Signaling & Behavior* 11: e1171449. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1171449>

- Killiny N and Nehela Y. 2017b. One target, two mechanisms: the impact of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and its vector, *Diaphorina citri*, on citrus leaf pigments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30: 543–556. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-17-0045-R>
- Killiny N and Nehela Y. 2020. Citrus polyamines: structure, biosynthesis, and physiological functions. *Plants* 9: 426. <https://doi.org/10.3390/plants9040426>
- Killiny N. 2017. Metabolite signature of the phloem sap of fourteen citrus varieties with different degrees of tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 97: 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2016.11.004>
- Killiny N, Valim MF, Jones SE, Omar AA, Hijaz F, Gmitter FG and Grosser JW. 2017. Metabolically speaking: Possible reasons behind the tolerance of ‘Sugar Belle’ mandarin hybrid to Huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry* 116: 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.05.001>
- Killiny N, Hijaz F, Gonzalez-Blanco P, Jones SE, Pierre MO and Vincent CI. 2020. Effect of adjuvants on oxytetracycline uptake upon foliar application in citrus. *Antibiotics* 9: 677. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100677>
- Kim J-S, Sagaram US, Burns JK, Li J-L and Wang N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50-57. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-1-0050>
- Koh E-J, Zhou L, Williams DS, Park J, Ding N, Duan Y-P and Kang B-H. 2012. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Protoplasma* 249: 687-697. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0312-3>
- 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-16-0257-R>
- Liu YQ, Heying E and Tanumihardjo SA. 2012. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11: 530-545. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
- Liu X, Fan Y, Zhang C, Dai M, Wang X and Li W. 2019. Nuclear import of a secreted “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” protein is temperature dependent and contributes to pathogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Microbiology* 10: 1684. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01684>
- Ma W, Pang Z, Huang X, Xu J, Pandey SS, Li J, Achor DS, Vasconcelos FNC, Hendrich C, Huang Y, Wang W, Lee D, Stanton D and Wang N. 2022. Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. *Nature Communications* 13: 529. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28189-9>
- Mafra V, Martins PK, Francisco CS, Ribeiro-Alves M, Freitas-Astúa J and Machado MA. 2013. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC Genomics* 14: 247. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-247>
- Magalhães DM, Scholte LLS, Silva NV, Oliveira GC, Zipfel C, Takita MA and De Souza AA. 2016. LRR-RLK family from two citrus species: genome-wide identification and evolutionary aspects. *BMC Genomics* 17: 623. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2930-9>
- Manzanilla-Ramírez MÁ, Villegas-Monter Á, Velázquez-Monreal JJ, Zavaleta-Mancera HA, Sandoval-Villa M y Muñoz-Orozco A. 2019. Cambios fisiológicos en árboles de limón mexicano en producción infectados con HLB. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10: 1603–1614. <https://doi.org/10.29312/remexa.v10i7.1957>
- Martinelli F, Reagan RL, Uratsu SL, Phu ML, Albrecht U, Zhao W, Davis CE, Bowman KD and Dandekar AM. 2013. Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. *Plos One* 8: e74256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074256>
- Martinelli F, Reagan RL, Dolan D, Fileccia V and Dandekar AM. 2016. Proteomic analysis highlights the role of detoxification pathways in increased tolerance to huanglongbing disease. *BMC Plant Biology* 16: 167. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0858-5>
- Martini X, Pelz-Stelinski KS and Stelinski LL. 2015. Absence of windbreaks and replanting citrus in solid sets increase density of Asian citrus psyllid populations. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 212:168–174. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.06.027>
- Merfa MV, Pérez-López E, Naranjo E, Jain M, Gabriel DW and De La Fuente L. 2019. Progress and obstacles in culturing *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with huanglongbing. *Phytopathology* 109: 1092–1101. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-19-0051-RVW>
- Nehela Y, Hijaz F, Elzaawely AA, El-Zahaby HM and Killiny, N. 2018. Citrus phytohormonal response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its vector *Diaphorina citri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 102: 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2017.11.004>
- Nehela Y and Killiny N. 2020a. Melatonin is involved in citrus response to the pathogen Huanglongbing via modulation of phytohormonal biosynthesis. *Plant Physiology* 184: 2216-2239. doi: 10.1104/pp.20.00393
- Nehela Y and Killiny N. 2020b. Revisiting the complex pathosystem of huanglongbing: deciphering the role of citrus metabolites in symptom development. *Metabolites* 10: 409. <https://doi.org/10.3390/metabo10100409>
- Nwugo CC, Duan Y and Lin H. 2013. Study on citrus response to huanglongbing highlights a down-regulation of defense-related proteins in lemon plants upon *Ca. Liberibacter asiaticus* infection. *Plos One* 8: e67442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067442>

- Panstruga R, Parker JE and Schulze-Lefert P. 2009. SnapShot: plant immune response pathways. *Cell* 136: 978.e1-978.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.020>
- Pelz-Stelinski KS and Killiny N. 2016. Better together: association with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' increases the reproductive fitness of its insect vector, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Annals of Entomological Society of America* 109: 371–376. <https://doi.org/10.1093/aea/saw007>
- Pérez-Zarate LA, Osorio-Acosta F, Villanueva-Jiménez JA, Ortega-Arenas LD and Chiquito-Contreras RG. 2016. Factores que inciden en el control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama en Áreas Regionales de Control. *Southwestern Entomologist* 41:1037–1050. <https://doi.org/10.3958/059.041.0404>
- Pérez-Zarate LA, Villanueva-Jiménez JA, Osorio-Acosta F, Ortega-Arenas LD and Bustillo-García LC. 2020. Small farmers' perception of factors influencing regional chemical control of *Diaphorina citri*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo* 52: 106–120. <https://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCA/article/view/3028>
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Wees SCM and Bakker PAHM. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52: 347375. [10.1146/annurev-phyto-082712-102340](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340)
- Pitino M, Armstrong CM, Cano LM and Duan Y. 2016. Transient expression of *Candidatus Liberibacter Asiaticus* effector induces cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* 7: 982. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00982>
- Pitino M, Allen V and Duan Y. 2018. LasΔ5315 Effector induces extreme starch accumulation and chlorosis as *Ca. Liberibacter asiaticus* infection in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* 9: 113. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00113>
- Pitino M, Armstrong CM and Duan Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrus plants in response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. *Horticulture Research* 4: 1-8. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40>
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan Y-P, Bowman KD, Gmitter, FG and Deng ZJr. 2017. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. *Horticulture Research* 4: 1-8. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.64>
- Restrepo-Montoya D, Brueggeman R, McClean PE and Osorno JM. 2020. Computational identification of receptor-like kinases "RLK" and receptor-like proteins "RLP" in legumes. *BMC Genomics* 21: 459. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06844-z>
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI 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, 15–31. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- Rosales R and Burns JK. 2011. Phytohormone changes and carbohydrate status in sweet orange fruit from Huanglongbing-infected trees. *Journal of Plant Growth Regulation* 30: 312-321. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9193-0>
- Salcedo D, Mora G, Covarrubias I, Cíntora C, Hinojosa R, DePaolis F and Mora S. 2011. Evaluación del impacto económico de la enfermedad de los cítricos huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana. *COMUNICA* 144: 40-47. <http://repiica.ica.int/docs/b2146e/b2146e.pdf>. (Consulta, febrero 2022).
- Shahzad F, Chun C, Schumann A and Vashisth T. 2020. Nutrient uptake in Huanglongbing-affected sweet orange: transcriptomic and physiological analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 145: 349–362. <https://doi.org/10.21273/JASHS04929-20>
- Sharma N, Selvakumar P, Bhowmik S, Ghosh DK, Kumar P and Sharma AK. 2015. Crystal structure of a periplasmic solute binding protein in metal-free, intermediate and metal-bound states from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Journal of Structural Biology* 189: 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.01.012>
- Sharma N, Selvakumar P, Saini G, Warghane A, Ghosh DK and Sharma AK. 2016. Crystal structure analysis in Zn<sup>2+</sup> bound state and biophysical characterization of CLas-ZnuA2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics* 1864: 1649–1657. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.08.016>
- Shen W, Cevallos-Cevallos JM, Nunes da Rocha U, Arevalo HA, Stansly PA, Roberts PD and van Bruggen AHC. 2013. Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus Liberibacter Ct* values in citrus trees infected with huanglongbing. *European Journal of Plant Pathology* 137: 727-742. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0283-7>
- Shi Q, Febres VJ, Zhang S, Yu F, McCollum G, Hall DG, Moore GA and Stover E. 2017. Identification of gene candidates associated with huanglongbing tolerance, using *Candidatus Liberibacter asiaticus* flagellin 22 as a proxy to challenge citrus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 31: 200-211. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-17-0084-R>
- Shiu S-H and Bleecker AB. 2001. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science Signaling* 2001: re22. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.113.re22>
- Schwessinger B and Zipfel C. 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology, Biotic Interactions* 11, 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.06.001>
- Singerman A and Rogers ME. 2020. The economic challenges of dealing with citrus greening: the case of Florida. *Journal of Integrated Pest Management* 11: 1-7. <https://doi.org/10.1093/jipm/pmz037>
- Singh A, Kumar N, Tomar PPS, Bhowmik S, Ghosh DK, Roy P and Sharma AK. 2017. Characterization of a bacterioferitin comigratory protein family 1-Cys peroxiredoxin from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Protoplasma* 254: 1675-1691. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1062-z>
- Soares JM, Tanwir SE, Grosser JW and Dutt, M. 2020. Development of genetically modified citrus plants for the control of citrus canker and Huanglongbing. *Tropical Plant*

- Pathology 45: 237–250. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00362-9>
- Song X, Bhattarai K, Lv D, Gao F and Ying X. 2017. Can CRISPR win the battle against Huanglongbing? *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 8: 422. doi:10.4172/2157-7471.1000422
- Soratto TAT, Curtolo M, Marengo S, Dezotti AL, Lima RPM, Gazaffi R, Machado MA and Cristofani-Yaly M. 2020. QTL and eQTL mapping associated with host response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrandarins. *Tropical Plant Pathology* 45: 626–645. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00372-7>
- Suh JH, Tang X, Zhang Y, Gmitter FG and Wang Y. 2021. Metabolomic analysis provides new insight into tolerance of Huanglongbing in citrus. *Frontiers in Plant Science* 12: 710598. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.710598>
- Tang L, Singh G, Dewdney M and Vashisth T. 2021. Effects of exogenous gibberellic acid in Huanglongbing-affected sweet orange trees under Florida conditions—I. Flower bud emergence and flower formation. *Horts Science* 56: 1531–1541. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI116080-21>
- Tatineni S, Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Iwanami T and Wang N. 2008. In planta distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology* 98: 592-599. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-5-0592>
- Thapa SP, De Francesco A, Trinh J, Gurung FB, Pang Z, Vidalakis G, Wang N, Ancona V, Ma W and Coaker G. 2020. Genome-wide analyses of *Liberibacter* species provides insights into evolution, phylogenetic relationships, and virulence factors. *Molecular Plant Pathology* 21: 716–731. <https://doi.org/10.1111/mpp.12925>
- Thilmony RL, Chen Z, Bressan RA and Martin GB. 1995. Expression of the tomato Pto gene in tobacco enhances resistance to *Pseudomonas syringae* pv tabaci expressing avrPto. *The Plant Cell* 7: 1529-1536. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.10.1529>
- Timmer LW, Garnsey SM and Graham JH. 2000. Compendium of citrus diseases. APS Press. <http://books.google.com/books?id=fdAnAQAAAJ> (Consulta, diciembre 2021).
- Torres LMF, Olivas AF, Fuentes YMO, Arroyo JIL, Portugal VO, Mendoza AB, Morales SG and Villa VMZ. 2017. Comparison of enzymes and phenolic compounds in three citrus species infected with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Mexican Journal of Phytopathology* 35: 314-325. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1608-2>
- Trinidad-Cruz JR, Rincón-Enríquez G, Quiñones-Aguilar EE, Arce-Leal AP y Leyva-López NE. 2019. Inductores de resistencia vegetal en el control de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón (*Citrus aurantifolia*) mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37: 304-317. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1901-1>
- Uthman QO, Kadyampakeni DM, Nkedi-Kizza P, Barla, NT, Atta AA and Morgan KT. 2020. Comparative response of Huanglongbing-affected sweet orange trees to nitrogen and zinc fertilization under microsprinkler irrigation. *Agriculture* 10: 489. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100489>
- Vahling CM, Duan Y and Lin H. 2010. Characterization of an ATP translocase identified in the destructive plant pathogen “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Journal of Bacteriology* 192: 834-840. <https://doi.org/10.1128/JB.01279-09>
- Vahling-Armstrong CM, Zhou H, Benyon L, Morgan JK and Duan Y. 2012. Two plant bacteria, *S. meliloti* and *Ca. Liberibacter asiaticus*, share functional znuABC homologues that encode for a high affinity zinc uptake system. *Plos One* 7:e37340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037340>
- Ventura-Medina PI, Gutiérrez-Espinosa MA, Febres V, Mora-Aguilera G and Robledo-Paz A. 2019. Identificación y clonación de tres genes endógenos que pueden conferir resistencia a patógenos en cítricos incluyendo CLas y CTV. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37: 1-22. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1906-6>
- Wang N and Trivedi P. 2013. Citrus huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology* 103: 652-665. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW>
- Wang Y, Zhou L, Li D, Dai L, Lawton-Rauh A, Srimani PK, Duan Y and Luo F. 2015. Genome-wide comparative analysis reveals similar types of NBS genes in hybrid *Citrus sinensis* genome and original *Citrus clementine* genome and provides new insights into non-TIR NBS genes. *Plos One* 10: e0121893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121893>
- Wang Y, Zhou L, Yu X, Stover E, Luo F and Duan Y. 2016. Transcriptome profiling of huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible citrus plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. *Frontiers in Plant Science* 7: 933. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00933>
- Wei X, Mira A, Yu Q and Gmitter FG Jr. 2021. The mechanism of citrus host defense response repression at early stages of infection by feeding of *Diaphorina citri* transmitting *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Frontiers in Plant Science* 12: 635153. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635153>
- Whitaker DC, Giurcanu MC, Young LJ, Gonzalez P, Etxeberria E, Roberts P, Hendricks K and Roman F. 2014. Starch content of citrus leaves permits diagnosis of huanglongbing in the warm season but not cool season. *HortScience* 49: 757–762. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.6.757>
- Xia Y, Ouyang G, Sequeira RA, Takeuchi Y, Baez I and Chen J. 2011. A review of huanglongbing (citrus greening) management in citrus using nutritional approaches in China. *Plant Health Progress* 12: 24. <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-1003-01-RV>
- Yao L, Yu Q, Huang M, Song Z, Grosser J, Chen S, Wang Y, Gmitter FG Jr. 2020. Comparative iTRAQ proteomic profiling of sweet orange fruit on sensitive and tolerant rootstocks infected by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*.’ *PLOS ONE* 15: e0228876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228876>
- Ying X, Wan M, Hu L, Zhang J, Li H and Lv D. 2019. Identification of the virulence factors of *Candidatus Liberibacter asiaticus* via heterologous expression in *Nicotiana benthamiana* using tobacco mosaic virus. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 5575. <https://doi.org/10.3390/ijms20225575>



- Zhao W, Baldwin EA, Bai J, Plotto A and Irely M. 2019. Comparative analysis of the transcriptomes of the calyx abscission zone of sweet orange insights into the huanglongbing-associated fruit abscission. *Horticulture Research* 6: 71. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0152-4>
- Zou H, Gowda S, Zhou L, Hajeri S, Chen G and Duan Y. 2012. The destructive citrus pathogen, *Candidatus Liberibacter asiaticus* encodes a functional flagellin characteristic of a pathogen-associated molecular pattern. *Plos One* 7: e46447. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046447>

# Huanglongbing and branch dieback in sour limes in Colima, Mexico

## Huanglongbing y muerte de ramas en limas ácidas in Colima, México

José Joaquín Velázquez-Monreal\*, Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán, Mario Orozco-Santos, Karina de la Paz García-Mariscal, INIFAP Campo Experimental Tecomán, km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, CP 28930, México; Norma Elena Leyva-López, CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquín, Guasave, Sinaloa, CP 81049, México.

\*Autor para correspondencia [velazquez.joaquin@inifap.gob.mx](mailto:velazquez.joaquin@inifap.gob.mx).

Received: September 08, 2022.

Accepted: November 08, 2022.

Velázquez-Monreal JJ, Bermúdez-Guzmán MdeJ, Orozco-Santos M, García-Mariscal KP and Leyva-López NE. 2022. Huanglongbing and branch dieback in sour limes in Colima, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(4): 125-136.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-10>

**Resumen.** En Colima desde 2012 se reportó una muerte de ramas (MR) en los árboles de limón mexicano y persa afectados por HLB, de tal forma que la asociación MR-HLB se presenta en incidencias de 1 a 60%. El objetivo de este trabajo fue determinar la patogenicidad del agente causal de MR y si ésta es favorecida por la infección previa de CLas en plantas de *C. aurantifolia* y *C. latifolia*. Los hongos que se aislaron fueron identificados como *Lasiodiplodia* spp. Solo *L. iraniensis* se identificó molecularmente. Se efectuaron dos pruebas de patogenicidad en invernadero, registrando la incidencia y severidad de MR, para esta última se utilizó una escala convencional de 1 (sano) a 5 (100% de daño en la copa). En la primera prueba

plantas de limón mexicano previamente infectadas con CLas y después individualmente inoculadas con cinco aislamientos del hongo, registraron de 40 a 100% de MR, con severidad de 2.2 a 5.0. En tanto que en la segunda prueba se emplearon plantas sanas de limón mexicano y persa, únicamente un aislado en cada caso ocasionó MR con un 33% de incidencia y con una severidad de 1.0 a 1.6, respectivamente. De las plantas afectadas se reaisló al mismo hongo inoculado en todos los casos.

**Palabras clave:** *Lasiodiplodia*, CLas, *Citrus aurantifolia*, *Citrus latifolia*, enfermedad.

México es el primer productor de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en el mundo. Para el año 2021, se cultivaron 97,918 hectáreas de este frutal con una producción de 1.253 millones de toneladas de fruta (SIAP, 2022). En la región del trópico seco del Pacífico Centro (Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca) se tiene cerca del 97% de la superficie nacional de este cítrico.

En las últimas décadas, el cultivo de limón mexicano ha venido enfrentando nuevos retos y amenazas de tipo fitosanitario que han puesto en riesgo su permanencia como actividad agrícola. En la actualidad el problema más serio de este cítrico es el Huanglongbing (HLB), enfermedad en México asociada a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) (Robles *et al.*, 2018). La cual se detectó por primera vez en abril de 2010 en el estado de Colima, México (Robles *et al.*, 2017), donde en solo tres años, se dispersó rápidamente hasta alcanzar el 100% de distribución estatal. Se estima que los cinco millones de árboles en producción en el estado están en mayor o menor grado afectados por esta enfermedad (Orozco *et al.*, 2016). El impacto económico más significativo del HLB fue por la reducción de los volúmenes de fruta cosechada. En el año 2011, se produjeron 472,875 t en todo el estado de Colima y para los años 2014 y 2015, la producción estatal de fruta fue de 166,805 y 185,285 t, significando una disminución del 64.7 y 60.8%, respectivamente (SIAP, 2022).

El HLB es considerada la enfermedad más grave de los cítricos que afecta actualmente a esta industria a nivel mundial (Bové, 2006; Wang *et al.*, 2016). También se ha señalado que pueden ocurrir otros efectos potenciales en los árboles con HLB, como es una mayor susceptibilidad a otros problemas fitosanitarios entre los que están el ataque del cerambícido de antenas largas de los cítricos (*Anoplophora chinensis*). Además, puede presentarse el ataque de este insecto junto con el fitopatógeno *Phytophthora* cuando ocurren ataques severos de HLB (Halbert y Manjunath, 2004; Batool *et al.*, 2007).

La caída de fruto de naranja antes de la cosecha se ha relacionado con el HLB y en frutos con síntomas de esta enfermedad, como pueden ser menor tamaño, forma asimétrica e inversión de color (Bové, 2006; Dala-Paula *et al.*, 2019), se encontró

a *Lasiodiplodia theobromae*, asociado a la pudrición del pedúnculo de frutos, induciendo una mayor zona de abscisión en ellos, sugiriéndose que al establecerse el hongo en dicha zona se incrementa la caída de los mismos en precosecha (Zhao *et al.*, 2015; 2016; 2019).

*L. theobromae* es un hongo cosmopolita y con una gama amplia de hospedantes. Puede presentarse como saprófito, parásito y endófito, en esta última situación se encuentra latente dentro de su hospedero, después cambia a patógeno y ocasiona síntomas de la enfermedad cuando las plantas se encuentran en condiciones desfavorables (Slippers y Wingfield, 2007; Netto *et al.*, 2014; Paolinelli-Alfonso *et al.*, 2016; Coutinho *et al.*, 2017; Noriega-Cantú, 2017; Sathya *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). En México, *L. theobromae* se ha reportado afectando diversos cultivos maderables y frutícolas como son pinos, aguacate, anonáceas, cacao, cítricos, jamaica, mamey, mango, marañón, nogal pecanero, papayo, rambután y vid (Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

En Colima además de los efectos negativos del HLB en limón mexicano, así como en otros cítricos como limón persa (*Citrus latifolia*), cultivo de menor superficie establecida en el estado, se ha observado en huertos mayores de cuatro años un problema de muerte de ramas (Figura 1), sugiriendo una notoria asociación entre ésta con el HLB. Esta muerte de ramas antes de la presencia del HLB en Colima sucedía con una incidencia relativamente baja y sólo en huertos de limón mexicano donde los árboles tenían poco vigor por estar en condiciones desfavorables como son sequía, nutrición deficiente y suelos degradados o compactos, entre otras. Pero, desde el año 2012 se han registrado incidencias del 1 al 60% en árboles afectados con HLB y en ataque severos es capaz de matar hasta el 50% o más de la copa de los árboles. En las ramas, el problema aparece como manchas de aspecto acei-



Figura 1. Árbol de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con síntomas de muerte de ramas y HLB (A). Árbol con HLB, muerte de ramas y defoliación (B).

tosos, en las cuales se presenta exudación de goma café claro. Después las lesiones se vuelven oscuras y las ramas afectadas se colapsan. Las hojas se “abarquillan” como si les faltara agua, se vuelven cloróticas, se secan y luego se desprenden del árbol (Orozco-Santos *et al.*, 2014).

A pesar del incremento de daños observados en árboles de limón mexicano y limón persa por el complejo HLB-muerte de ramas, recientemente no se han reportado estudios de patogenicidad para validar la identidad del agente causal de muerte de ramas. El objetivo de este trabajo fue determinar la patogenicidad del agente causal de la enfermedad de muerte de ramas y si ésta es favorecida por la infección previa de CLas en plantas de *C. aurantifolia* y *C. latifolia*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se realizaron dos experimentos en condiciones de invernadero en el Campo Expe-

rimental (C.E.) Tecomán del INIFAP, uno con plantas infectadas con CLas y otro con plantas sanas, en ambos casos las plantas fueron utilizadas para pruebas de patogenicidad con aislamientos de *Lasioidiplodia* sp.

**Obtención e identificación morfológica de aislamientos fungosos.** Esta fase se realizó en el laboratorio de Biotecnología del C.E. Tecomán. En campo se obtuvieron muestras vegetativas de limón mexicano y limón persa con síntomas iniciales de muerte de ramas (Cuadro 1), entre el área de avance de la lesión y el tejido sano se cortaron segmentos de aproximadamente 10 mm de longitud, los cuales fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, después se lavaron dos veces en agua destilada estéril y se procedió a sembrarlos en placas de papa-dextrosa-agar (PDA) a temperatura ambiente. Posteriormente, los aislamientos fueron subcultivados en PDA con el propósito de permitir la formación de estructuras reproductivas y proceder a su identificación considerando sus características morfológicas.

Cuadro 1. Hospederos y localización del lugar del estado de Colima donde se obtuvieron los aislamientos fungosos de cítricos empleados en las pruebas de patogenicidad.

Aislado	Hospedero	Municipio	Coordenadas
A1T	Limón mexicano	Tecomán	Lat-18°57'53.98" N; Long. 103°50'32.26" O
A2A	Limón mexicano	Armería	Lat- 18°56'02.57" N; Long. 103°58'52.75" O
A3F	Limón mexicano	Tecomán	Lat- 18°57'53.98" N; Long. 103°50'32.26" O
A4P	Limón persa	Tecomán	Lat- 18°56'12.46" N; Long. 103°54'01.70" O

**Identificación molecular de aislamientos de hongos.** La extracción de ADN se realizó a partir de 1 g de micelio utilizando el kit DNeasy®Plant Mini (QIAGEN) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La pureza y cuantificación de los ácidos nucleicos se efectuó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para el PCR se usó el kit Taq PCR Master mix (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante para un volumen de 25 µL. Se emplearon los oligonucleótidos ITS1/ITS4 descritos previamente por White *et al.* (1990) y la PCR se llevó a cabo con las condiciones reportadas por Manter y Vivanco (2007). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X, se visualizaron con bromuro de etidio, y se secuenciaron las dos hebras (forward y reverse) por el método de Sanger. La edición de las secuencias, así como el análisis BLAST en la base de datos

de NCBI se realizaron con el software CLC Main Workbench versión 8.1 de QIAGEN.

**Infección de plantas de limón mexicano con CLAs.** Para el experimento 1, plantas sanas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) var. Colimex (adquiridas en un vivero certificado) fueron inoculadas individualmente con CLAs, injertándoles dos varetas de 5 cm de longitud encima del portainjerto (Figura 2 A y B). Las plantas se mantuvieron en el invernadero y en observación para la aparición de síntomas. A las 4 y 8 semanas después se confirmó la infección por CLAs mediante PCR tiempo real en el laboratorio de Biotecnología del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. Para ello la extracción de ADN se hizo empleando 200 mg de tejido de nervadura central mediante el método del CTAB con algunas modificaciones (Zhang *et al.*, 1998; Arratia-Castro *et al.*, 2014), una vez obtenido el ADN se verificó



Figura 2. Transmisión de HLB a plantas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) mediante injerto de dos varetas infectadas (A y B). Síntomas de HLB en planta inoculada por injerto (C).

su calidad como se mencionó anteriormente. Las reacciones de PCR se realizaron con el kit SsoFast EvaGreen® Supermix (Bio-Radt) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La PCR tiempo real se llevó a cabo en el equipo CFX96TM (Bio-Radt) con los oligonucleótidos y condiciones de amplificación descritos por Li *et al.* (2006) para la identificación de CLas.

### Experimento 1 con plantas infectadas con CLas.

Tres aislamientos de hongo obtenidos de limón mexicano (A1T, A2A y A3F), uno de limón persa (A4P) y otro de mango (A5M) que ya se tenía en el laboratorio, procedente del municipio de Cihuatlán, Jalisco (Lat. 19°14'53.57" N; Long. 104°40'05.92" O), se inocularon cada uno en cinco plantas de limón mexicano que tenían 8.5 meses de infectadas con CLas además se incluyó un testigo, el cual consistió en cinco plantas de la misma especie y variedad con HLB que se inocularon con medio de cultivo PDA sin micelio fungoso. La inoculación del hongo se efectuó en dos ramas de cada planta haciendo un corte paralelo para permitir levantar la corteza y colocar debajo de la misma 1 cm<sup>2</sup> de PDA con crecimiento micelial del aislado fungoso a inocular; se selló envolviendo el sitio de inoculación con un trozo de algodón que se mantuvo húmedo con agua estéril por tres días. Las plantas se mantuvieron en observación para la detección de síntomas de muerte de ramas, los cuales aparecieron a los 14 días posteriores a la inoculación del hongo (DPIH). También a partir de ahí se midió durante 10 días el avance de la lesión desde el sitio de inoculación. Finalmente, a los 180 DPIH se registró la severidad de la enfermedad utilizando una escala convencional del 1 al 5 (donde 1 era sano; 2, 3, 4 y 5 representaron 25, 50, 75 y 100% de daño en la copa de la planta, respectivamente). De las plantas que resultaron afectadas, en el laborato-

rio de Biotecnología del C.E. Tecomán se reaisló el hongo inoculado verificando sus características morfológicas.

**Experimento 2 con plantas sanas.** En la segunda prueba de patogenicidad de la forma ya descrita los aislados A1T, A2A y A3F individualmente se inocularon en tres plantas sanas de limón mexicano var. Colimex certificadas; en tanto que los aislados A3F, A4P y A5M se inocularon cada uno en tres plantas sanas de limón persa certificadas; se agregó para cada caso un testigo con igual número de repeticiones que se inocularon únicamente con medio de cultivo PDA. Las plantas se conservaron en observación con el fin de precisar la manifestación de síntomas de muerte de ramas y, a partir de ahí registrar el avance de la enfermedad y la severidad de la misma a los 180 DPIH mediante la escala ya indicada. Y en el laboratorio de plantas que resultaron afectadas reaislar el hongo que se les inoculó.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Obtención e identificación morfológica de aislamientos fungosos.** Los hongos que se obtuvieron de las muestras de limón mexicano, limón persa y mango y que se inocularon a las plantas de las dos especies de cítricos mencionadas y, que además se reaislaron de las plantas que mostraron muerte de ramas presentaron las características reportadas para *Lasiodiplodia* sp., las cuales fueron crecimiento en el medio de cultivo PDA con la formación de micelio inicialmente blanco, volviéndose gris y oscureciendo al transcurrir el tiempo (Figura 3 A), los conidios al principio eran de forma ovalada o elipsoidal, hialinos, unicelulares y granulares, en tanto que cuando maduraron eran oscuros y septados (Orozco-Santos, 2014; Polanco *et al.*, 2019).

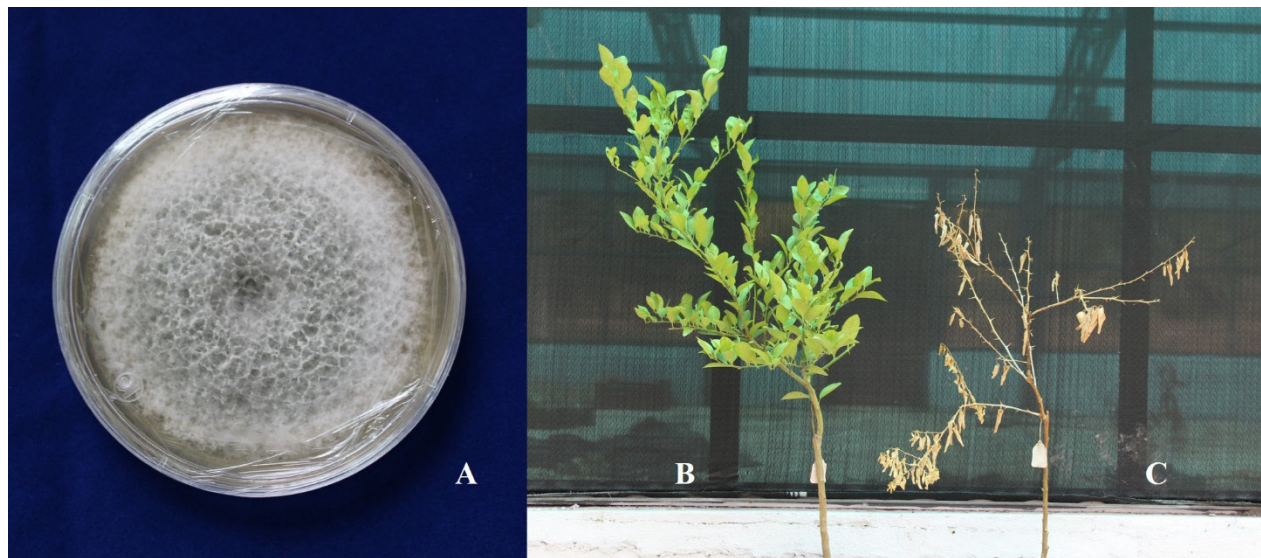


Figura 3. Colonia de *Lasiodiplodia* spp. (A). Plantas de limón mexicano: testigo (B) e inoculada con *Lasiodiplodia* spp. mostrando muerte de ramas (C)

**Identificación molecular de aislamientos de hongos.** El análisis BLAST en la base de datos de NCBI reveló que las secuencias de las regiones ITS tuvieron 100% de identidad (secuencias homólogas) con otras reportadas en la base de datos. Estas secuencias homólogas y de acuerdo con otros aislamientos de *Lasiodiplodia* spp. procedentes

de diversos cultivos en México fueron tomados en cuenta para determinar el origen de cada aislamiento (Cuadro 2). El único aislamiento que se logró determinar plenamente fue el A1T que resultó ser *L. iraniensis*, basado en que tuvo los mayores valores de porcentaje de identidad 99.82% y una cobertura del 541/542 nucleótidos. El resto de los

Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de *Lasiodiplodia* spp. en árboles frutales.

Aislado	Agente causal (Morfología)	Probables agentes causales y porcentaje de identidad (secuenciación)	Hospedero
A4P	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. theobromae</i> (100%) <i>L. pseudotheobromae</i> (100%) <i>L. iraniensis</i> (100%)	Limón mexicano
A3F	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. theobromae</i> (100%) <i>L. brasiliense</i> (100%)	Limón persa
A2A	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. theobromae</i> (100%) <i>L. pseudotheobromae</i> (100%) <i>L. iraniensis</i> (100%)	Limón mexicano
A5M	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. theobromae</i> (100%) <i>L. pseudotheobromae</i> (100%) <i>L. iraniensis</i> (100%)	Mango
A1T	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. iraniensis</i> (99.82%)	Limón mexicano

aislamientos tienen 100% de identidad con 2 a 3 probables agentes causales, entre *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. iraniensis* y *L. brasiliense* (Cuadro 2).

Con base en el análisis BLAST realizado no fue posible definir con certeza las especies del género *Lasiodiplodia* de árboles de limón mexicano (*C. aurantifolia*) y de limón persa (*C. latifolia*) procedentes de Colima. La región ITS que se utilizó en este estudio tiene una longitud más corta (454 caracteres) que la reportada por otros autores, esto es debido al juego de oligonucleótidos utilizado: ITS1/ITS4 en este estudio y, por otra parte, ITS5/ITS4 en otros reportes, genera mayor cantidad de caracteres para el análisis filogenético, 531 en el caso de Bautista-Cruz *et al.* (2019). El alineamiento múltiple de secuencias (datos no mostrados) evidenció que para especies de *Lasiodiplodia* spp. la región ITS tiene muy poca variabilidad genética, por lo que es una región poco informativa y por tal razón los resultados del análisis BLAST en la base de datos de NCBI tienen homología con varias especies de *Lasiodiplodia*. Por tal motivo, resulta necesario realizar un análisis filogenético tomando en cuenta otras regiones de otros genes que se han reportado para este tipo de análisis en *Lasiodiplodia*: el factor de elongación de la traducción-1  $\alpha$  (*tefl*) y el gen parcial de la  $\beta$ -tubulina (*tub2*) (Coutinho *et al.* 2017; Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019).

**Infeción de plantas de limón mexicano con HLB.** En el caso de las plantas del primer experimento, los resultados del análisis por PCR en tiempo real corroboraron la infección por CLAs, bacteria asociada al HLB, en las plantas de limón mexicano inoculadas por injerto inicialmente. Estas plantas a los tres meses también empezaron a mostrar el síntoma de moteado asimétrico (Figura 2 C) en las hojas que es característico del HLB (Bové, 2006; Robles-González *et al.*, 2014).

### Experimento 1 con plantas infectadas con CLAs.

En la primera prueba de patogenicidad, luego de que las plantas fueron inoculadas con los aislamientos fúngicos identificados como *Lasiodiplodia* spp., la manifestación de los síntomas al principio fueron marchitez de hojas a los 14 días posteriores a la inoculación del hongo (DPIH), observándose el avance descendente de la muerte de ramas desde el sitio de inoculación a los 16 DPIH y a los 19 DPIH las plantas ya presentaban caída de hojas. El avance promedio de la muerte del tallo de ramas varió de 2.5 a 16.3 cm a los 23 DPIH. En tanto que las plantas testigo se mantenían sanas (Figura 3 B). La muerte total o parcial ocurrió (Figura 3 C) en el limón mexicano (copa) pero no en el patrón de las plantas, el cual llegó a emitir brotes en la base al no ser afectado y mantenerse vivo. La incidencia de muerte de ramas ocasionada por los cinco aislamientos del hongo en esta prueba de patogenicidad con limón mexicano positivo al CLAs varió de 40 a 100% (Cuadro 3), en tanto que la severidad tuvo valores de 2.2 a 5.0 (Cuadro 4), siendo el máximo valor para el aislamiento A5M (obtenido de mango), el cual también causó el 100% de muerte de plantas (Cuadro 3) por lo que se puede considerar como el más agresivo. *Lasiodiplodia* en México es reportado afectando mango (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013; Noriega-Cantú *et al.*, 2017) y cítricos (Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Polanco *et al.*, 2019; Valle-de la Paz *et al.*, 2019).

**Experimento 2 con plantas sanas.** En la segunda prueba de patogenicidad con plantas sanas certificadas de limón mexicano y limón persa inoculadas con tres aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., únicamente los aislados A2A y A5M ocasionaron muerte de ramas en un 33% de ellas (Cuadro 3) con una severidad de 1.0 y 1.6, respectivamente; estos valores fueron menores a los observados en plantas de limón mexicano positivas al CLAs (Cuadro 4).



**Cuadro 3. Incidencia de muerte de ramas a los 180 días en plantas de limón mexicano afectadas por HLB e inoculadas con cinco aislados de *Lasiodiplodia* sp.**

Especie	Testigo	Aislados de <i>Lasiodiplodia</i>				
		A1T (Limón mexicano)	A2A (Limón mexicano)	A3F (Limón mexicano)	A4P (Limón persa)	A5M (Fruto mango)
Limón mexicano HLB (+)	0%	40%	40%	40%	80%	100%
Limón mexicano HLB (-)	0%	0%	33%	0%	-----	-----
Limón persa HLB (-)	0%	-----	-----	0%	0%	33%

**Cuadro 4. Severidad promedio de muerte de ramas a los 180 días en plantas de limón mexicano afectadas por HLB e inoculadas con cinco aislados de *Lasiodiplodia* sp.**

Especie	Testigo	Aislados de <i>Lasiodiplodia</i>				
		A1T (Limón mexicano)	A2A (Limón mexicano)	A3F (Limón mexicano)	AP4 (Limón persa)	A5M (Fruto mango)
Limón mexicano HLB (+)	1.0	2.2	2.2	2.2	4.2	5.0
Limón mexicano HLB (-)	1.0	1.0	2.3	1.0	-----	-----
Limón persa HLB (-)	1.0	-----	-----	1.0	1.0	1.6

Escala Severidad: 1.0 = sano; 2.0 = 25% de daño, 3.0 = 50% de daño, 4.0 = 75% de daño y 5 = 100% de daño en copa por muerte de ramas.

También de estas plantas afectadas se reaisló al mismo hongo inoculado.

El número de plantas positivas o negativas a CLas que se infectaron con cada aislado de *Lasiodiplodia* varió, así como la longitud, avance de la infección, en la etapa inicial y la severidad de la enfermedad a los 180 DPIH. Todo esto puede indicar diferencias en la agresividad entre los aislados del hongo evaluados en este estudio. La diferencia en agresividad entre aislados y especies de *Lasiodiplodia* fue detectada también en mango (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017).

De las dos pruebas de patogenicidad realizadas con los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp. en este estudio, se obtuvo una mayor incidencia y severidad de muerte de ramas en plantas de limón mexicano infectadas con CLas, lo cual puede ser un indicativo de que este último patógeno favorezca a que también el hongo actúe como patógeno y por ello se tienen en la actualidad reportes de problemas de muerte de ramas en cítricos en México (Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Polanco *et al.*, 2019; Valle-de la Paz *et al.*, 2019). Aunque no se indica en estos reportes de alguna relación con el HLB, esta

enfermedad está presente en México desde el año 2009 y se encuentra ampliamente distribuida en las zonas citrícolas del país. Así como en naranja se reporta una mayor caída de frutos con síntomas de HLB e infectados con *L. theobromae* (Zhao *et al.*, 2015). Se puede esperar que en Colima la muerte de ramas en limón mexicano y limón persa no sean un problema separado si no que está influido por la infección de CLas. Y que en las plantas sea un complejo de los dos patógenos y por ello se registró un mayor daño por muerte de ramas después de la presencia de CLas en Colima (Orozco *et al.*, 2014).

*Lasioidiplodia* es miembro de la familia Botryosphaeriaceae, que incluye hongos saprófitos, patógenos y endófitos, en la cual se ha observado la asociación entre patogénesis y el estrés del hospedante (Slippers y Wingfield, 2007; Mondragón-Flores *et al.*, 2021). El estrés induce cambios físicos, fisiológicos y químicos reduciendo la energía disponible para la defensa de las plantas, las cuales proveen de energía a los patógenos volviéndolas más susceptibles al ataque de éstos que pueden ser secundarios en la secuencia de eventos (Wargo, 1996). En este estudio, la mayor incidencia de muerte de ramas ocurrió en plantas primeramente infectadas con CLas, por lo que el ataque de *Lasioidiplodia* spp. se puede considerar secundario que afectó plantas debilitadas o estresadas por efecto del HLB. Tal como podría estar sucediendo con la pudrición del pedúnculo por *L. theobromae* en frutos de naranja con síntomas de HLB, habiéndose mostrado consistentemente una correlación positiva entre la infección del hongo y la caída de frutos, de forma tal que la infección secundaria por el hongo en el cáliz incrementa la abscisión de frutos (Zhao *et al.*, 2015; 2016; 2019). En limón mexicano y limón persa pudiera haber una relación similar a la correlación anterior dado que se trata del mismo género botánico, *Citrus*, de plantas.

CLas despliega proteínas efectoras en los organelos de las células vegetales, mitocondrias cloro-

plastos, que manipulan la resistencia basal o inmunidad y la fisiología de la planta (Pitino *et al.*, 2017). Es de esperar que el HLB induzca cambios que alteren la fisiología de las plantas y puedan quedar susceptibles al ataque de otros patógenos. Después de la infección por CLas en dos cultivares relacionados de toronja, uno tolerante y otro susceptible, se determinó que se expresaron diferencialmente 686 genes, de los cuales se sobre-expresaron y sub-expresaron el 36 y 64%, respectivamente, en los árboles tolerantes, suprimiéndose o activando rutas que conducen a la activación de la resistencia basal (Wang *et al.*, 2016). De esta forma se ha señalado que entre los efectos potenciales del HLB está una mayor susceptibilidad a otros problemas fitosanitarios como el ataque individual del cerambícido de antenas largas de los cítricos (*A. chinensis*) o junto con *Phytophthora*, la infección de *L. theobromae* en la zona de abscisión del cáliz y el incremento de la infección de la raíz por *P. nicotianae* (Halbert y Manjunath, 2004; Batool *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017).

En el presente estudio se utilizaron plantas sanas certificadas, obteniéndose mayor número de plantas afectadas por *Lasioidiplodia* spp. cuando se inoculó el hongo en plantas previamente infectadas con CLas ocasionando la infección primaria que favoreció a *Lasioidiplodia* como un patógeno secundario.

En áreas citrícolas donde los programas de certificación no están correctamente establecidos o no existen, es probable que las infecciones mixtas sean comunes, como en el Centro-Norte de Veracruz, México, donde las plantas de cítricos pueden presentar psorosis (CPsV), exocortis (CEVd), caquexia (CVd-II) y HLB (CLas), existiendo enfermedades adicionales causadas por patógenos como *Phytophthora*, *Lasioidiplodia* y *Colletotrichum* (Contreras-Maya *et al.*, 2022). Por lo que es importante que se realicen estudios que relacionen la asociación de CLas con otros fitopatógenos.

## CONCLUSIONES

De muestras procedentes de árboles de limón mexicano y limón persa afectados por muerte de ramas se aisló al hongo *Lasiodiplodia* spp., habiéndose identificado molecularmente solo a *L. iranien-sis* de cinco aislamientos evaluados. En pruebas de patogenicidad de los aislados del hongo empleando plantas de limón infectadas con CLas y plantas sanas de limón mexicano y de limón persa, la mayor incidencia (40-100%) y severidad (2.2-5.0) de muerte de ramas ocurrió en las plantas que estaban infectadas por CLas. Por lo *Lasiodiplodia* spp. resultó un patógeno secundario, cuya infección al parecer es favorecida por la infección previa de CLas. En las plantas negativas a CLas, la muerte de ramas tuvo una menor incidencia (33%) y menor severidad (1.0-2.3).

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias por el financiamiento del proyecto de investigación: Generación de un paquete tecnológico de limón mexicano variedad Lise bajo un escenario de Huanglongbing.

## LITERATURA CITADA

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>
- Batool A, Iftikhar Y, Mughal MS, Khan MM, Jaskani JM, Abbas M and Khan AI. 2007. Citrus greening disease – A major cause of citrus decline in the world: A review. *Horticultural Science*. 34: 159-166. <https://doi.org/10.17221/1897-HORTSCI>
- Bautista-Cruz MA, Almaguer-Vargas G, Leyva-Mir SG, Colinas-León MT, Correia KC, Camacho-Tapia M, Robles-Yerena L, Michereff SJ and Tovar-Pedroza JM. 2019. Phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of Persian lime in Mexico. *Plant Disease* 103 (6): 1156-1165. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-18-1036-RE>
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88 (1): 7-37. <https://www.jstor.org/stable/41998278> <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>
- Contreras-Maya R, Villegas-Monter A, Santacruz-Varela A, Cruz-Huerta N, Ortega-Arenas LD, and Ochoa-Martínez D. 2022. Prevalence of Mild T30, T3, and Severe VT Strains of *Citrus Tristeza Virus* in Central-Northern Veracruz, Mexico. *American Journal of Plant Sciences* 13: 494-505. <https://doi.org/10.4236/ajps.2022.134032>
- Coutinho IBL, Freire FCO, Lima CS, Lima JS, Goncalves FJT, Machado AR, Silva AMS and Cardoso JE. 2017. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathology* 66: 90-104. <https://doi.org/10.1111/ppa.12565>
- Dala-Pala BM, Plotto A, Bai J, Manthey JA, Baldwin EA, Ferrarezi RS and Gloria MBA. 2019. Effect of Huanglongbing or Greening Disease on Orange Juice Quality, a Review. *Frontiers in Plant Science* 9:1976. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01976>
- Halbert SE and Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllids (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3):330-353. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0330:ACPSPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0330:ACPSPA]2.0.CO;2)
- Li W, Hartung JS, and Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Manter DK and Vivanco JM. 2007. Use of the ITS primers, ITS<sub>1</sub>F and ITS<sub>4</sub>, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 71(1): 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.016>
- Mondragón-Flores A, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Guerra-Santos JJ y Fernández-Pavía SP. 2021. Botryosphaeriaceae: una familia de hongos, compleja, diversa y cosmopolita. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 12(4): 643-654. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2620>
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, Marques MW, Lima WG, Monteiro JHA, Balbino VQ, Michereff SJ, Phillips AJL and Câmara MPS. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity* 67:127-141. <https://doi.org/10.1017/s13225-014-0279-4>
- Noriega-Cantú DH, Pereyda-Hernández J and Garrido-Ramírez ER. 2017. Effects climatological factors on fluctuation of spores at mango trees cv. Ataulfo in Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:227-241. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1610-1>

- Orozco-Santos M, Velázquez-Monreal JJ, Hernández-Fuentes LM, Nieto-Ángel D, Bermúdez-Guzmán MJ, Carrillo-Medrano SH y Manzo-Sánchez G. 2014. Enfermedades y su Manejo Integrado. Pp. 195-230. In: Orozco-Santos M, Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ y Manzanilla-Ramírez MÁ. (eds). El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 475p.
- Orozco SM, Robles GMM, Velázquez MJJ, Manzanilla RMA, Carrillo MSH, Bermúdez GMJ, García KP y García PJC. 2016. Situación actual y perspectivas de la investigación en limón mexicano. Memoria Técnica-Científica del XII Simposio Internacional Citrícola 2016. CONASIPROLIM. INIFAP. Tecomán, Colima, México. p. 111-124.
- Picos-Muñoz PA, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar MR. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. Revista Mexicana de Fito patología 33(1):54-74. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100054](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054)
- Pitino M, Armstrong CM and Duan Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in citrus plants to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection. Horticulture Research 4:170040. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40>
- Polanco FLG, Alvarado GOG, Pérez GO, González GR y Olivares SE. 2019. Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas 10 (4): 757-764. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>
- Paolinelli-Alfonso M, Villalobos-Escobedo JM, Rolshausen PE, Herrera-Estrella A, Galindo SC, López-Hernández JF and Hernandez MR. 2016. Global transcriptional analysis suggests *Lasiodiplodia theobromae* pathogenicity factors involved in modulation of grapevine defensive response. BMG Genomics. 17: 615. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2952-3>
- Robles GMM, Orozco SM, Manzanilla RMA, Velázquez MJJ, Medina UVM and Sanches SE. 2018. Experiencias con Huanglongbing en limón mexicano en el estado de Colima, México. Citrus Research & Technology 39: 2-12. <https://doi.org/10.4322/crt.16518>
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez Á, Velázquez-Monreal JJ y Carrillo-Medrano SH. 2017. Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón mexicano en Colima, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8(5): 1101-1111 <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.111>
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MÁ y Velázquez-Monreal JJ. 2014. Huanglongbing (HLB). Pp. 231-268. In: Orozco-Santos M, Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ y Manzanilla-Ramírez MÁ. (eds). El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 475p.
- Rodríguez-Gálvez E, Guerrero P, Barradas C, Crous PW and Alves A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback mango in Peru. Fungal Biology 121: 452-465. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
- Sandoval-Sánchez M, Nieto-Ángel D, Sandoval-Islas IS, Téliz-Ortiz D, Orozco-Santos M y Silva-Rojas HV. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). Agrociencia 47: 61-73. <https://www.researchgate.net/publications/237075460>
- Sathya K, Parthasarathy S, Thiribhuvanamala G. and Prabhakar K. 2017. Morphological and molecular variability of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem end rot of mango in Tamil Nadu, India. International Journal of Pure & Applied Bioscience 5(6):1024-1031. doi: <https://doi.org/10.18782/2320-7051.5892>.
- SIAP 2022. Anuario estadístico de la producción agrícola. Gobierno de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreaagricola/> (consulta, junio 2022)
- Silva NI, Phillips AJL, Liu JK, Lumyong S and Hyde KD. 2019. Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. Scientific Reports 9: 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50804-x>
- Slippers B and Wingfield MJ. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogen of woody plants: Diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews 21: 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Valle-de la Paz M, Guillén-Sánchez D, Gijón-Hernández AR, Alía-Tejagal I, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández E, Hernández-Arenas M and Ariza-Flores R. 2019. Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México. Revista Bio Ciencias 6, e595. <https://doi.org/10.15741/REVBIO.06.e595>
- Wang Y, Zhou L, Yu X, Stover E, Luo F and Duan Y. 2016. Transcriptome Profiling of Huanglongbing (HLB) Tolerant and Susceptible Citrus Plants Reveals the Role of Basal Resistance in HLB Tolerance. Frontiers in Plant Science 7:933. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00933>.
- Wargo PM. 1996. Consequences of environmental stress on oak: Predisposition to pathogens. Annals of Forest Science 53(2-3): 359-368. <https://doi.org/10.1051/forest:19960218>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp 315-322. In book: PCR- Protocols and Applications: A Laboratory Manual. Publisher Academic Press, Inc. [www.researchgate.net/publication/223397588](http://www.researchgate.net/publication/223397588) (consulta, septiembre 2022)
- Wu J, Johnson EG, Bright DB, Gerberich KM, and Graham JH. 2017. Interaction between *Phytophthora nicotianae* and *Candidatus Liberibacter asiaticus* damage to citrus fibrous roots. Journal of Citrus Pathology:1-7. <https://doi.org/10.5070/C441035789>
- Zhang W, Yan J, Li X, Xing Q, Chethana KWT and Zhao W. 2019. Transcriptional response of grapevine to infection with the fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*

- mae*. Scientific Reports. 9: 5387. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41796-9>.
- Zhang Y, 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. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)00190-0)
- Zhao W, Bai J, McCollum G, Baldwin E. 2015. High incidence of preharvest colonization of huanglongbing-symptomatic *Citrus sinensis* fruit by *Lasiodiplodia theobromae* (*Diplodia natalensis*) and exacerbation of postharvest fruit decay by that fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 81:364–372. <https://doi.org/10.1128/AEM.02972-14>
- Zhao W, Baldwin EA, Baid J, Plotto A, and Irely. 2019. Comparative analysis of the transcriptomes of the calyx abscission zone of sweet orange insights into the huanglongbing-associated fruit abscission. *Horticulture Research* 6:71. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-052-4>
- Zhao W, Gottwald T, Bai J, McCollum G, Irely M, Plotto A and Baldwin E. 2016. Correlation of *Diplodia* (*Lasiodiplodia theobromae*) infection, huanglongbing, ethylene production, fruit removal force and pre-harvest fruit drop. *Scientia Horticulturae* 212: 162-170. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.032>

# Huanglongbing and CLas in *Diaphorina citri* from wide area management from the Southeast Mexico

## Huanglongbing y CLas en *Diaphorina citri* en áreas regionales de control del sureste de México

**Emiliano Loeza-Kuk\***, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias Campo Experimental Mocochoá, Km 25.5 Antigua Carr. Mocochoá-Mérida, Yucatán. CP97454; **Claudia Tania Lomas-Barrié**, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias Campo Experimental Mocochoá, Km 25.5 Antigua Carr. Mocochoá-Mérida, Yucatán. CP97454.

\*Autor de correspondencia: loeza.emiliano@inifap.gob.mx.

Received: September 25, 2022.

Accepted: November 23, 2022.

Loeza-Kuk E and Lomas-Barrié CT. 2022. Huanglongbing and CLas in *Diaphorina citri* from wide area management from the Southeast Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 137-149.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-13>

**Resumen.** El reto que representa el Huanglongbing de los cítricos (HLB) para la citricultura mexicana no puede soslayarse, requiere la conjunción de esfuerzos, voluntades y conocimientos. Las Áreas Regionales de Control (ARCO) de *Diaphorina citri* se establecieron para ralentizar la dispersión de la enfermedad. En este trabajo se midió el avance (incidencia y severidad) del HLB en el Sureste de México: Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán, para el 2017 y 2020 en 867 y 425 sitios respectivamente. La concentración de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) fue cuantificada por PCR en tiempo real en muestras de 50 adultos de *D. citri*/sitio. En la región, tres ARCOs presenta-

ron incidencia alta de HLB, cuyos sitios rebasaron el umbral de erradicación establecido en otros países. El aporte del manejo regional en la menor intensidad del HLB, destacan 10 ARCOs de Yucatán, 2 de Campeche y 1 de Tabasco, sin descartar otros factores bióticos y abióticos. La concentración de CLas en *D. citri* fue mayor en ARCOs con mayor intensidad de HLB, sin aplicación regional y eliminación de plantas infectadas; aunque se detectó incremento generalizado. La incidencia en naranja dulce está subestimada, pero fue evidenciada por la concentración de CLas en *D. citri*.

**Palabras clave:** Áreas regionales de control, *Diaphorina citri*, severidad

La citricultura mexicana representa una fuente de ingreso y de vitamina C para numerosas familias, además es el segundo grupo de frutales más cultivados. La superficie registrada está conforma-

da por naranja dulce (*Citrus sinensis*) con 344,282 hectáreas, limones/limas (*Citrus aurantifolia*, *Citrus latifolia*) con 215,167 ha, mandarina (*Citrus reticulata*) con 22,746 ha y toronja (*Citrus paradisi*) con 21,418 ha (SIAP, 2022). Está establecida en 28 estados lo que se traduce en variabilidad climática y fenológica del cultivo. Por otro lado, en varias regiones la citricultura está compuesta por unidades de producción pequeñas de 1 a 50 hectáreas, lo que da una superficie fragmentada en términos tecnológicos y organizacionales. Las 600,000 hectáreas son vulnerables al daño diferencial de plagas y enfermedades endémicas: Gomosis (Acosta-Pérez *et al.*, 2012), psorosis (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2004) y de reciente ingreso: *Citrus Leprosis Virus* (Izquierdo-Castillo *et al.*, 2011), Huanglongbing (Mora-Aguilera *et al.*, 2014) y *Citrus tristeza virus* en sus variantes severas (Rivas-Valencia *et al.*, 2020; Contreras-Maya *et al.*, 2022).

El Huanglongbing de los cítricos (HLB) está presente en México desde 2009, cuando en la comunidad costera del Cuyo en el municipio de Tizimín, Yucatán, los técnicos de la campaña contra plagas cuarentenarias de los cítricos, colectaron individuos del psílido asiático de los cítricos (*Dia-phorina citri*) positivos a presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) (NAPPO, 2009). La convivencia con una enfermedad crónica como el HLB provoca un efecto detrimental en el hospedante y en variables de importancia productiva (Flores-Sánchez *et al.*, 2016). En naranja dulce (*Citrus sinensis*), la infección avanzada de CLAs provoca reducción del rendimiento y calidad organoléptica del fruto (Bassanezi *et al.*, 2009), así como en limón mexicano (Robles-González *et al.*, 2017) y en limón persa (Flores-Sánchez *et al.*, 2016).

Debido a las características de la citricultura nacional, así como resultados promisorios en Brasil (Bassanezi *et al.*, 2013; Bassanezi *et al.*, 2013b),

desde 2013 se conformaron las Áreas Regionales de Control (ARCOs) para el manejo del HLB (SENASICA, 2018). En este enfoque se incluyeron varias estrategias de manejo de la enfermedad, prioritariamente busca incidir en la abundancia del vector del HLB (*D. citri*) mediante la aplicación regional coordinada de productos en áreas extensas (Pérez-Zárate *et al.*, 2016), además de la liberación de agentes de control biológico en áreas fuera de los ARCOs y huertas abandonadas (SENASICA, 2018). En México, durante los primeros años de la campaña los productores aceptaron eliminar árboles infectados por HLB. Sin embargo, el entusiasmo por retirar árboles enfermos se ha reducido, especialmente en cítricos ácidos como el limón mexicano y persa. Este relajamiento de medidas tendrá una repercusión importante a nivel regional en el manejo de la enfermedad, pues la permanencia de una planta infectada representa un riesgo para el resto de la población citrícola (Irey *et al.*, 2011).

Sin embargo, aún con ciertos indicios de resistencia a productos de control (García-Méndez *et al.*, 2019), el restablecimiento de la fauna benéfica asociada a las huertas y otros tópicos de índole organizacional detectadas durante el funcionamiento de los ARCOs; la estrategia de conjuntar áreas citrícolas separadas y diversas para aplicaciones coordinadas seguirá siendo la tónica para enfrentar al HLB por varios años en México; por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la incidencia de HLB en árboles y de CLAs en psílicos dentro de los ARCOs de Chiapas, Tabasco y Península de Yucatán y su variación temporal de 2017 a 2020.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Determinación de la incidencia de HLB en ARCOs.** Con las bases de datos del sistema auxiliar para la formación y estandarización de polígonos

(SIAFEPOL), así como del Sistema de Monitoreo de *D. citri* (SIMDIA) y los sitios históricos de las detecciones positivas de HLB, proporcionadas por SENASICA-DGSV y los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de cada entidad. Las bases se proyectaron en el SIG libre (Qgis). Con la ubicación de los sitios de monitoreo y los polígonos, se generaron polígonos que abarcaron las áreas cítricas. A partir de los sitios con positivos históricos se generaron áreas buffer de 1 y 2 km, además de una malla de 1 km<sup>2</sup> para las cinco entidades.

Debido a que existen huertas con mayor carga de inóculo por la edad del foco, así como diferencias en el manejo regional por entidad-arco; se utilizó un muestreo por conglomerados en la selección de 40 parcelas por ARCO (Tuz-Poot *et al.*, 2012; Scheaffer *et al.*, 2007), combinado con un método aleatorio en el SIG (QGIS Project, 2022) para elegir la parcela a muestrear en cada 1km<sup>2</sup>.

En cada sitio se determinó el índice de incidencia del HLB por sitio (árboles sintomáticos/árboles revisados), severidad de HLB por sitio (suma de porcentaje de cuadrante sintomático/número de cuadrantes revisados) y la intensidad de HLB (incidencia \* severidad de HLB). En cada sitio se revisaron cuatro puntos cardinales de la copa de 20 árboles distribuidos en un esquema de “T” (Flores Sánchez *et al.*, 2015).

**Determinación de la concentración de CLas en *D. citri* colectadas en los ARCOs.** Las muestras de *D. citri* se colectaron de los mismos sitios en donde se midió la intensidad del HLB. El muestreo se realizó de enero a marzo (época fresca en la región) en los años de 2017 y 2020. En cada sitio se capturaron los insectos presentes en 20 árboles distribuidos en el mismo esquema de “T” de la sección anterior (de la Rosa Anaya, 2016). Debido a la distribución agregada de *D. citri*, se determinó un

número máximo de cinco insectos por árbol muestreado. La muestra de cada sitio se conservó en alcohol etílico al 96% a 4 °C hasta su diagnóstico.

La extracción del DNA se realizó a 50 individuos de *D. citri*. Para lo cual se eliminó el alcohol, se secaron y maceraron con un pistilo utilizando el Kit DNAeasy blood and tissue (Qiagen, 69504), el DNA se resuspendió en 100µL; DNA de muestras con menos de 25 insectos se resuspendieron en 50 µL. Para la detección y cuantificación de CLas, se utilizaron dos µL de DNA extraído en un volumen de reacción de 25 µL, los cuales se sometieron a la amplificación con los iniciadores y sonda para CLas, así como un control interno de la reacción con los iniciadores y sonda para una región del genoma de *D. citri* (Li *et al.*, 2006). Para determinar la concentración de CLas en las muestras de *D. citri*, se realizó la cuantificación absoluta por medio de PCR en tiempo real. Para lo cual, se generó una curva de calibración con diluciones seriales de un control positivo sintético de la región 16SrDNA (Figura 1). Todas las reacciones fueron realizadas en un termociclador Rotorgen 2plex.

La concentración del número de copias del fragmento del CLas fue calculada con la fórmula:

$$y = 10^{((-0.3 * Ct) + 11.131)}$$

en donde:

y= número de copias de 16SrDNA

Ct= Ciclo de detección de la señal

Análisis estadístico de la información, se definieron como subconjuntos de la población a cada uno de los ARCOs y se realizaron pruebas no paramétricas para la comparación de medianas y para las correlaciones entre variables con una  $\alpha$  de 0.05 o nivel de significancia del 95%, en el software RS-tudio.



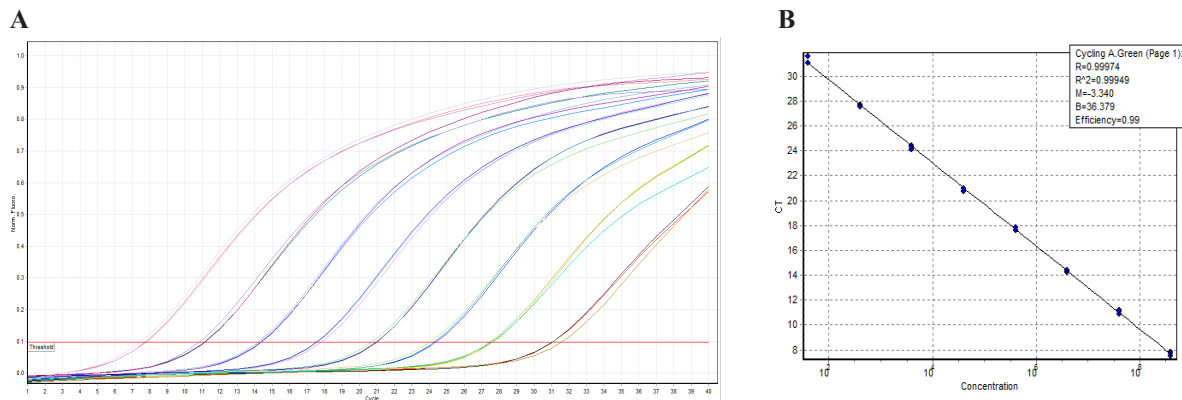


Figura 1. Amplificación de un fragmento de 16SrDNA (A) y curva estándar para detección de CLas en *D. citri* (B).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Incidencia de HLB en los ARCOs.** En 2017 la selección de los sitios se realizó en función a las bases de datos de SIMDIA, de los comités estatales y los registros de SAGARPA (Figura 2). En 2019 y 2020, los muestreos se dirigieron a las mismas unidades muestreadas en 2018 (427/960), que fueron las unidades localizadas en ARCOs con dispersión activa en 2017.

En 2017, la incidencia de HLB en las huertas indicó condiciones diferentes del avance de la enfermedad en los estados e incluso a nivel de ARCOs dentro de cada estado (Figura 3). De esta manera, los ARCO<sub>1,2</sub> de Quintana Roo y el ARCO<sub>2</sub> de Chiapas presentan la mayor proporción de huertas con síntomas (92, 72 y 67 % respectivamente). Se detectó otro grupo intermedio de huertas sintomáticas conformado por los ARCO<sub>1,2</sub> de Campeche y el ARCO<sub>6</sub> de Yucatán (32, 12.5 y 12.5 % respectivamente).

Un comportamiento similar se detectó para la incidencia por huerta en donde destaca el ARCO<sub>2</sub> de Quintana Roo y el ARCO<sub>2</sub> de Chiapas. La excepción a incidencia y severidad bajas fue el ARCO<sub>1</sub> de Tabasco con dos huertas sintomáticas, e incidencia de 0.9 %, la severidad registrada fue parecida

al ARCO<sub>2</sub> de Quintana Roo. Un comportamiento diferente se detectó en 400 sitios que representan nueve ARCOs en Yucatán y los ARCO<sub>1,3,4</sub> de Chiapas sin incidencia y severidad del HLB (Figura 3B).

Al momento de la evaluación de 2017, el HLB tenía ocho años de estar presente en la región, en Yucatán y Quintana Roo se encontró en 2009, Campeche en 2010, Chiapas en 2011, Tabasco en 2012 (NAPPO, 2009; SEGOB, 2010; SENASICA, 2011 y SENASICA, 2012). La infección casi simultánea en la Península de Yucatán permitiría suponer que los ARCOs tendrían un comportamiento similar, puesto que el nivel tecnológico de las huertas es de medio a bajo y la aplicación foliar de plaguicidas no es parte esencial en el manejo convencional. Esto no se detectó en la primera evaluación, la velocidad de dispersión de la enfermedad en los ARCOs de Yucatán y Campeche fue menor a la reportada (Mora *et al.*, 2014). En Florida mediante evaluación visual de la incidencia en lotes sujetos a programas agresivos de control de *D. citri* y eliminación de árboles sintomáticos, registraron incrementos entre 0.2 a 0.3 en cuatro años calificados como bajos (Gottwald *et al.*, 2012).

La distancia entre las detecciones iniciales de árboles infectados (invariablemente erradicados) a

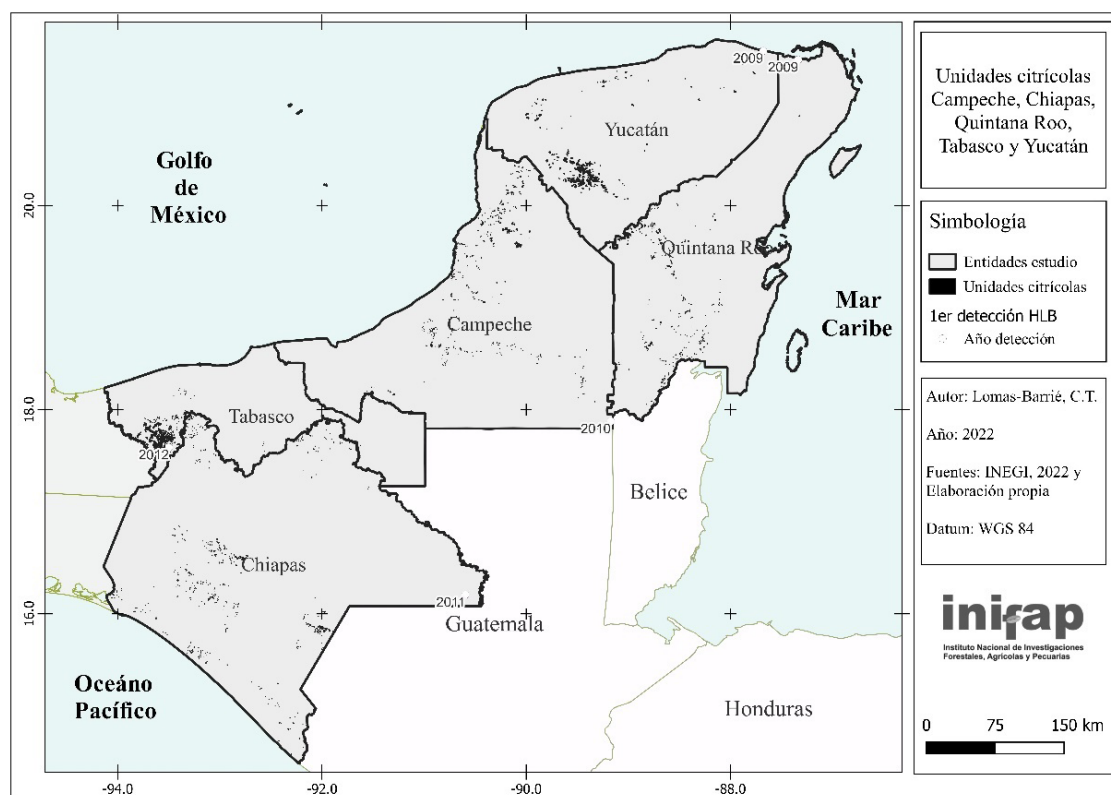


Figura 2. Área delimitada para el muestreo de la incidencia de HLB en el Sureste de México. Los polígonos negros indican unidades citrícolas. Los años indican los sitios con la primera detección de material vegetativo positivo a CLAs en el estado.

las huertas comerciales pertenecientes a los ARCOs puede ser otro factor potencialmente involucrado en la incidencia detectada. Las primeras detecciones en los estados fueron en traspatio y fuera de sus principales áreas comerciales que son objeto de los ARCOs (Figura 2). En Yucatán fue en Tizimín al Noreste, Quintana Roo en Lázaro Cárdenas al Norte, Campeche en Calakmul al Este en colindancia con Quintana Roo. Mientras que Chiapas tuvo su primer positivo en Benemérito de las Américas en 2011 y al año siguiente Tabasco detectó árboles positivos en Huimanguillo (SENASICA, 2018b) (Figura 2). A nivel estatal, la distancia menor de focos iniciales a un ARCO corresponde a Tabasco con 14 km, mientras que los más alejados son el

ARCO<sub>2</sub> de Quintana Roo y ARCO<sub>3</sub> de Chiapas con 340 y 312 km respectivamente (Cuadro 1).

La distancia de la dispersión natural de la enfermedad está asociada a la velocidad de movimiento de *D. citri*. En Brasil y Florida, la dispersión mensual estimada fue 8.9 a 34 km (Mora-Aguilera *et al.*, 2014), mientras para la Península de Yucatán de 2.6 a 6 km (Flores-Sánchez *et al.*, 2017). Con lo cual en un par de años teóricamente todos los ARCOs tendrían árboles sintomáticos al HLB.

Esto indica que además de la edad de la infección y la distancia de los focos a los ARCOS, existen factores no abordados en este estudio involucrados en el establecimiento de la enfermedad en la región; como la fragmentación y continuidad espa-

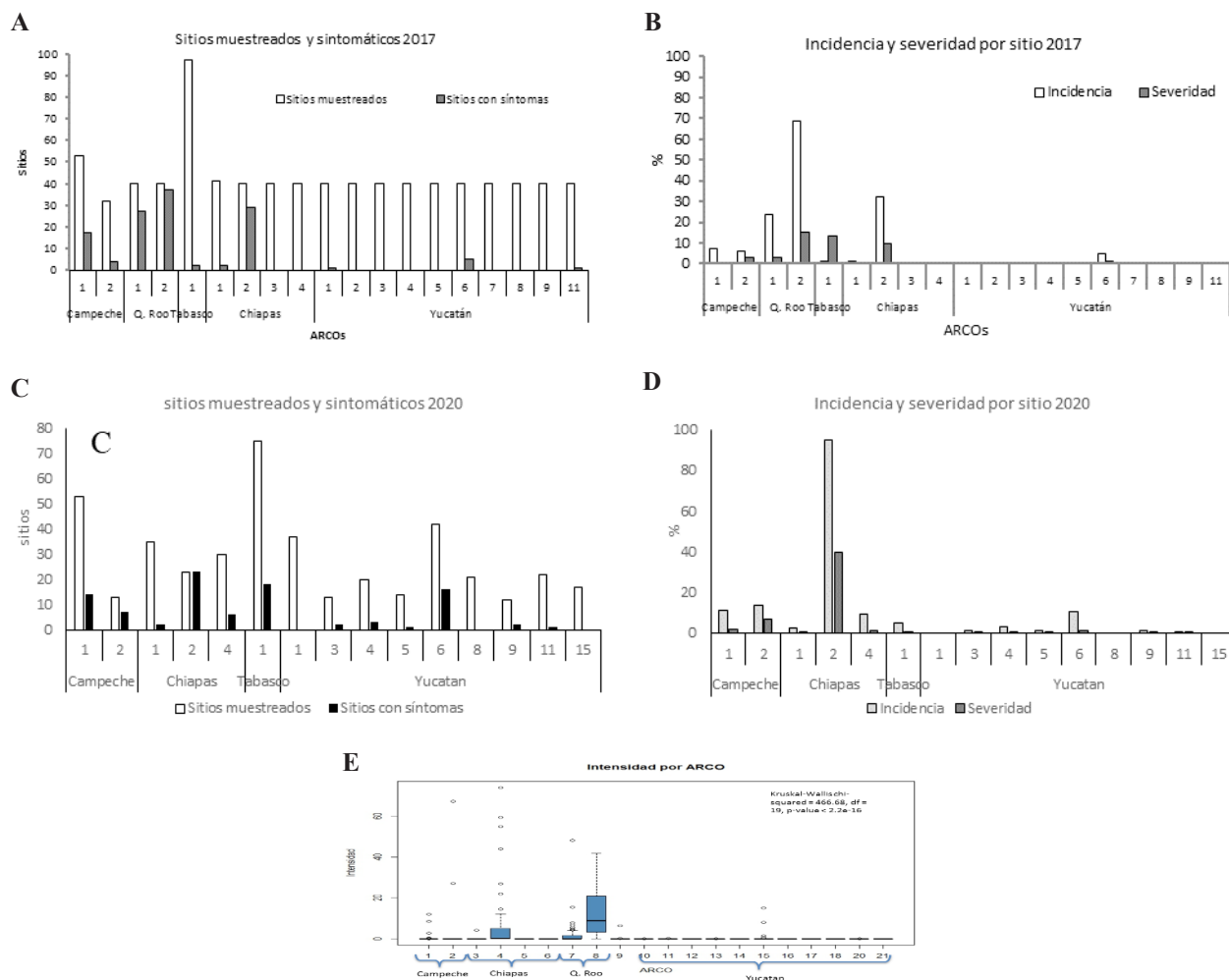


Figura 3. Estado del HLB en ARCOs de Chiapas, Tabasco y Península de Yucatán. A) Sitios muestreados y sitios con síntomas asociados a infección por CLas por ARCO en 2017. B) Incidencia y severidad promedio de HLB por sitio en 2017. C) Sitios muestreados y sitios con síntomas asociados a infección por CLas por ARCO en 2020. D) Incidencia y severidad promedio de HLB por sitio en 2020. E) Intensidad de los ARCOs analizados por Kruskal-Wallis.

cial, la eficiencia en el sentido amplio (Organismos auxiliares, productores y oportunidad de las acciones) de las actividades contempladas en el plan de acción contra el HLB y su vector.

En la evaluación de 2020, el muestreo fue restringido a 15 ARCOS con una dispersión evidente en 2017 (425 sitios), 22 % de los sitios tuvieron árboles con síntomas de HLB (Figura 3). En el ARCO<sub>2</sub> de Chiapas, todos los sitios tuvieron árbo-

les sintomáticos, con incidencia del 94%, y 39% de severidad (porcentaje de la copa afectada). El ARCO<sub>2</sub> de Quintana Roo en 2018 (datos no mostrados) ya mostraba valores similares al ARCO<sub>2</sub> de Chiapas, pero no se incluyeron en esta evaluación. Mientras que algunos ARCOs de Yucatán aún presentaron valores bajos de incidencia y severidad.

Un factor necesario para la dispersión local de HLB es la presencia de poblaciones de *D. ci-*

**Cuadro 1. Incremento de la intensidad de HLB en ARCOS. Evaluación visual en 2017 y 2020.**

Estado	ARCO	Final <sup>x</sup>	H2017 <sup>y</sup>	H2020 <sup>y</sup>	Tasa <sup>z</sup> ( $\Delta y/\Delta x$ )	Máx. $\Delta y/\Delta x$
Campeche	1	252.4	0.4757	2.2295	0.7144	8.2698
	2	206.8	2.6451	6.4936	0.1816	5.4625
Chiapas	1	228.4	0.1043	0.4129	0.0974	2.9792
	2	177.6	8.2297	38.1229	4.8397	24.4583
	3	312.7	0.0000	NE	NE	NE
	4	284.2	0.0000	0.9288	0.2322	7.7083
Quintana Roo	1	245.0	2.2324	NE	NE	NE
Tabasco	2	344.7	13.3659	NE	NE	NE
	1	14.8	0.0718	0.2539	0.0514	2.2374
Yucatán	1	213.5	0.0015	0.0000	0.0000	0.0000
	2	205.9	0.0048	NE	NE	NE
	3	211.5	0.0000	0.0007	0.0001	0.0026
	4	197.9	0.0001	0.1745	0.0263	1.0594
	5	203.0	0.0000	0.0223	0.0026	0.1042
	6	212.0	0.6325	0.8248	0.1109	2.4125
	7	211.0	0.0000	NE	NE	NE
	8	199.2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	9	216.0	0.0000	0.0143	0.0014	0.0521
	10	216.0	0.0000	0.0143	0.0014	0.0521
	11	245.1	0.0001	0.0093	0.0017	0.0684

<sup>x</sup> Distancia del centroide del ARCO a la primera detección de HLB en el estado.

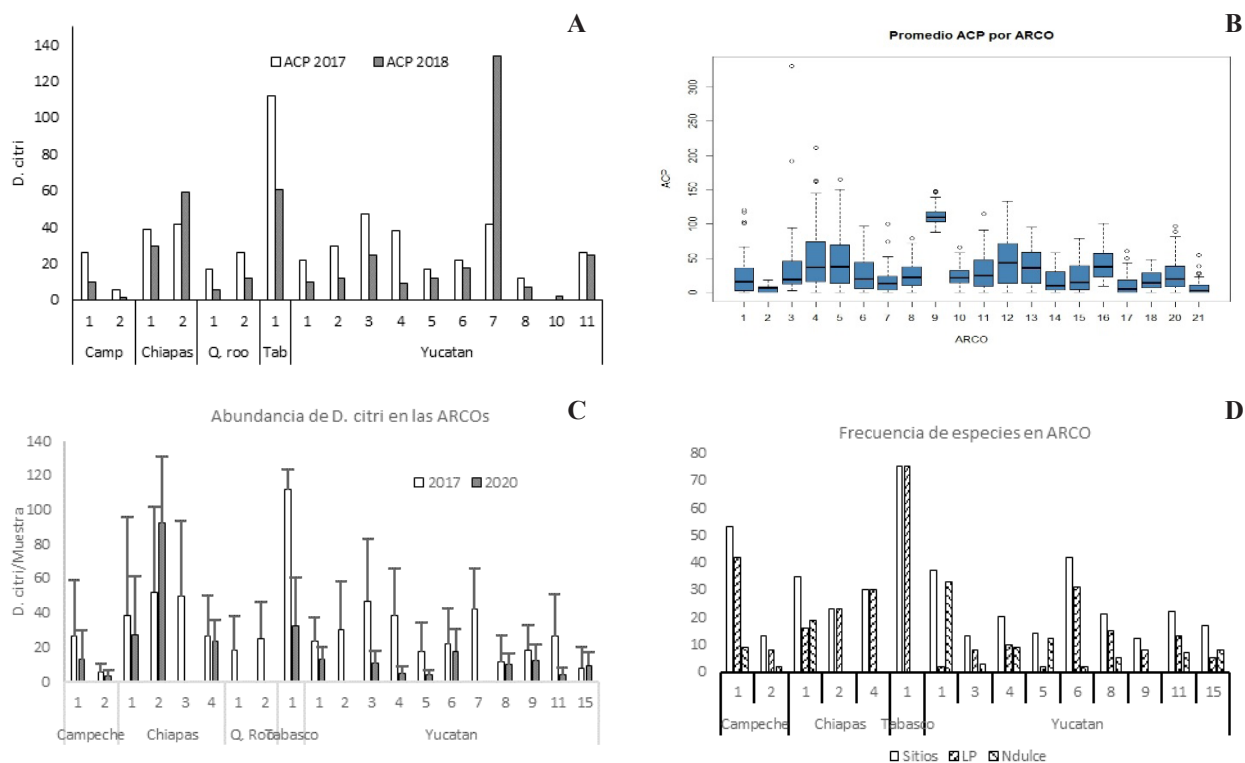
<sup>y</sup> Intensidad promedio de HLB por ARCO

<sup>z</sup> Tasa anual

*tri* (Bergamin-Filho *et al.*, 2016), por ello muchos esfuerzos para contenerlo se enfocan en reducir la población del vector (Pluke *et al.*, 2005, Hernández-Fuentes *et al.*, 2012;). Durante el muestreo se capturaron las *D. citri* presentes en los 20 árboles (max. 5/árbol). Esto permitió conocer la abundancia relativa de la población en esa temporada/año, con aproximadamente cuatro meses después de las acciones de control regional. En 2017, Tabasco mostró la mayor cantidad de insectos por sitio, mientras que las capturas menores fueron en el ARCO<sub>2</sub> de Campeche. De 2017 a 2018, únicamente dos ARCOS tuvieron incremento en las poblaciones capturadas. Mientras que de manera consistente el ARCO<sub>2</sub> de Chiapas, también presentó población alta en 2020 (Figura 4). Estos sitios de Chiapas merecen una mención especial, pues conforman un área sin control regional, por las altas infestaciones

de *Aleurocanthus woglumi*. Sin embargo, esta ausencia de control coordinado ha permitido la rápida dispersión e incremento de la incidencia de HLB en el área, y ha rebasado el umbral de erradicación de huertas infectadas establecido en otros países (Craig *et al.*, 2018).

En un análisis pareado de sitios muestreados dentro de los ARCOS entre 2017 y 2020 (Cuadro 1), se puede observar que con velocidad diferente, la mayoría de los ARCOS muestran un incremento de la intensidad (incidencia y severidad). La tasa de incremento de incidencia de árboles sintomáticos y severidad más alta fue el ARCO<sub>2</sub> de Chiapas. Mientras que el ARCO<sub>1</sub> de Yucatán su tasa de cambio es de 0, pero bajo la sospecha de una infección no detectada asociada a la especie (naranja dulce) y las condiciones edáficas del área. Al considerar la tasa de cambio máximo registrada en algunos si-



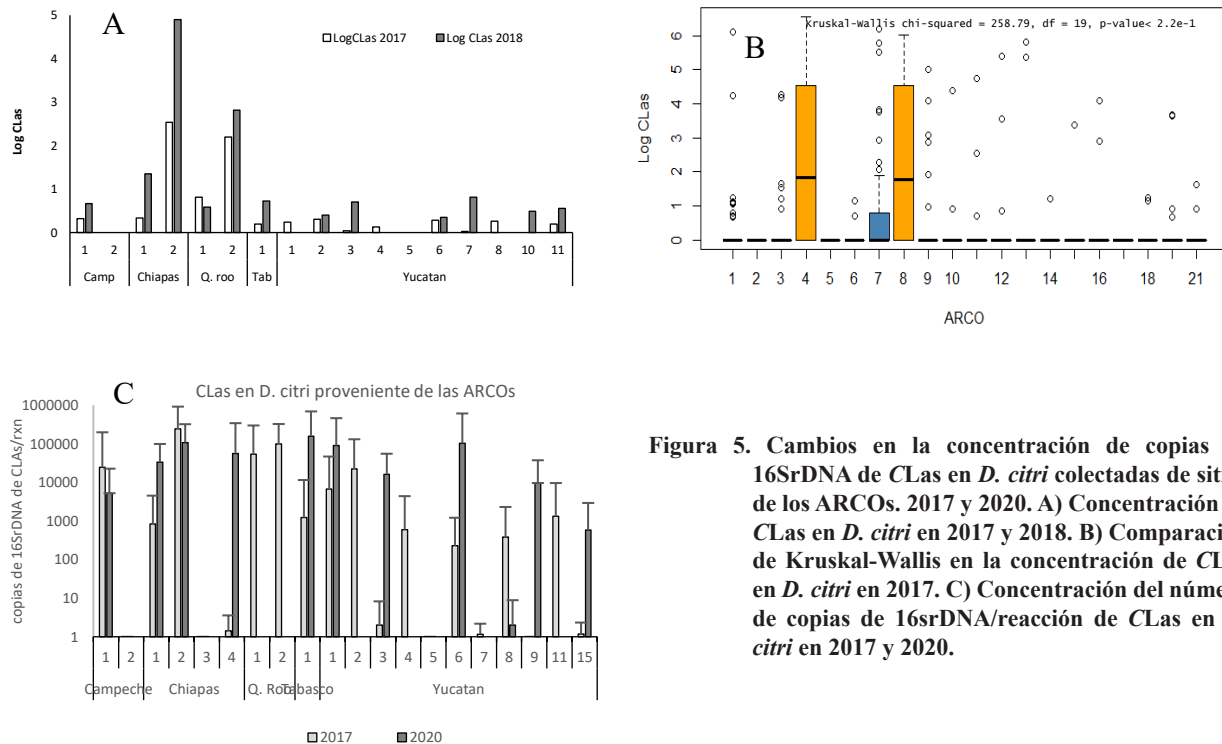
**Figura 4. Abundancia de *D. citri* entre ARCOS:** A) Abundancia relativa de *D. citri* en árboles muestreados 2017 a 2018. B) Comparación de Kruskal-Wallis a la abundancia de *D. citri* en 2017. C) Abundancia relativa de *D. citri* entre 2017 y 2020. D) Frecuencia de especies comerciales en sitios muestreados en ARCOS.

tios de muestreo, cinco ARCOS presentarán a corto plazo valores altos de incidencia aun con tasas medias anuales: los ARCO<sub>1,2</sub> de Campeche, ARCO<sub>1,4</sub> de Chiapas, mientras que los ARCO<sub>6,4</sub> de Yucatán y el de Tabasco el incremento será en mediano plazo. La población de sitios muestreados la conforman huertas pequeñas con productores de bajo nivel tecnológico, por lo que con las aplicaciones regionales se esperaría un escenario similar a los experimentos 1 y 2 de Bassanezi y colaboradores (2013), sin embargo, en muchos ARCOS, la erradicación de árboles positivos al menos semestralmente no se realiza, debido al impacto a corto plazo en la economía individual.

**Concentración de CLas en *D. citri* provenientes de sitios en los ARCOS.** El efecto de la incidencia

de árboles positivos en campo, con el tiempo tiende a trasladarse a la concentración de CLas en *D. citri* colectadas en esos sitios. En 2017 después de analizar por PCR en tiempo Real cerca de 32,000 insectos colectados en 880 sitios de los 20 ARCOS, la mayor concentración de CLas fue en el ARCO<sub>2</sub> de Quintana Roo, seguido por el ARCO<sub>2</sub> de Chiapas (Figura 5).

La capacidad de los estadios ninfales 4 y 5 y adultos de *D. citri* para transmitir a CLas fue reportada desde 1988 (Xu *et al.*, 1988), en términos de control se ha reportado una mayor eficiencia de los productos para reducir las poblaciones del vector si son dirigidos a los estados ninfales. En 2017, la concentración de CLas en *D. citri* en dos de los ARCOS indica la prevalencia de insectos capaces de infectar plantas. Es de notar que a pesar de estar



**Figura 5.** Cambios en la concentración de copias de 16SrDNA de CLAs en *D. citri* colectadas de sitios de los ARCOs. 2017 y 2020. A) Concentración de CLAs en *D. citri* en 2017 y 2018. B) Comparación de Kruskal-Wallis en la concentración de CLAs en *D. citri* en 2017. C) Concentración del número de copias de 16srDNA/reacción de CLAs en *D. citri* en 2017 y 2020.

en una zona cálida que afecta negativamente la capacidad de transmisión (Lopes *et al.*, 2013), existen concentraciones de CLAs diferentes en los ARCOS que están asociadas a la incidencia del HLB. A pesar de que únicamente tres ARCOs, sobresalen en la concentración de CLAs en el vector, otros ocho ya muestran presencia de bacteria con concentraciones arriba de cuatro dígitos, como evidencia de focos probables de dispersión (Figura 5b). Algunos de los ARCOs con alta concentración de CLAs están a una distancia menor de cuatro km, considerada como factor de riesgo para la dispersión a ARCOs de baja incidencia (Belasque *et al.*, 2010). Para 2020, el 53% de los ARCOs muestran incremento en la concentración de CLAs respecto a 2017 (Figura 5c). Los incrementos más marcados (100%) fueron en los ARCOs con menos de  $10^4$  copias de CLAs/reacción en 2017. Por otro lado, el ARCO<sub>2</sub> de Chiapas, ARCO<sub>1</sub> de Campeche y

ARCO<sub>4,8</sub> de Yucatán mostraron menor concentración en 2020. Sin embargo, estos valores cambiarán en el corto plazo con una mayor frecuencia de *D. citri* infectivas, al no eliminar las plantas infectadas y al hábito que presentan los adultos de *D. citri* de intercambiar entre la alimentación entre plantas sanas y enfermas (Wu *et al.*, 2015). Varios sitios de muestreo carecen de riego y los árboles pudieron estar sujetos a estrés por sequía, condición que reduce la concentración de CLAs (da Silva *et al.*, 2021) y disponibilidad de brotes para *D. citri*: ARCO<sub>2</sub> de Campeche, ARCO<sub>1,3,4</sub> de Chiapas. En la región, dos ARCOs alcanzaron desde 2017 el umbral de infectividad de *D. citri* propuesto por Ukuda y colaboradores (2015); sin embargo, también se detectaron otros sitios en ARCOs diferentes en todos los estados con esta condición (Figura 5b), mismos que pudieron fungir como focos de infección para el área vecina, de tal forma que para 2020

los promedios de la concentración en esos ARCO pasaron de  $10^2$ - $10^3$  a  $10^5$ .

En las mediciones realizadas se observó que el limón persa expresa síntomas más evidentes que la naranja dulce; por lo que probablemente en ARCOs con predominancia de naranja dulce la incidencia podría ser diferente respecto a la infección real. Por esta razón, ARCOs con predominancia de limón persa la incidencia sería más realista, es el caso de Tabasco el 100% de unidades muestreadas fueron de limón persa registraron 24% de sitios con síntomas, aunque no se descarta el enmascaramiento de síntomas por deficiencias nutrimentales, Wood Pocket, fitoplasmas y gomosis. En el ARCO<sub>6</sub> de Yucatán, el 73% de sitios fueron limón persa y 38% de sitios sintomáticos. Mientras que el ARCO<sub>1</sub> de Yucatán con 89% de los sitios son de naranja dulce (Figura 4), la incidencia está subestimada. Sin embargo, la concentración de CLas del ARCO fue de  $10^4$  a  $10^5$ , lo que indica presencia de insectos portadores de la bacteria. Casos como el ARCO<sub>1</sub> de Yucatán, justifican la detección de la bacteria en *D. citri*, pues permite conocer la condición local del “inóculo en el aire”, y adelantarse en la detección de probables plantas sintomáticas en la región (Manjunath *et al.*, 2008), así como medir relativamente el éxito de las aplicaciones regionales, esto

a pesar de ser más costoso comparado con la incidencia visual.

### Integración de parámetros de HLB en la región.

A nivel de huerta, la severidad de la enfermedad está asociada a la incidencia detectada (Figura 6) y también se relaciona con la edad de los focos. En los ARCOs con detecciones antiguas la incidencia y la severidad son mayores comparadas con áreas de reciente detección. Este es el comportamiento del ARCO<sub>2</sub> de Quintana Roo, cuyo foco inicial se detectó en 2009, y que presentó el promedio de intensidad más alto (14%), seguido del ARCO<sub>2</sub> de Chiapas con detecciones desde 2011 (8%). La excepción son los ARCOs de Yucatán que se mantienen aún con valores bajos. El incremento de incidencia de plantas sintomáticas a HLB, no se reflejó en la concentración de CLas en *D. citri* de 2017 ( $r=0.3$ ,  $\alpha=0.05$ ).

Sin embargo, para 2020 hay una correlación positiva entre las *D. citri* colectadas con el aumento en la concentración (Figura 6b), lo que se traduce como que una porción importante de los insectos colectados fueron portadores de la bacteria ( $r=0.62$ ,  $\alpha=0.05$ ). Sobresale que varios ARCOs cumplen su función de reducir la dispersión e incremento de la incidencia de HLB en la región, casi con una ana-

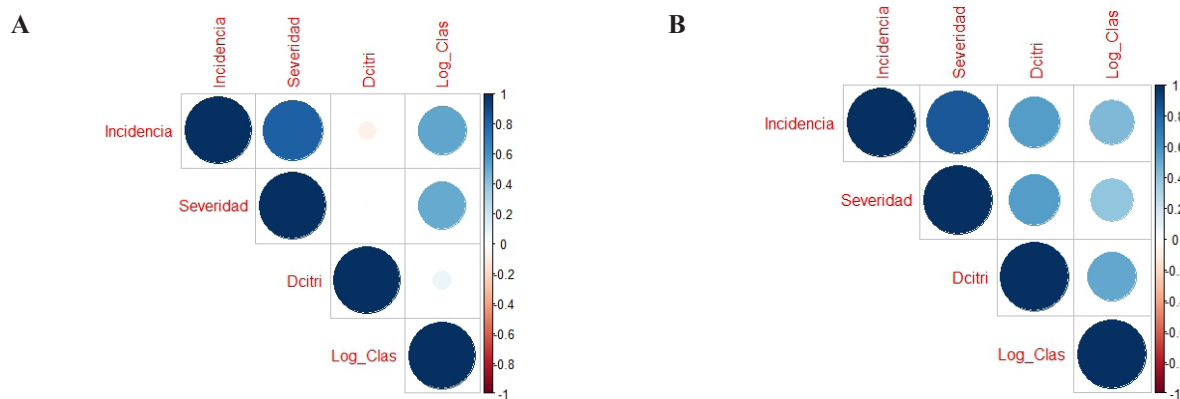


Figura 6. Correlación de parámetros de infección por HLB en huertas de cítricos de Chiapas, Tabasco y la Península de Yucatán. A) 2017. B) 2020.

logía exitosa a la experiencia de Sao Paulo, Brasil (Belasque *et al.*, 2010), aun con la desventaja de trabajar en áreas cítricas fragmentadas.

## CONCLUSIONES

La incidencia y severidad de la infección de CLas en los ARCOs muestra un incremento en los años evaluados. La mayor tasa de incremento anual fue en el ARCO<sub>2</sub> de Chiapas y en el ARCO<sub>2</sub> de Quintana Roo. con la mayor intensidad inicial detectada y no sujetos a control regional mediante aplicaciones. No se observó asociación del incremento de la intensidad con la edad de la infección en el área. La ausencia de la aplicación regional en algunas áreas y no eliminación de plantas sintomáticas a HLB permitió el incremento de la concentración de CLas en las poblaciones *D. citri*. La incidencia en naranja dulce puede estar subestimada por la expresión tardía y enmascaramiento de síntomas, pero fue evidenciada por la concentración de CLas en *D. citri*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Chiapas por el financiamiento otorgado, a los auxiliares profesionales fitosanitarios, coordinadores y gerentes de los comités de Sanidad Vegetal de Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán por las facilidades y apoyo logístico recibido. Al M.T. Pedro L. Robles García de la Dirección General de Sanidad Vegetal por las sugerencias al trabajo de campo. A los M.C. Adriana Chacón López y Aaron Yeh Gorocica por su apoyo técnico en laboratorio.

## LITERATURA CITADA

Acosta-Pérez JA, Ortiz-García CF, Zaldívar-Cruz JM, Rodríguez-cuevas M, Bautista Muñoz CC y Castillo-Aguilar CC. 2012. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona cítrica de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia en el Trópico Húmedo* 28 (3): 245-258. <https://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v28n3/v28n3a4.pdf>

- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H. y Stuchi, E.S. (2009). Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 125,565-572. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9506-3>
- Bassanezi, R. B., Belasque, J. Jr. and Montesino, L. H. (2013). Frequency of symptomatic trees removal in small citrus blocks on citrus huanglongbing epidemics. *Crop Protection*, 52,72-77. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.012>
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., & Bergamin Filho, A. (2013b). Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease*, 97:789-796. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0314-RE>
- Belasque, J., Bassanezi, R. B., Yamamoto, P. T., Ayres, A. J., Tachibana, A., Violante, A. R., Tank, A., Di Giorgi, F., Tersi, F. E. A., Menezes, G. M., Dragone, J., Jank, R. H., & Bové, J. M. (2010). Lessons from huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 285-302. <https://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/171/38>
- Bergamin Filho, A., Inoue-Nagata, A. K., Bassanezi, R. B., Belasque, J. Jr., Amorim, L. and Macedo, M. A. (2016). The importance of primary inoculum and area wide disease management to crop health and food security. *Food Security*, 8,221-238. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/154967/1/Food-Sec-v-8-p-221-238-2016-NAGATA.pdf>
- Craig A.P., Cunniffe, N. J., Parry, M., Laranjeira, F. F. and Gilligan, C. A. (2018). Grower and regulator conflict in management of the citrus disease Huanglongbing in Brazil: A modelling study. *Journal of Applied Ecology*, 55(4), 1956-1965 <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13122>
- Contreras-Maya, R., Villegas-Monter, A., Santacruz-Varela, A., Cruz-Huerta, N., Ortega-Arenas, L.D. and Ochoa-Martínez, D.L. 2022. Prevalence of Mild T30, T3, and Severe VT Strains of Citrus tristeza Virus in Central-Northern Veracruz, Mexico. *American Journal of Plant Sciences*, 13, 494-505. <https://doi.org/10.4236/ajps.2022.134032>
- da Silva, J. R., Boaretto, R. M., Lavorenti, J. A. L., dos Santos, B. C. F., Coletta-Filho, H. D. and Mattos, D. Jr. (2021). Effects of Deficit Irrigation and Huanglongbing on Sweet Orange Trees. *Frontiers of Plant Science*, 12,731314. doi: 10.3389/fpls.2021.731314
- De la Rosa Anaya, A. (2016). Distribución de la carga de inóculo regional de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Dia-phorina citri* en tres escenarios cítricos de México. Tesis maestría. COLPOS. 87p. <http://colposdigital.colpos.mx>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33, 195-210



- Flores-Sánchez, J. L. (2016). Epidemiología del HLB bajo tres escenarios regionales en México. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados. 264 pp.
- Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J. I., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Velázquez-Monreal, J. J., Domínguez-Monge, S., Bassanezi, R. B., Acevedo-Sánchez, G. & Robles-García, P. (2017). Diffusion model for describing the regional spread of Huanglongbing for first outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease*, 101,1019-1127. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- García-Méndez, V. H.; Ortega-Arenas, L. D.; Villanueva-Jiménez, J. A. y Osorio-Acosta, F. (2019). Resistencia de *Diaphorina citri* Kuwayama a Insecticidas en Cinco Áreas Regionales de Control en México. *Southwestern Entomologist*. 44(4),947- 954. doi: 10.3958/059.044.0415
- Gottwald, T. R., Graham, J. H., Irey, M. S., McCollum, T. G. and Wood, B. W. (2012). Inconsequential effect of nutritional treatments on Huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection*, 36,73-82. doi:10.1016/j.cropro.2012.01.004
- Hernández-Fuentes, L. M., Urias-López, M. A., López-Arroyo, J. I., Gómez-Jaimes, R., & Bautista-Martínez, N. (2012). Control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama (Homóptera: Psyllidae) en lima persa *Citrus latifolia* Tanaka. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(3), 427-439. [www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342012000300002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000300002&lng=es&tlng=es).
- Iracheta-Cárdenas, M.M., Orona-Castro, F., Almeyda-León, I.H., y Rocha-Peña, M. A. (2004). Ocurrencia y distribución de psorosis de los cítricos en el Estado de Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22,299-307. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61222217.pdf>
- Irey, M., Morris, R. A., Estes, M. (2011). Survey to estimate the rate of HLB infection in Florida citrus groves. <http://www.plantmanagementnetwork.org/proceedings/irchlb/2011/>. p. 73.
- Izquierdo-Castillo, I., Zermeño-Díaz, L. F., Méndez, W., Otero-Colina, G., Freitas-Astúa, J., Locali-Fabris, E. C., Moraes, G. J., Calegario, R. F., Tassi, A. D. and Kitajima, E. W. (2011). Confirmation of the presence of the citrus leprosis virus C (CILV-C) in southern Mexico. *Tropical Plant Pathology*, 36(6). <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000600009>
- Li, W., Hartung, J. S. and Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 104-115. doi:10.1016/j.mimet.2005.10.018
- Lopes, S. A., Luiz, F. Q. B. F., Martins, E. C., Fassini, C. G., Sousa, M. C., Barbosa, J. C., and Beattie, G. A. C. (2013). ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. *Plant Disease*, 97,1563-1570. <http://dx.doi.org/10.1094 / PDIS-11-12-1031-RE>
- Manjunath, K. L., Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S., and Lee, R. F. (2008). Detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida. *Phytopathology*, 98,387-396. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0387>
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., Gutiérrez-Espinosa M. A., Loeza-Kuk, E. and González-Gómez, R. (2014). Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2),108-119. [https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2\\_03.pdf](https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf)
- NAPPO. (2009). Detección de Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) en el municipio de Tizimin Yucatán, México. (Revisado agosto 2022) <https://www.pestalerts.org/es/official-pest-report/deteccion-de-huanglongbing-candidatus-liberibacter-asiaticus-en-el-municipio-1>
- Pérez-Zarate, L.F., Osorio-Acosta F., Villanueva-Jiménez J.A., Ortega-Arenas L.D., y Chiquito-Contreras R.G. (2016). Factores que Inciden en el Control Químico de *Diaphorina citri* Kuwayama en Áreas Regionales de Control. *Southwestern Entomologist* 41(4), 1037-1050, <https://doi.org/10.3958/059.041.0404>
- Pluke, R. W. H., Escribano, A. Michaud, J. P., and Stansly, P. A. (2005). Potential impact of lady beetles on *Diaphorina citri* (Homoptera:Psyllidae) in Puerto Rico. *Florida Entomologist*, 88, 123-128. <https://journals.flvc.org/flaent/article/view/75406>
- QGIS Project. (2022). QGIS Desktop 3.22 User Guide. [https://docs.qgis.org/2.14/es/docs/training\\_manual/vector\\_analysis/spatial\\_statistics.html](https://docs.qgis.org/2.14/es/docs/training_manual/vector_analysis/spatial_statistics.html) consultado: 13/09/2022
- Rivas-Valencia, P., Domínguez-Monge, S., Santillán-Mendoza, R., Loeza-Kuk, E., Pérez-Hernández, O., Rodríguez-Quibarrera, C.G. and Lomas-Barrié, C. (2020) Severe Citrus tristeza virus Isolates from Eastern Mexico Are Related to the T36Genotype Group. *American Journal of PlantSciences*, 11, 1521-1532.<https://doi.org/10.4236/ajps.2020.1110110>
- Robles-González M. M., Orozco-Santos, M., Manzanilla-Ramírez M. A., Velázquez-Monreal J. J., & Carrillo-Medrano, S. H. (2017). Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón mexicano en Colima, México. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 8(5), 1101–1111. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.111>
- Scheaffer, R.L. W. Mendenhall y R.L. Ott. (2007). Elementos de muestreo. Thomson. Madrid, España. 455p.
- SEGOB-DOF. (2010). Acuerdo para el control del Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus liberibacter* spp.) y su vector. Consultado en agosto de 2022. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5155459&fecha=16/08/2010](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5155459&fecha=16/08/2010)
- SENASICA. (2011). Zona bajo control fitosanitario del Estado de Chiapas -CIRCULAR 025. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346554/025-01939\\_DECLARACION\\_COMO\\_ZONA\\_BAJA\\_CONTROL](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346554/025-01939_DECLARACION_COMO_ZONA_BAJA_CONTROL)

- FITOSANITARIO\_A\_CHIAPAS\_POR\_HLB.pdf Consultado en agosto 2022
- SENASICA. (2012). Zona bajo control fitosanitario del Estado de Tabasco. Aviso 189. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346554/025-01939-\\_DECLARACION\\_COMO\\_ZONA\\_BAJO\\_CONTROL\\_FITOSANITARIO\\_A\\_CHIAPAS\\_POR\\_HLB.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346554/025-01939-_DECLARACION_COMO_ZONA_BAJO_CONTROL_FITOSANITARIO_A_CHIAPAS_POR_HLB.pdf) Consultado en agosto 2022
- SENASICA. (2018). Estrategia operativa de la campaña contra el Huanglongbing de los cítricos, 2018. 26 pp. <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=26162>
- SENASICA. (2018b). Infografías - Análisis epidemiológico del HLB 2018. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/ContenidoPublico/HLB/Infografias/Chiapas.pdf> consultado en agosto 2022.
- SIAP. (2022). Avance de siembras y cosechas, datos abiertos. [https://nube.siap.gob.mx/avance\\_agricola/](https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/)
- Tuz-Poot, F., S. Medina-Peralta y R. Acosta-Pech. (2012). Notas de curso: Diplomado en métodos estadísticos módulo 2 Introducción a las técnicas de muestreo. UADY. México. 90p.
- Ukuda-Hosokawa R, Sadoyama Y, Kishaba M, Kuriwada T, Anbutsu H, Fukatsu T. (2015). Infection density dynamics of the citrus greening bacterium “Candidatus Liberibacter asiaticus” in field populations of the psyllid *Diaphorina citri* and its relevance to the efficiency of pathogen transmission to citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 3728–3736 <https://doi.org/10.1128/AEM.00707-15>
- Xu, C. F., Xia, Y. H., Li, K. B. and Ke, C. (1988). Further study of the transmission of Citrus Huanglungbin by psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Timmer, L. W., Garnsey, S. M. and Navarro, L. *Proceedings of the Tenth of the International Organization Citrus Virologist conference*, 243-248. [https://iocv.ucr.edu/sites/default/files/2020-06/10th243\\_248.pdf](https://iocv.ucr.edu/sites/default/files/2020-06/10th243_248.pdf)
- Wu, F., Cen, Y., Deng, X., Chen, J., Xia, Y. and Liang, G. (2015). Movement of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) adult between huanglongbing-infected and healthy citrus. *Florida Entomologist*, 98(2), 410-416. <https://doi.org/10.1653/024.098.0203>

# Differentiation of the Mexican population of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by double-locus genomic with short tandem repeats

## Diferenciación de la población Mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por doble-locus genómico con repeticiones cortas en tándem

Julio Santiago Ahumada-Rodríguez, Jael Arely Cervantes-Santos, Bricia Rivera-Villanueva, Norma Elena Leyva-López, Eduardo Sandoval-Castro, Jesús Méndez-Lozano, María Elena Santos-Cervantes\*, Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Unidad Sinaloa. Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos. Departamento de Biotecnología Agrícola. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, San Joaquín, Guasave, Sinaloa, CP 81101, México. José Joaquín Velázquez-Monreal, Campo Experimental Tecomán-INIFAP, Carretera Colima-Manzanillo km. 35. Tecomán, Colima, CP 28100, México.

\*Autor de Correspondencia: msantos@ipn.mx

Received: August 28, 2022.

Accepted: November 07, 2022.

Ahumada-Rodríguez JS, Cervantes-Santos JA, Rivera-Villanueva B, Leyva-López NE, Sandoval-Castro E, Méndez-Lozano J, Santos-Cervantes ME and Velázquez-Monreal JJ. 2022. Differentiation of the Mexican population of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by double-locus genomic with short tandem repeats. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 150-161.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-6>

**Resumen.** *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) se ha dispersado rápidamente a las regiones productoras de cítricos en México, ocasionando impactos económicos y sociales diferenciados. En México, los principales avances en investigación se han centrado en el manejo del vector, *Diaphorina citri* y en estudios de la interacción de CLAs con limón mexicano. Sin embargo, la variabilidad

genética de la bacteria en regiones productoras de México se ha estudiado poco. Por lo que, en el presente estudio se analizó la variación de la población Mexicana de CLAs con procedimientos basados en PCR, secuenciación y electroforesis capilar a través de la detección del número de repeticiones en tándem (TRN) con dos marcadores STR, AGACA-CA y TACAGAA, el primero localizado en locus genómicos CLIBASIA\_01645 y el segundo en el locus adenosina deaminasas. La distribución de los TRNs en la población Mexicana de CLAs en ambos loci mostraron variaciones con las poblaciones de Florida, China y Brasil. Además, en la población Mexicana se encontraron tres haplotipos, HA, HB y HC, siendo el primer reporte del haplotipo HC en las regiones citrícolas en México. Interesantemente, las subpoblaciones de CLAs del Occidente y Noroeste son diferentes a la del Sureste.

**Palabras clave:** Cítricos, huanglongbing, haplotipos, variación genética.

La citricultura constituye una de las principales actividades en la fruticultura mexicana, ya que ocupa una superficie total cercana a las 570 mil ha, las cuales producen aproximadamente 8.5 millones de toneladas, lo que sitúa a México en el cuarto productor mundial, después de China, Brasil e India (FAOSTAT, 2020). Los principales cítricos que se cultivan son: naranja (*Citrus sinensis*), limón mexicano (*C. aurantifolia*), limón persa (*C. latifolia*), toronja (*C. paradisi*) y mandarina (*C. reticulata*). Sin embargo, la citricultura nacional está siendo seriamente afectada por la enfermedad considerada más destructiva de los cítricos en el mundo llamada Huanglongbing (HLB) (da Graça *et al.*, 2016). El HLB en México se detectó por primera vez en el Municipio de Tizimín, Yucatan en julio de 2009 y actualmente se encuentra en 24 de los 28 estados citrícolas del país (SENASICA, 2018). La enfermedad es causada por especies del género *Candidatus Liberibacter*, aunque también se ha asociado a *Candidatus Phytoplasma* spp. (Teixeira *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Arratia-Castro *et al.*, 2014; Lou *et al.*, 2014; Wulff *et al.*, 2019). La especie presente en México es CLas. El impacto económico y social estimado en tan solo tres años desde la primera detección de la bacteria CLas fue la pérdida de 1.7 millones de toneladas de frutos y 112.1 millones de jornales (Díaz-Padilla *et al.*, 2014). Como estrategia nacional para mitigar los daños ocasionados, se diseñó e implementó la campaña fitosanitaria contra el HLB, la cual se enfocó inicialmente a la detección y búsqueda de síntomas asociados a la bacteria CLas, remoción de árboles enfermos y al control del vector, *D. citri* a través de áreas regionales de control.

La investigación sobre HLB es limitada por la naturaleza incultivable de la bacteria CLas en medios artificiales. Esta bacteria es un parásito obligado de las células del floema, por lo que los estudios se limitan a las técnicas de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), a partir de la estimación del tamaño de los productos de PCR, análisis de secuencias de genes amplificados por PCR, caracterización de fragmentos de restricción de longitud polimorfa (RFLPs), además, de aplicaciones más amplias, tales como el análisis de microsatélites y el análisis de pan-genomas (Bastianel *et al.*, 2005; Tomimura *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Katoh *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013; Katoh *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016). Actualmente se cuenta con la secuenciación del genoma completo de CLas, tanto del tejido infectado como del insecto vector, *D. citri* (Duan *et al.*, 2009; Tyler *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Wulff *et al.*, 2014; Katoh *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014, 2018), lo que ha permitido la identificación de repeticiones cortas en tándem (STR). Los STR, también conocidos como microsatélites, consisten en secuencias repetitivas de nucleótidos en un fragmento de secuencia de ADN con una longitud de dos a seis o más pares de bases (pb). Los microsatélites son considerados marcadores moleculares para estudios de relaciones evolutivas, mapeo genético y genética de poblaciones (Chen *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013; Gosh *et al.*, 2015). Son utilizados ampliamente para realizar un seguimiento de la posible introducción de cepas de CLas de un país a otro (Chen *et al.*, 2010; Katoh *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2012), comprender el efecto de CLas en las plantas (Matos *et al.*, 2013), en el insecto vector (Katoh *et al.*, 2015), en la evolución y para abordar la diversidad intrínseca del patógeno. Además, los estudios genómicos con cepas de referencia pueden ayudar

a identificar el genotipo predominante o raro en un tiempo o región determinada (Katoh *et al.* 2014; Zheng *et al.* 2018).

El análisis con STR ha sido ampliamente utilizado para estudios poblacionales en bacterias (van Belkum *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2015; Gétaz *et al.*, 2018;), incluyendo a CLas (Chen *et al.*, 2010; Katoh *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2012; Matos *et al.* 2013; Ma *et al.*, 2014). Chen y colaboradores (2010) reportaron variaciones con base al número de repeticiones en tándem (TRN) en el marcador STR AGACACA, localizado en el locus genómico CLIBASIA\_01645 de CLas en poblaciones de Guangdong, China y Florida, EUA, encontrando que en la población de Florida predominó el genotipo de cinco repeticiones en tándem (TRN=5) en un 85.5% de las muestras, mientras que en la población de Guangdong predominó el genotipo TRN=7 en un 47.7% de las muestras. Matos y colaboradores (2013) utilizaron cuatro marcadores STR con base a los TRN, incluyendo el locus genómico CLIBASIA\_01645 (AGACACA), el locus adenosina deaminasas (TACAGAA) y dos locus de la bacteria no codificantes (CAGT y TTTG) para analizar la variación de cepas de CLas en poblaciones de Florida, México, varios países de Centro América y la región del Caribe. Sus resultados demostraron la presencia de dos haplotipos (HA y HB) en Florida. Interesantemente estos haplotipos se encontraron en países de América Central, región del Caribe y México; sin embargo, se mostraron diferentes a los obtenidos en las muestras del sur de Asia y de Brasil. No obstante, las muestras de México provenían solo de la Península de Yucatán. El objetivo del presente estudio fue realizar un estudio de diferenciación estructural de las subpoblaciones de CLas del Noroeste, Occidente, Centro y Sureste utilizando doble-locus genómico con repeticiones cortas en tándem.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico y procesamiento

Durante los años 2016 a 2020 se colectaron 177 muestras de follaje de cítricos con síntomas asociadas a la enfermedad HLB de regiones de México. Las regiones del presente estudio fueron Noroeste, con los estados de Sinaloa y Baja California Sur; Occidente, con Colima, Jalisco, Michoacán y Nayarit; Centro, con Estado de México y Morelos; y la Sureste, con Oaxaca, Veracruz Yucatán y Quintana Roo. El número de muestras por especie de cítrico fueron 49 de limón mexicano (*C. aurantifolia*), 68 de limón persa (*C. latifolia*), 40 de naranja (*C. sinensis*), siete de mandarina (*C. reticulata*), siete de toronja (*C. paradisi*), cuatro de limón volkameriano (*C. volkameriana*) y dos de limón italiano (*C. limon*).

Las muestras colectadas de trasladaron al laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos de CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. Se separó y se cortó la nervadura central de las hojas de árboles de cítricos. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se liofilizaron durante 72 h. Las muestras liofilizadas se pulverizaron en un molino TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) durante 1 min (30 Hz), una vez pulverizadas se procedió a realizar las extracciones de ADN, el tejido restante se almacenó a 4 °C en un cuarto frío.

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método del CTAB al 3%, con algunas modificaciones (Zhang *et al.*, 1998). Para la extracción de cada muestra se utilizaron 20 mg de tejido de cítrico liofilizado. A cada muestra se adicionó 800 µL del buffer CTAB al 3% (0.2% β-mercaptoetanol, pH 8, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) precalentado a 60°C. Posteriormente se in-

cubaron a una temperatura de 60 °C por 30 min en un baño de agua de 10L (PolyScience WD10A11B, USA) y se le adicionó a cada muestra 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), estas se agitaron por inversión varias veces. Las muestras se centrifugaron a 13 mil rpm por 10 min en una centrifuga de mesa (Thermo Scientific Sorvall Legend Serie Micro 17, USA) y posteriormente se realizó la recuperación del sobrenadante. Después se adicionaron 15 µL de la enzima RNAsa (100 µg/µL) y se incubó por 20 min a 37°C. Posteriormente se le adicionaron 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), esta se agitó por inversión varias veces y después se centrifugó a 13 mil rpm durante 10 min. Se realizó la recuperación del sobrenadante y se precipitó el ADN con 600 µL de isopropanol (-20 °C) al 100%. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 13 mil rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 1000 µL de etanol al 70% y esta se centrifugó por 4 min a 13 mil rpm. Finalmente se dejó secar la pastilla que contenía el ADN y esta se resuspendió en 30 µL de agua bides-tilada estéril. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C para su análisis posterior.

### Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Para la detección de CLas por PCR convencional se utilizaron los iniciadores A2 (5'-TATTAAAGG-TTGACCTTTCGAGTTT-3') y J5 (5'-ACA-AAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3') que amplifican un fragmento de 703 pb en los genes del β-operon (rplA-rplJ) (Hocquellet *et al.*, 1999). El ensayo de PCR se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL cuyo volumen total de reacción fue de 25 µL, conteniendo 1X de buffer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Brasil), 0.2 pmol de cada primer y 100 ng de ADN genómico total. Las mezclas de PCR se in-

cubaron en un termociclador automático (Applied Biosystems Veriti™). Se utilizaron las siguientes condiciones: 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 62 °C, 1 min a 72 °C; y finalmente un ciclo a 72 °C por 10 min.

### Variación de la población Mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Para el análisis de la variación de CLas se utilizaron los loci genómicos STR CLIBASIA\_0164 y adenosina deaminasas (Cuadro 1). Estos loci mostraron polimorfismo en estudios previos (Chen *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2012; Katoh *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2013). Además, se determinó el contenido de información polimórfica (PIC) para cada marcador STR (Botstein *et al.*, 1980). Para identificar las variaciones entre las cepas de CLas se utilizaron procedimientos basados en PCR, secuenciación y electroforesis capilar. Para el procedimiento de secuenciación, los fragmentos amplificados por PCR se ligaron en el vector de clonación pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Corporation, USA). El producto de la ligación se transformó en células competentes JM109 de *Escherichia coli* siguiendo las especificaciones del proveedor. El ADN plasmídico con el inserto de interés se purificó con el kit Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification Systems (Promega Corporation, USA) y enviado a secuenciar a Langebio-Cinvestav (Irapuato, Guanajuato). Se realizaron alineaciones múltiples de las secuencias obtenidas utilizando el programa CLUSTAL W en MEGA v. 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Los TRNs fueron contabilizados manualmente. Para el marcador AGACA-CA fue secuenciado una muestra de CLas representativa de cada TRN, y para el resto de las cepas se determinaron los TRNs por electroforesis capilar. Para realizar la corrida electroforética se utilizó el kit de alta resolución (QIAxcel High resolution).

**Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la amplificación y caracterización de los loci STR con base número de repeticiones en tándem (TRN) en el genoma de cepas de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’.**

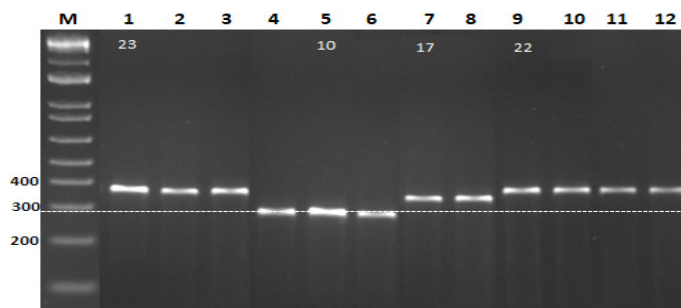
Iniciadores	Secuencia (5’-3’)	TRN	PIC	Referencia
LapGP-1f	gacattcaacggtatcgac	AGACACA	0.6379	Cheng <i>et al.</i> , 2010
LapGP-1r	gcgacataatctcaactcctt			
LasSSR-A-f	cgcctacaggaattcggttacg	TACAGAA	0.8247	Islam <i>et al.</i> , 2012
LasSSR-A-r	gacattcaacggtatcgac			

Se realizó la configuración del software del equipo siguiendo las recomendaciones del fabricante utilizando el método de corrida OM500 con una resolución de hasta 50 pb, el marcador de peso molecular (QX size marker) de 50-800 pb y el marcador de alineamiento interno (QX alignment marker) de 15pb-1kb. Para el marcador TACAGAA se secuenciaron 44 muestras de CLas representativas de cada subpoblación bajo estudio y por especie de cítrico. Para las muestras con múltiple amplicón se seleccionaron 10 clonas plasmídicas (pGEM-T) para identificar y secuenciar cada amplicón con diferente TRN (doble o triple amplicón).

Se analizaron las variaciones en ambos loci con base a los TRNs tanto en muestras que amplificaron un simple amplicón (SA) como las de múltiple

amplicón (MA). La identificación de los TRNs de las muestras se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa con una cepa de referencia correspondiente a un amplicón de 291 pb y TRN igual a 10 (Figura 1). Se establecieron otras referencias utilizando muestras con diferentes TRN determinados por secuenciación (TRN=17, 22) (Figura 1).

Los haplotipos se identificaron con base al sistema de agrupación binaria (TRN $\leq$ 10/TRN $\geq$  10) establecido por Chen y colaboradores (2010) y aplicado exitosamente para el análisis de poblaciones de CLas en China, Florida, México, y países de Centro América y región del Caribe (Matos *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014). Un haplotipo o genotipo haploide es la combinación de alelos que se encuentran en dos o más loci en un solo individuo.



**Figura 1. Genotipificación de cepas representativas de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ de regiones productoras de cítricos utilizando los iniciadores LasSSR-A-f/LasSSR-A-r que amplifican el locus adenosina deaminasas (STR TACAGAA). Carril M: Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen Life Technologies, Brasil). Líneas de 1 a 4 son muestras de la región de Occidente. Líneas 5 a 9 son muestras de la región Noroeste. Líneas 10 y 11 son muestras de la región Sureste. Línea 12 muestra de la región Centro. Los números en blanco indican los números de repeticiones en tándem (TRN). La línea horizontal punteada indica TRN=10.**

La diferenciación de la estructura de la población Mexicana de CLas revelada por los TRNs se describió estimando su distribución para cada marcador STR, identificación y porcentaje de haplotipos, el número de alelos y el índice de diversidad de Nei.

El índice de diversidad de Nei (valor H) se calculó con la herramienta GenAlex 6.5 utilizando la siguiente fórmula:

$H = 1 - \sum p_i^2$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo en el locus  $i$  (Nei, 1972).

## RESULTADOS

### Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Se detectó por PCR a CLas en 150 de un total de 177 muestras de cítricos de las subpoblaciones del Noroeste, Occidente, Centro y Sureste, obteniéndose el fragmento esperado de 703 pb (Datos no mostrados) (Hocquelllet *et al.*, 1999).

### Variación de la población Mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Para realizar el análisis de variación de la población Mexicana de CLas se seleccionaron 87 muestras de los cítricos positivos con base al origen geográfico de la muestra, el número de muestras por huerto analizado, la distancia entre los lugares de colecta y el tipo de cítrico.

Las 87 muestras para analizar la variación de la población Mexicana de CLas amplificaron con los dos marcadores STR utilizados en el presente estudio, obteniéndose valores de PIC de 0.6379 y 0.8247 para los marcadores AGACACA y TACAGAA, respectivamente (Cuadro 1), por lo que ambos marcadores se consideran informativos o polimórficos, ya que tienen valores de PIC superiores a 0.5 con base a los valores sugeridos por Botstein y colaboradores (1980).

Con el marcador AGACACA amplificaron 85 (97.7%) muestras con simple amplicón (SA) y dos muestras con múltiple amplicón (MA) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Distribución del número de repeticiones tándem (TRN) de único amplicón (SA) y múltiple amplicón (MA) en dos loci STR en la población mexicana de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'.**

Población	SA TRN AGACACA													Total	MA <sup>z</sup>	Total	
	5	8	9	10	12	13	14	15	16	17	19	22	23				24
Noroeste		1			2		16	1			1				21		21
Occidente						12	27	12							51	1	52
Centro							2								2	1	3
Sureste	3						6	1			1				11		11
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>1</b>			<b>2</b>	<b>12</b>	<b>51</b>	<b>14</b>			<b>2</b>			<b>85</b>	<b>2</b>	<b>87</b>	

Población	TRN TACAGAA													Total	MA <sup>z</sup>	Total	
	5	8	9	10	12	13	14	15	16	17	19	22	23				24
Noroeste			1	2			3			2		4		4	16	5(5)	21
Occidente			1	6	2		1		2	9		16	2	12	51	1(1)	52
Centro							2					1			3		3
Sureste	3	2	3									3			11		11
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>11</b>	<b>2</b>			<b>6</b>		<b>2</b>	<b>11</b>		<b>24</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>81</b>	<b>6</b>	<b>87</b>

<sup>z</sup>Los números entre paréntesis en las muestras con múltiple amplicon fueron seleccionadas para secuenciación.



Mientras que, para el marcador TACAGAA amplificaron 81 (93.1%) muestras SA y en seis muestras se observaron de 2 a 3 amplicones (Cuadro 2). Con el marcador AGACACA los TRN con SA fueron de 5, 8, 12, 13, 14, 15 y 19 repeticiones, predominando en orden de mayor a menor repeticiones el de 14, 15 y 13 con el 90.5% de las muestras, correspondiente al total de las muestras de Occidente. En el Noroeste y Sureste se encontraron los TRN 14 y 15, mientras que en el Centro solo el TRN 14. El TRN de cinco solo se encontró en la región Sureste, aunque con baja presencia (3.5%). Los TRN 8 y 9 se encontraron solo en la región Noroeste, aunque también en pocas muestras (1.1% y 2.3%, respectivamente). El TRN 19 se encontró con baja presencia en la región Noroeste (1.1%) y Sureste (1.1%). Los TRNs con SA con el marcador TACAGAA fueron más diversos, aunque predominó el TRN 22 en todas las regiones citricolas (30.4%), siguiéndole el TRN 24 (29.6%) y 17 (13.6%) en las regiones Noroeste y Occidente. Los TRNs 9 (4.9%) y 10 (13.6%) se encontraron en la región Noroeste, Occidente y Sureste. El TRN tres se encontró solamente en la región Sureste (3.7%). Los TRNs 12 (2.5%), 16 (2.5%) y 23 (2.3%) solo se encontraron en la región Occidente (Cuadro 2).

Las cepas de CLas se clasificaron en haplotipos con base al sistema de agrupación binaria  $TRN \leq 10$  /  $TRN \geq 10$  y combinación de alelos con ambos marcadores. Las cepas Mexicanas de CLas se clasificaron en tres haplotipos (Cuadro 3), predominando el haplotipo B (HB) en todas las regiones citricolas con el 72.9% de las muestras, seguido por el haplotipo C (HC) encontrado en las regiones citricolas Noroeste, Occidente y Sureste con el 20.8% de las muestras y el haplotipo A (HA) se encontró con baja presencia en el Noroeste (1.1%), Occidente (1.1%) y Sureste (3.3%) (Cuadro 3).

El número de alelos de CLas de las regiones citricolas por cada marcador varió entre dos y once

(Cuadro 4). Las cepas de CLas con el marcador TACAGAA mostraron la mayor variabilidad genética con doce alelos y un índice de diversidad de Nei global de 0.694. Con el marcador AGACACA se encontraron nueve alelos y un índice de diversidad de Nei global de 0.574 (Cuadro 4). Las cepas de CLas de la región Noroeste mostraron el mayor número de alelos (media de ocho alelos por marcador), obteniéndose once alelos con el marcador TACAGAA, mientras con el marcador AGACACA solo se obtuvieron cinco; seguido de la región Occidente y Sureste con una media de 6.5 y 4.5 alelos, respectivamente, con nueve y cuatro alelos con el marcador TACAGAA, así como cuatro y cinco con AGACACA, respectivamente (Cuadro 4). La diversidad genética de las cepas de CLas de las regiones citricolas mexicanas varió de 0.375 a 0.862 por marcador (Cuadro 4). La mayor variabilidad genética se obtuvo con el marcador TACAGAA en la región Noroeste (0.862), seguida por Occidente (0.797), Sureste (0.744) y Centro (0.375). Sin embargo, al tomar en cuenta la media de la diversidad genética de ambos marcadores, los valores variaron de 0.375 a 0.744 correspondiente a la región Centro y Sureste, respectivamente con una media de 0.634. Así, las cepas de CLas de la región Sureste (0.744) mostraron la mayor diversidad genética, seguida por la región Occidente (0.717), Noroeste (0.702) y Centro (0.375) (Cuadro 4).

## DISCUSIÓN

Se describe la variación entre la población Mexicana de CLas asociada a la enfermedad más importante de los cítricos en la última década en el país, llamada Huanglongbing. Los resultados de distribución de los TRNs en la población Mexicana de CLas en el locus CLIBASIA\_0164 y el locus adenosina deaminasas mostraron variaciones con

**Cuadro 3. Frecuencia de haplotipos en la población Mexicana de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ con base al análisis del número de repeticiones en tandem (TRN) por doble locus genómico.**

Haplotipo	Marcador		Población <sup>y</sup>				Total	Referencia
	AGACACA TRN	TACAGAA TRN	Noroeste	Occidente	Centro	Sureste		
HA	≤10	9			Na <sup>z</sup>			Matos <i>et al.</i> , 2013
		10						
HB	≥10	15						Este estudio
		16						
HA	≤10	8				3.3	3.3	Este estudio
		14			1.1		1.0	
		22	1.1				1.0	
		24		1.1			1.0	
<b>Total</b>			<b>1.1</b>	<b>1.1</b>	<b>1.1</b>	<b>3.3</b>	<b>6.3</b>	
HB	≥10	12		2.2			2.2	Este estudio
		14		1.1	1.1		2.2	
		16	1.1	2.2			3.3	
		17	5.4	8.7			14.1	
		19	1.1				1.1	
		22	4.3	19.6	1.1	3.3	28.3	
		23	1.1	2.2			3.3	
		24	6.5	11.9			18.4	
<b>Total</b>			<b>19.5</b>	<b>47.9</b>	<b>2.2</b>	<b>3.3</b>	<b>72.9</b>	
HC	≥10	4	1.1				1.1	Este estudio
		8	1.1				1.1	
		9	1.1	2.2		2.2	5.4	
		10	3.3	6.5		3.3	13.1	
<b>Total</b>			<b>6.6</b>	<b>8.7</b>		<b>5.4</b>	<b>20.8</b>	

<sup>y</sup>El valor corresponde al porcentaje de cada combinación alélica en muestras infectadas de la población Mexicana de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’.

<sup>z</sup>No aplica, corresponden a haplotipos encontrados en Florida, EUA.

**Cuadro 4. Diversidad genética de la población Mexicana de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ descrita mediante el número de alelos y el índice de diversidad de Nei (H) con base al análisis del número de repeticiones en tándem (TRN) por doble locus genómico.**

Población	Número de Alelos			H		
	AGACACA	TACAGAA	Media	AGACACA	TACAGAA	Media
Noroeste	5	11	8	0.541	0.862	0.702
Occidente	4	9	6.5	0.638	0.797	0.717
Centro	2	2	2	0.375	0.375	0.375
Sureste	5	4	4.5	0.744	0.744	0.744
Total	9	12	5.25	0.574	0.694	0.634

las poblaciones de Florida, China y Brasil. En la población Mexicana de CLas analizada en este estudio, con el marcador STR AGACACA, predominó el TRN 14, mientras que, en las poblaciones de Florida, China y Brasil predominaron los TRNs 5, 7 y 15, respectivamente (Chen *et al.*, 2010; Matos *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014; da Silva *et al.*, 2019). Con el marcador STR TACAGAA en la población Mexicana de CLas predominó el TRN 22, mientras en las poblaciones de Florida, China y Brasil predominaron los TRNs 16, 26 y 18, respectivamente (Matos *et al.*, 2013).

Siguiendo el sistema de clasificación de haplotipos desarrollado por Matos y colaboradores (2013), la población Mexicana de CLas se agrupó en tres haplotipos (HA, HB y HC), mientras que, en un estudio previo con muestras de Florida, la Península de Yucatán y países de Centro América y región del Caribe solamente se encontraron los haplotipos HA y HB (Matos *et al.*, 2013). La combinación de TRNs con el doble locus genómico que permitió la clasificación del nuevo haplotipo HC en el presente estudio no había sido reportada previamente en la población Mexicana de CLas, tampoco en EUA, China y Brasil (Matos *et al.*, 2013), la cual consiste en la combinación de TRNs igual o mayores a 10 con el marcador AGACACA y TRNs igual o menores a 10 con el marcador TACAGAA. Algunos autores mencionan que el número de muestras es fundamental para una buena caracterización de cepas de CLas cuando la extensión de los huertos es grande (da Silva *et al.*, 2019). Sin embargo, otro de los elementos relevantes en estudios de diversidad genética es el PIC, el cual depende del número de alelos y de las frecuencias relativas de los locus utilizados. El haplotipo HC se identificó en las subpoblaciones Noroeste, Occidente y Sureste en un bajo número de muestras; sin embargo, el PIC de los loci STR utilizados en el presente estudio fue mayor a 0.5, por lo tanto, estos se consideran

informativos o polimórficos (Botstein *et al.*, 1980). En el estudio realizado por Matos y colaboradores (2013) en la Península de Yucatán se analizó un mayor número de muestras con la misma combinación de marcadores STR utilizados en este estudio, reportando que el haplotipo HA fue el predominante, seguido del haplotipo HB, mientras que en el presente estudio, en la población del Sureste, que incluye también la Península de Yucatán se encontraron tres haplotipos, con una ligera predominancia del haplotipo HC, seguidos de los haplotipos HA y HB, además de mostrar la más alta diversidad genética, lo que puede estar relacionado a que en esta subpoblación fue donde se reportó por primera vez la presencia de la bacteria CLas en julio de 2009 en árboles de limón mexicano (Trujillo, 2010). Por otro lado, podría ser que los haplotipos HA y HB se introdujeron a la Península de Yucatán desde Florida y se hayan dispersado a las regiones cítricas productoras de México y debido a la importancia en cuanto a superficie establecida y producción de cítricos en el país, poblaciones altas del insecto vector, alta incidencia de árboles infectados y condiciones climatológicas favorables haya ocasionado variaciones genéticas y la aparición de un nuevo haplotipo de la bacteria en la población Mexicana. Además, otro resultado interesante es que las subpoblaciones del Occidente y Noroeste son diferentes a la del Sureste, ya que, el haplotipo HB fue el que predominó en estas subpoblaciones. La diferencia entre subpoblaciones podría estar asociado al impacto o intensidad de la enfermedad HLB, ya que la región de Occidente, en el pacífico mexicano es considerada de alta intensidad y la región de la Península de Yucatán de baja intensidad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Sería interesante investigar en un futuro las poblaciones de CLas de los principales países productores de cítricos tales como China, Brasil, EUA y México que permita comprender la diversidad evolutiva, su estructura

genética, así como el impacto epidemiológico de la bacteria. Otra investigación de gran relevancia que afecta las poblaciones de CLas es la tasa de evolución de los loci genómicos CLIBASIA\_01645 y adenosina deaminasas.

## CONCLUSIONES

En la población Mexicana de CLas se encontraron tres haplotipos, HA, HB y HC. En las subpoblaciones del Occidente y Noroeste predominó el haplotipo HB, mientras en la del Sureste se encontró una ligera predominancia del haplotipo HC. El haplotipo HA se encontró con baja prevalencia en toda la población. Este es el primer estudio de variaciones genéticas en la población Mexicana de CLas por doble-locus genómico con repeticiones cortas en tándem, además, es el primer reporte del haplotipo HC en las regiones cítricas en México.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento otorgado con el proyecto SIP 2016-4826. Ahumada Rodríguez agradece al CONACYT y al IPN por su beca de estudios de posgrado.

## LITERATURA CITADA

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>
- Bastianel C, Garnier-Semancik M, Renaudin J, Bové JM and Eveillard S. 2005. Diversity of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus," based on the omp gene sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11):6473-6478. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6473-6478.2005>
- Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32(3):314-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686077>
- Chen J, Deng X, Sun X, Jones D, Irey M and Civerolo E. 2010. Guangdong and Florida populations of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' distinguished by a genomic locus with short tandem repeats. *Phytopathology* 100(6):567-72. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-6-0567>
- Chen J, Pu X, Deng X, Liu S, Li H and Civerolo E. 2009. A phytoplasma related to '*Candidatus* phytoplasma asteri' detected in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99(3):236-242. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0236>
- da Graça JV, Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G and Zhao H. 2016. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology* 58(4): 373-87. <https://doi.org/10.1111/jipb.12437>
- da Silva PA, Fassini CG, Sampaio LS, Dequigiovanni G, Zucchini MI and Wulff NA. 2019. Genetic diversity of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' revealed by short tandem repeats and prophage typing indicates population homogeneity in Brazil. *Phytopathology* 109:960-971. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0295-R>
- Deng X, Lopes S, Wang X Sun X, Jones D, Irey M, Civerolo E and Chen J. 2014. Characterization of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus" populations by double-locus analyses. *Current Microbiology* 69:554-560. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0621-9>
- Díaz-Padilla G, López-Arroyo JI, Quijano-Carranza JA, Mora-Aguilera G, Guajardo-Panes RA and Sánchez-Cohen I. 2014. Áreas de abundancia potencial en México del vector del Huanglongbing, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(7):1137-1153. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263131533001>
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y and Gottwald T. 2009. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(8):1011-20. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>
- FAO, 2020. Base de datos FAOSTAT, Datos sobre alimentación y agricultura. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QI>. Fecha de consulta: Agosto 2022
- Gétaz M, Krijger M, Rezzonico F, Smits THM, van der Wolf JM and Pothier JF. 2018. Genome-based population structure analysis of the strawberry plant pathogen *Xanthomonas fragariae* reveals two distinct groups that evolved independently before its species description. *Microbial genomics* 4(7):e000189. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000189>
- Ghosh DK, Bhose S, Motghare M, Warghane A, Mukherjee K, Ghosh DK Sr, Sharma AK, Ladaniya MS and Gowda S. 2015. Genetic Diversity of the Indian Populations of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' Based on the Tandem Repeat Variability in a Genomic Locus. *Phytopathology*

- 105(8):1043-9. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0253-R>
- Hocquellet A, Toorawa P, Bove JM and Garnier M. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus liberibacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the  $\beta$  operon. *Molecular and cellular probes* 13(5):373-379. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0263>
- Islam MS, Glynn JM, Bai Y, Duan YP, Coletta-Filho HD, Kuruba G, Civerolo EL and Lin H. 2012. Multilocus microsatellite analysis of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing worldwide. *BMC Microbiology* 12,39. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-39>
- Katoh H, Inoue H and Iwanami T. 2015. Changes in Variable Number of Tandem Repeats in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' through Insect Transmission. *PLoS One* 10(9):e0138699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138699>
- Katoh H, Miyata S, Inoue H and Iwanami T. 2014. Unique features of a Japanese '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' strain revealed by whole genome sequencing. *PLoS One* 2;9(9):e106109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106109>
- Katoh H, Subandiyah S, Tomimura K, Okuda M, Su HJ and Iwanami T. 2011. Differentiation of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" isolates by variable-number tandem-repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5) 1910-1917. <https://doi.org/10.1128/AEM.01571-10>
- Lin H, Han CS, Liu B, Lou B, Bai X, Deng C, Civerolo EL and Gupta G. 2013. Complete genome sequence of a Chinese strain of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". *Genome announcements* 1(2):e00184-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00184-13>
- Lin H, Islam MS, Cabrera-La Rosa JC, Civerolo EL and Groves RL. 2015. Population structure of *Xylella fastidiosa* associated with almond leaf scorch disease in the San Joaquin Valley of California. *Phytopathology* 105(6):825-32. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0254-R>
- Lou B, Bai X, Bai Y, Deng C, RoyChowdhury M, Chen C and Song Y. 2014. Detection and molecular characterization of a 16SrII-A\* phytoplasma in grapefruit (*Citrus paradisi*) with Huanglongbing-like symptoms in China. *Journal of Phytopathology* 162(6):387-395. <https://doi.org/10.1111/jph.12200>
- Ma W, Liang M, Guan L, Xu M, Wen X, Deng X and Chen J. 2014. Population structures of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in Southern China. *Phytopathology* 104(2):158-62. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-13-0110-R>
- Matos LA, Hilf ME, Chen J and Folimonova SY. 2013. Validation of 'variable number of tandem repeat'-based approach for examination of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' diversity and its applications for the analysis of the pathogen populations in the areas of recent introduction. *PLoS One* 8(11): e78994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078994>
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JI, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-Espinosa A, Loeza-Kuk E and González-Gómez R. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista mexicana de fitopatología* 32(2):108-119. [https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2\\_03.pdf](https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf)
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106(949):283-292. [doi.org/10.1086/282771](https://doi.org/10.1086/282771)
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2018. Vigilancia del huanglongbing. Disponible en: <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/HLBV2.aspx>. Fecha de consulta: Agosto de 2022
- Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Eveillard-Jagoueix S, Yamamoto PT, Ayres AJ and Bové JM. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22(3):139-150. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.12.006>
- Tomimura K, Furuya N, Miyata SI, Hamashima A, Torigoe H, Murayama Y, Kawano S, Okuda M, Subandiyah S, Su HJ and Iwanami T. 2010. Distribution of two distinct genotypes of citrus greening organism in the Ryukyu Islands of Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 44(2):151-158. <https://doi.org/10.6090/jarq.44.151>
- Trujillo AJ. 2010. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Oficio B00.01, 01,01.03.-02788. Circular No. 056. 16 de abril de 2010. <https://cofemersimir.gob.mx/expediente/9106/mir/35008/archivo/745812>
- Tyler HL, Roesch LFW, Gowda S, Dawson WO and Triplett EW. 2009. Confirmation of the sequence of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' and assessment of microbial diversity in huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 22(12):1624-1634. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1624>
- van Belkum A, Scherer S, van Alphen L and Verbrugh H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(2):275-93. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.275-293.1998>
- Wulff NA, Fassini CG, Marques VV, Martins EC, Coletti DAB, Teixeira DDC, Sanches MM and Bové JM. 2019. Molecular Characterization and Detection of 16SrIII Group Phytoplasma Associated with Huanglongbing Symptoms. *Phytopathology* 109(3):366-374. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-18-0081-R>
- Wulff NA, Zhang S, Setubal JC, Almeida NF, Martins EC, Harakava R, Kumar D, Rangel LT, Foissac X, Bové JM and Gabriel DW. 2014. The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with Citrus Huanglongbing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27(2):163-76. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0292-R>

- Zhang S, Flores-Cruz Z, Zhou L, Kang BH, Fleites LA, Goch MD, Wulff NA, Davis MJ, Duan YP and Gabriel DW. 2011. '*Ca. Liberibacter asiaticus*' carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 24(4):458-68. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-10-0256>
- 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(1):45-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)
- Zheng Z, Bao M, Wu F, Chen J, and Deng X. 2016. Predominance of single prophage carrying a CRISPR/cas system in "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" strains in southern China. *PLoS One* 11:e0146422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146422>
- Zheng Z, Bao M, Wu F, Van Horn C, Chen J and Deng X. 2018. A Type 3 Prophage of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Carrying a Restriction-Modification System. *Phytopathology*. 108(4):454-461. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-17-0282-R>
- Zheng Z, Deng X and Chen J. 2014. Whole-Genome Sequence of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" from Guangdong, China. *Genome announcements* 2(2):e00273-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00273-14>
- Zhou L, Powell CA, Hoffman MT, Li W, Fan G, Liu B, ... and Duan, Y. 2011. Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats. *Applied and Environmental Microbiology* 77(18):6663-667. <https://doi.org/10.1128/AEM.05111-11>.

# Quantitative procedure to estimate area-wide pest preventive-management with application to Huanglongbing - *Diaphorina citri* on citrus crops

## Procedimiento cuantitativo para estimar áreas regionales de manejo preventivo de plagas con aplicación al Huanglongbing - *Diaphorina citri* en cultivos citrícolas

**Gustavo Mora-Aguilera\***; **Gerardo Acevedo-Sánchez**; Colegio de Posgraduados - Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF). Texcoco, Estado de México. C.P. 56230; **Pedro Robles-García**; SENASICA-DGSV. Av. Insurgentes Sur 489, Hipódromo, Cuauhtémoc, 06100, CDMX.

\*Corresponding author: morag@colpos.mx

Received: August 10, 2022.

Accepted: November 08, 2022.

Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G and Robles-García P. 2022. Quantitative procedure to estimate area-wide pest preventive-management with application to Huanglongbing - *Diaphorina citri* on citrus crops. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 162-182.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-17>

**Resumen.** CLas, agente causal del huanglongbing (HLB), importante enfermedad de los cítricos debido a múltiples implicaciones socioeconómicas se detectó en México en julio 2009. Durante la primera fase de detección y expansión epidémica, las acciones oficiales se enfocaron a diseñar y operar Áreas Regionales de Control de *Diaphorina citri*, denominados ARCOs. Estos se concibieron con criterios epidemiológicos racionales de prevención de riesgos y de optimización de recursos financieros y humanos. Este trabajo tuvo como objetivo sustentar el marco holístico-sistémico, demostrar

y aplicar la metodología epidemiológica espacio-temporal desarrollada para estimar ARCOs en México. En la dimensión temporal se empleó la incidencia en focos a tres niveles espaciales: regional (estado), subregional (municipio) y parcelario, los cuales permitieron generar un modelo flexible integrativo multidimensional, basado en Weibull, para estimar riesgos de incidencia de huanglongbing a diferentes horizontes temporales. En la dimensión espacial se generó un modelo integrado por un *factor de riesgo* generado con variables asociadas al sistema epidemiológico aplicable a nivel estatal-municipal: susceptibilidad de especie de cítrico, superficie citrícola, carga de inóculo en planta y vector, índice de abundancia de DC e índice de traspatio. Este factor de riesgo se empleó para ponderar simulaciones de escenarios contratantes de dispersión espacial-municipal estimados con datos regionales de Sao Pablo-Brasil, Florida-EUA, Yucatán y Colima-México, únicos disponibles durante la fase de esta-

blecimiento de CLas en América. La integración de las dimensiones espacio-tiempo se emplearon para estimar el número, hectáreas de cobertura, localización y riesgo intervenido de ARCOs por entidad federativa. Algoritmos automáticos de cálculo se integraron a simulaciones Monte Carlo en @RCOs HLB v1.0. El sistema ARCOs fue empleado con éxito preventivo en México y constituyó un sistema vanguardista en la citricultura mundial.

**Palabras clave:** Weibull, HLB, *Diaphorina citri*, Simulación Monte Carlo, *Citrus* spp

En México, durante la fase de ingreso y expansión epidémica de CLas se tenían definidos dos escenarios epidémicos del Huanglongbing (HLB): 1) Región del Pacífico, con mayor intensidad y con prevalencia en huertos comerciales y 2) Península de Yucatán, con menor intensidad y con prevalencia en traspatios a pesar de ser la región donde se detectó al HLB por primera vez en el 2009 (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Actualmente, países como Brasil, EUA y México realizan el manejo del HLB a través de tres estrategias complementarias: 1) Erradicación de plantas enfermas; 2) Control regional de *Diaphorina citri* (DC), vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), agente causal del HLB en México; y 3) Uso de plantas certificadas (Bassanezi *et al.*, 2013; Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Rogers *et al.*, 2011). Este último es el más complicado de realizar debido a la problemática social que implica. Con este fin, OIRSA desarrolló para sus países miembros, los lineamientos de armonización normativa regional de certificación fitosanitaria de material propagativo de cítricos, documento en el cual se establecen los procedimientos y requisitos fitosanitarios para la regulación de material de propagación de cítricos (OIRSA, 2013). Únicamente Brasil ha logrado la aplicación exitosa de estas tres

acciones complementarias en la región productiva de San Pablo evidenciado con relativa baja incidencia y altos niveles productivos (Pazoline *et al.*, 2021; Bassanezi *et al.*, 2012). Sin embargo, en regiones citrícolas donde el escenario epidémico del HLB es endémico, la erradicación de plantas es una opción inviable (Belasque *et al.*, 2009) y se requiere enfatizar el control regional del vector y el uso de plantas certificadas, p.e. región Pacífico de México, o Florida, EUA.

El control del vector se realiza principalmente mediante productos químicos y en menor medida con técnicas o enfoques biológicos mediante parasitoides, depredadores y entomopatógenos (Ruiz-Cancino *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2012). En la actualidad, existen varias líneas de investigación de control biológico con resultados promisorios cuya aplicación, en corto plazo, podría dirigirse en áreas rurales y urbanas de traspatio y zonas citrícolas específicas con bajo nivel tecnológico (López-Arroyo y Rocha-Peña, 2012). En México, el control biológico del DC se realiza en algunas regiones mediante la liberación de *Tamarixia radiata* y se cuenta con dos laboratorios de reproducción masiva que permiten la liberación coordinada en los diferentes estados citrícolas del país (Arredondo-Bernal, 2013). Con respecto al control químico, en México, los insecticidas aprobados por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) fueron validados por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) mediante una evaluación de insecticidas convencionales y alternativos recomendados para el control del DC, en cuanto a efectividad e inducción de resistencia (IRAC, 2012).

El enfoque de *control regional* del DC fue desarrollado experimentalmente en Fundo de Defensa da Citricultura (FUNDECITRUS) y aplicado comercialmente por empresas, principalmente de San Pablo, Brasil (Bassanezi *et al.*, 2013). Sin embar-



go, la producción extensiva de Brasil ha favorecido esta estrategia por rapidez en la toma de decisiones y la amplia cobertura asociada a pocos productores. Su adecuación para otras condiciones, ha implicado la cuidadosa definición de criterios para el establecimiento de áreas de manejo regional optimizando los recursos humanos y económicos para el caso donde se han diseñado estrategias con apoyo oficial como México. Las razones técnicas para implementar y mantener áreas regionales de control de DC, sobre todo con la presencia de HLB en una región, son las siguientes: 1) retrasar el inicio de la epidemia en 299 días aproximadamente, 2) reducir la infección de manera efectiva al disminuir la población de psílicos de huertas adyacentes, tiene un gran efecto en reducir la incidencia (90%) y la tasa de progreso (75%) del HLB; la incidencia inicia más tarde y es más lenta, 3) reducir la población de psílicos locales (de 76 a 97%), aún en huertos abandonados, permite el uso de un programa menos intensivo de control local del vector, y 4) reduce los costos de manejo del HLB, porque las aplicaciones son menos intensivas y más eficientes (Bassanezi *et al.*, 2013). Bové (2012), señala que en el caso de los pequeños productores que se localizan en áreas con baja incidencia de HLB, deben formar áreas compactas de manejo regional de al menos 500 ha, en las cuales se realice el control del vector y la eliminación de plantas enfermas. Si bien esta aseveración carece de un sustento epidemiológico sí puntualiza un problema central relativo al tamaño del área que debe considerar un control regional.

En Florida, se recomienda la creación de CHMAs por sus siglas en inglés (Citrus Health Management Areas) para coordinar las acciones de manejo del HLB, las cuales tengan una incidencia del HLB relativamente baja y de un tamaño de 4,000 a 20,000 ha (Rogers *et al.*, 2010). En este caso Gottwald *et al.* (2014) señala que existen factores de riesgo que deben considerarse como: sus-

ceptibilidad del cultivar, superficie del huerto, edad de plantas, cercanía de foco (distancia con plantas y vectores positivos), entre otros; para así realizar una mejor predicción de las áreas con mayor riesgo que deben ser manejadas con CHMAs. Adicionalmente, este autor señala que con un número suficiente de evaluaciones se puede optimizar el tamaño, localización y número; complementariamente se puede determinar la eficacia de esta estrategia con fines de validar su uso. Sin embargo, esta propuesta carece de otros criterios como la dirección y velocidad de dispersión del HLB.

En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) mediante la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) implementó un programa piloto de control de *D. citri*, en los estados de Colima, Michoacán y Yucatán, en el cual se realizó la aplicación de aceites minerales, sales potásicas y productos químicos en una superficie estimada de 20,000 ha (Robles, 2012). Adicionalmente, Robles (2012) menciona que el SENASICA, en colaboración con el INIFAP, investigadores de otras instituciones y técnicos de los Organismos Auxiliares de Sanidad Vegetal (OASV) elaboraron un protocolo para establecer áreas regionales de control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). La aplicación de enfoques epidemiológicos para estimar el riesgo de dispersión y establecimiento de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) requiere la integración de modelos espacio-temporales en el contexto del sistema productivo cítrico (Mora-Aguilera *et al.*, 2013; 2014; Bassanezi *et al.*, 2013; Salcedo *et al.*, 2010); y con excepción de la propuesta de Gottwald *et al.* (2014), los planteamientos para el control regional de DC carecen de criterios epidemiológicos claros para la estimación del riesgo del HLB y todos desdeñan la dirección y velocidad de dispersión de CLAs, así como la gradualidad del proceso epidémico por

lo que este estudio se planteó con el objetivo de estimar la superficie (hectáreas) operables para la estrategia de Control Regional de *Diaphorina citri* (ARCOs) mediante un *enfoque temporal y espacial* para el manejo del HLB en México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Regionalización del HLB en México.** A partir de los reportes oficiales de positivos de CLas en planta y vector hasta octubre de 2015 en México (SENASICA, 2015) se regionalizó el país en tres escenarios epidémicos del HLB, los cuales consideraron los siguientes criterios: superficie citrícola, número y distribución de positivos, e intensidad epidémica del HLB con base en análisis regionales. Esta metodología se empleó en diversos estudios para regionalización de áreas de estudio y para definir riesgos regionales con base en variables del sistema epidemiológico (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Mora-Aguilera *et al.*, 2013; Domínguez-Monge, 2011; Góngora, 2004a). Se clasificaron los siguientes escenarios epidemiológicos con base en su condición epidémica:

- a) *Escenario 1.* Condición epidémica de baja intensidad en la Península de Yucatán, con prevalencia de positivos a CLas en traspatio.
- b) *Escenario 2.* Condición de endemidad en la región del Pacífico (Colima, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Sinaloa y BCS) con mayor intensidad de la enfermedad.
- c) *Escenario 3.* Condición de *focos de infección* en el Golfo de México.

Con base en la regionalización del HLB en México se realizó la estimación de las áreas en riesgo que requieren ser controladas mediante la estrategia ARCOs, con el uso de dos enfoques con

justificación epidemiológica (Mora-Aguilera *et al.*, 2014):

- a) *Enfoque temporal (ET):* se basa en el principio de prevención de la dispersión al tener para reducir la velocidad epidémica del HLB, con el uso de datos de epidemias de México, como prototipo representativo del comportamiento de esta enfermedad en cada región.
- b) *Enfoque espacial (EE):* considera la estimación de riesgo por HLB a partir de un método ponderado de variables del sistema epidemiológico (planta-patógeno-vector-clima-manejo) a nivel municipal para los 24 estados citrícolas del país; complementariamente se basa en tasas de dispersión del HLB obtenidas a partir de análisis de distancias (km) y tiempos de detección (meses) del HLB en Florida, E.U.A. (Irey, 2009); San Pablo, Brasil (Bassanezi *et al.*, 2005); Yucatán (Flores-Sánchez *et al.*, 2011) y Colima (Robles-González *et al.*, 2013), México, los cuales se integran a un modelo general de dispersión, donde Florida, E.U.A., representa el escenario de mayor intensidad y Yucatán, representa el escenario de menor intensidad.

**Enfoque temporal (ET).** A partir de la regionalización del HLB en México, se obtuvieron datos de incidencia del HLB y fechas de evaluación a nivel regional (municipios), municipal (hectáreas) y parcelario (número de plantas), los cuales se emplearon como dimensiones espaciales representativas de cada uno de los escenarios epidémicos del HLB en el país, para estimar las ARCOs por asociación. Por lo anterior, los datos de incidencia y tiempo de epidemias del HLB en Colima, Yucatán, Campeche y Nayarit se ajustaron con el modelo Weibull (Cuadro 1 y Figura 1).

El escenario de la Península de Yucatán (*PEN*) consideró como modelo multidimensional epide-

**Cuadro 1. Modelos epidémicos espacio-temporales por región, especie citrícola y escenario epidémico.**

<sup>1</sup> Región	<sup>2</sup> Especie Citrícola	<sup>3</sup> Regional		<sup>3</sup> Municipal		<sup>3</sup> Parcelario		<sup>4</sup> Tiempo		
		<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>t</i> <sub>1</sub>	<i>t</i> <sub>2</sub>	<i>t</i> <sub>3</sub>
PCO	LI	-	-	-	-	-	-			
	LM	10.84	1.41							
	LP	14.91	0.66	16.66	2.46	41.23	0.51	33	69	93
	M, T, NA, NV	10.84	1.41			18.70	1.79			
PEN								39	75	99
BCS y CHI	Todas	56.90	1.21	37.2	0.72	18.70	1.79	20	56	80
Resto								6	42	66

<sup>1</sup>PAC=Pacífico, PEN=Península, BCS=Baja California Sur, CHI=Chiapas y Resto=Todos los estados fuera de las categorías previas.<sup>2</sup>LI=Limón italiano, LM=Limón mexicano, LP=Limón persa, M=Mandarina, T=Toronja, NA=Naranja agria y NV=Naranja Valencia.<sup>3</sup>En los niveles de análisis espacial corresponden a parámetros *b* y *c* de las epidemias ajustadas con el Modelo Weibull.<sup>4</sup>*t*<sub>1</sub>, 2 y 3 corresponden a escenarios de proyección a 2012, 2015 y 2017, respectivamente.

mias documentadas en Yucatán y Campeche, a nivel regional y municipal, respectivamente (DGSV, 2011), así como epidemias de Yucatán a nivel parcelario (Loeza-Kuk *et al.*, 2010) en un huerto de limón persa (*Citrus latifolia*) del municipio de Tizimín de enero, 2009 a julio, 2011. Las consideraciones epidemiológicas para definición de *PEN* fueron principalmente la primera detección oficial en México en julio de 2009 (SENASICA, 2009), detecciones positivas en traspatios, homogeneidad tecnológico-productiva regional, hospedantes disponibles, entre otros. Los estados que se consideran dentro de este escenario son: Yucatán, Campeche y Quintana Roo (Figura 2), a un horizonte de tiempo (promedio para los 3 estados) de 39 meses a partir de la detección de HLB hasta 2012. Los estados de Baja California Sur, y Chiapas, se integran a este escenario a un horizonte de 20 meses con el mismo criterio de tiempo (Cuadro 1).

El escenario de la región GOLFO y resto de los estados: Baja California, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, y Zacatecas se incluyó a la región *PEN* (Figura 2) con un horizonte de 6 meses, para lo anterior

se consideró ausencia de informes oficiales de la enfermedad durante 2012. Sin embargo, existían condiciones de riesgo debido a la disponibilidad de hospedante y presión de inóculo por otros estados con detecciones positivas como San Luis Potosí y cercanía con Tabasco (SENASICA, 2015).

El escenario del Pacífico (*PCO*) considera como modelo multidimensional una diversidad de epidemias reportadas o estudiadas en Colima a nivel regional y municipal, así como Nayarit y Yucatán a nivel parcelario (Figura 1). La necesidad de contar con variaciones en la dimensión espacial fue importante para caracterizar el incremento temporal de las epidemias en diferentes especies citricolas, p.e. para limón mexicano en Colima, se emplearon epidemias regionales, municipales y parcelarias estudiadas dentro del estado (SENASICA, 2015; Robles-González *et al.*, 2013), a diferencia de limón persa en Nayarit, donde se determinó emplear escenarios regionales y municipales con datos de Colima y parcelarios de Nayarit (Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011) para garantizar resultados más acordes a las condiciones regionales de la especie. Las consideraciones epidemiológicas para definición de *PCO* fueron principalmente homoge-

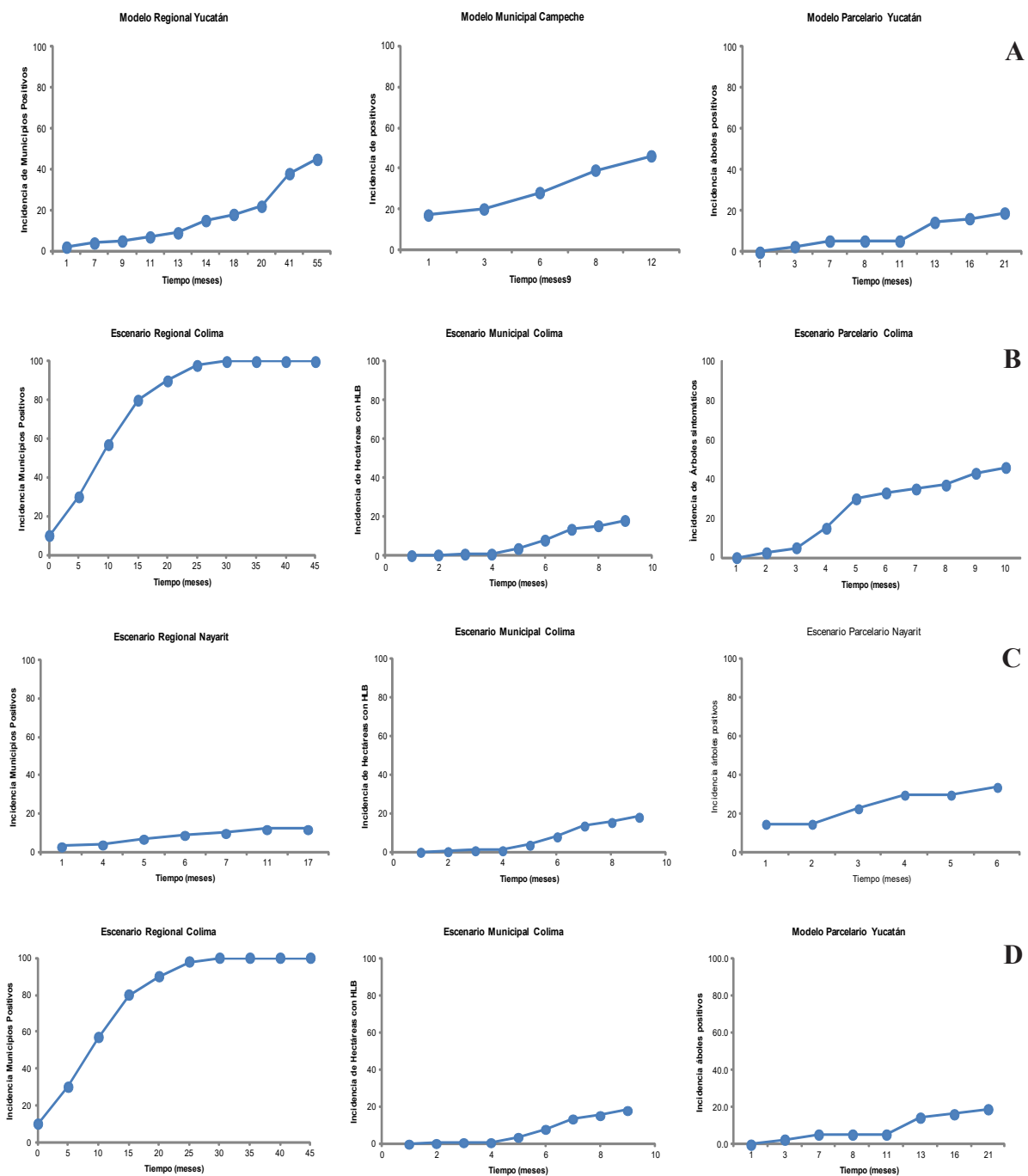


Figura 1. Modelos epidémicos seleccionados para el escenario A) Península de Yucatán y Golfo de México, B) Pacífico-Limón mexicano, C) Pacífico-Limón persa, y D) Pacífico-Cítricos dulces.



Figura 2. Mapa de selección de estados por escenario epidémico del HLB en México. Se muestra las zonas en las cuales se regionalizó epidemiológicamente la superficie cítrica de 28 estados productores a nivel nacional.

neidad tecnológico-productiva regional, hospedantes susceptibles y alta incidencia del HLB, la cual se refiere a la distribución homogénea del HLB en una región. Los estados que se consideran dentro de este escenario son: Colima, Jalisco, Nayarit, Michoacán y Sinaloa (Figura 2).

**Análisis de información y generación de variables.** La incidencia del HLB a nivel regional (municipios), municipal (hectáreas) y parcelario (plantas de cítricos) se calculó con la siguiente ecuación:

$$Inc = (n * 100) / N \quad [E.1]$$

**Dónde:** Inc: es el porcentaje de incidencia de municipios, hectáreas (ha) y plantas con HLB; *n*: es el número de municipios, ha y plantas con HLB; *N*: es el número total de municipios, ha y plantas.

Los datos de incidencia y tiempos de evaluación se ajustaron mediante el modelo flexible *Weibull* (E.2) de dos parámetros (*b*=tasa y *c*=forma), mediante los procedimientos PROC MODEL y PROC NLIN (Jesús Junior *et al.*, 2005). Este último se empleó para la determinación de los límites superiores e inferiores de “*b*” y “*c*”. El modelo *Weibull* se seleccionó por su capacidad flexible para ajust-

tarse a distintas formas e intensidades epidémicas, evitando el uso de más de un modelo temporal que pudiera requerir factores de corrección con fines comparativos. El modelo Weibull se basó en la siguiente ecuación de dos parámetros:

$$y = 1 - EXP\left(\frac{t}{b}\right)^c \quad [E.2]$$

**Dónde:**  $y$  = incidencia de plantas positivas a HLB,  $t$  = tiempo,  $b$  = parámetro de tasa en su forma inversa y  $c$  = parámetro de forma de la curva.

La ecuación general de estimación de incidencia *multidimensional* del HLB se expresa en E.3, la cual calcula las áreas regionales de control o unidades de operatividad (número hectáreas) a ser controladas dentro de  $N$ -parcelas a nivel regional (en este caso estatal) con presencia del HLB (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Salcedo *et al.*, 2010).

$$ARCO = \left\{ Mun * \left[ \left( 1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} * \left\{ Has * \left[ \left( 1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} * \left\{ Arb * \left[ \left( 1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} \quad [E.3]$$

**Dónde:**  $Mun$  = Número total de municipios cítricos por estado;  $Has$  = Número total hectáreas-parcelas por municipio cítrico;  $Arb$  = Número total de árboles por hectáreas-parcelas;  $t$  = horizonte de tiempo para el pronóstico de incidencia;  $b$  = parámetro de tasa en forma inversa;  $c$  = parámetro de forma de la curva de epidemia.

Adicionalmente el ajuste por el modelo Weibull se llevó a cabo de forma desagregada por dimensión espacial:

#### a) Incidencia de municipios con HLB

Corresponde a la primera dimensión espacial, y se refiere al número total de municipios con incidencia de HLB. Se representa con la siguiente ecuación:

$$Inc\_Mun = \left\{ Mun * \left[ \left( 1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} \quad [E.4]$$

#### b) Incidencia de predios/parcela/hectárea

Es el segundo nivel de análisis espacial, en éste se calculó el número total de predios o parcelas dentro de un municipio con presencia de HLB. La unidad espacial es el predio. Se calcula de la siguiente forma:

$$Inc\_Has = \left\{ Has * \left[ \left( 1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} \quad [E.5]$$

#### c) Incidencia de árboles enfermos

Es el tercer nivel de análisis espacial que calculó el número total de árboles positivos dentro de una parcela. Se calcula de la siguiente forma:

$$y = \left\{ Arb * \left[ \left( 1 - EXP^{-\left(\frac{t}{b}\right)^c} \right) \right] \right\} \quad [E.6]$$

#### Representación de las estimaciones generadas.

Se generó una aplicación en MS-Excel, la cual permite visualizar la estimación del riesgo regional (municipios con HLB), municipal (hectáreas con HLB) y parcelario (número de plantas con HLB) a partir de un menú de selección multicriterio: 1) *escenario epidémico*, 2) *estado* y 3) *especie cítrica* (Figura 3), lo cual permite al usuario obtener la información por un proceso racional de selección.

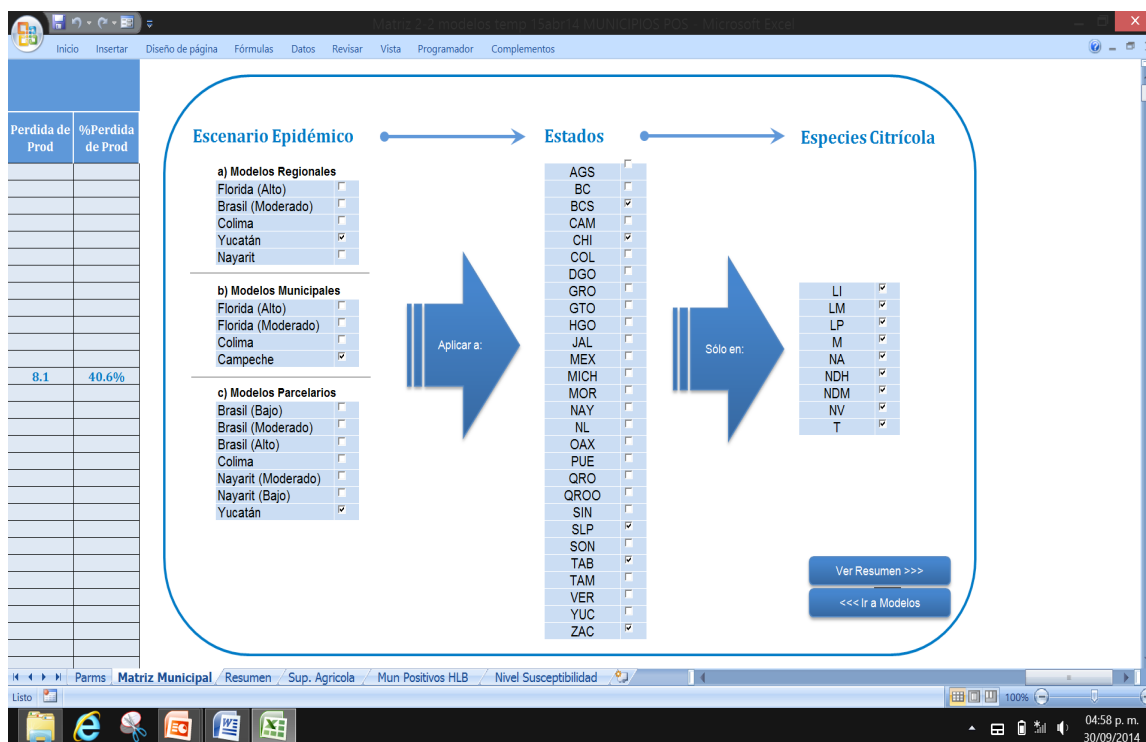


Figura 3. Aplicación desarrollada en MS-Excel para generar, calcular y visualizar las estimaciones de riesgo regional a partir de una selección multicriterio.

### Enfoque espacial (EE)

**Método ponderativo de variables de inductividad epidémica del HLB.** Este método utiliza valores ponderados e índices a partir de las variables de inductividad epidémica asociadas al sistema epidemiológico (hospedante-patógeno-vector-clima-manejo). Se requirió el desarrollo de una aplicación en MS-Excel denominada *Reg-N* (Figura 4), la cual integra variables del sistema epidemiológico, del *Hospedante*: superficie sembrada, índice cítrico, susceptibilidad de especies a CLas. *Del patógeno*: carga de inóculo, número de positivos vegetales e insectos, cercanía de foco. *Del vector*: índice de abundancia, generaciones potenciales, datos de monitoreo a nivel nacional. *Del clima*: inductividad climática.

La estimación del riesgo regional por subregión se realizó calculando el factor de ponderación de cada subregión entre la suma de todos los factores de ponderación de la región, como se describe en la siguiente ecuación:

$$Riesgo_{Regional} = (Sup_{citri}^{Fact\_pondi} / \sum Fact\_pondi) \quad [E.7]$$

**Dónde:**  $Riesgo_{Regional}$  = Nivel de riesgo por región;  $Sup_{Citri}$  = Superficie cítrica por región.

El factor de ponderación es calculado con la multiplicación de cada valor ponderado e índice de las variables de inductividad. El factor de ponderación se calcula con la siguiente ecuación:

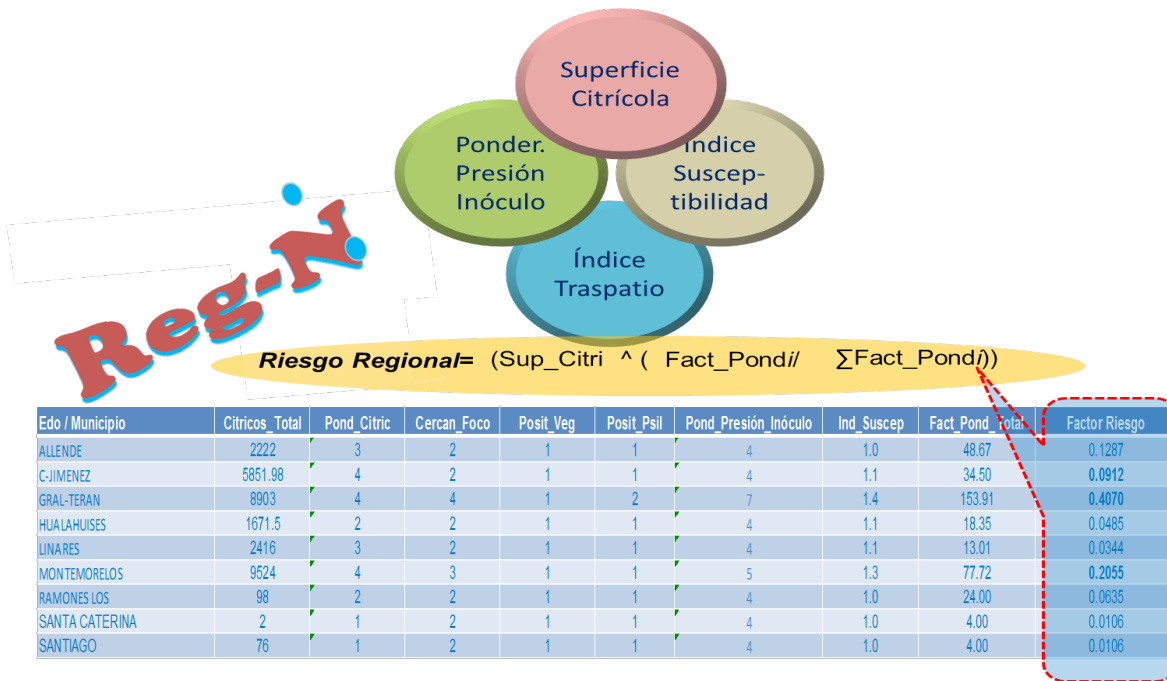


Figura 4. Aplicación Reg-N desarrollada en MS-Excel para la estimación del riesgo regional a partir de variables de inductividad epidémica.

$$Fact_{Pond} = (Sup_{Citri}) * (Ind_{Suscep}) * (Carga_{Inoculo}) * (Ind_{D.citri}) * (Ind_{Trasp})$$

[E.8]

**Dónde:** Fact\_Pond= Indicador de la inductividad epidémica y nivel de riesgo por región; Sup\_Citri= Superficie sembrada de especies cítricas distribuida en cuartiles, a mayor superficie mayor valor de ponderación; Ind<sub>D.citri</sub> = Índice de *D. citri* obtenido con el modelo de dinámica poblacional de *D. citri* generado por Torres-Pacheco *et al.*, 2013.

$$Indice_{Suscep} = [ \sum_{i=1}^n (SupCitri_i * PondSuscep_i) ] / SupCitri_{total}$$

[E.9]

**Dónde:** Indice<sub>Suscep</sub> = Susceptibilidad relativa de especies cítricas a *Candidatus Liberibacter* asia-

ticus; SupCitri<sub>i</sub> = Superficie sembrada de: limón mexicano=LM, limón persa=LP, limón italiano y toronjo=LI,T, mandarina=M y naranja dulce=ND; PondSuscep<sub>i</sub> = Valor ponderado de la susceptibilidad de especies cítricas a *Candidatus Liberibacter* asiaticus, LM=5, LP=4, LI, T=3, M=2 y ND=1 (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012); SupCitri<sub>total</sub> = Total de superficie cítrica sembrada por región.

$$Carga_{Inoculo} = (Region) + (Cercania_{foco}) (Positivos_{Veg}) + (Positivos_{Psil})$$

[E.10]

**Dónde:** Carga<sub>Inoculo</sub> = Indicador del nivel de incidencia en planta y vector; Region= Vertientes con superficie cítrica (Golfo=1, Pacífico=2); Cercania<sub>foco</sub> = Indicador del riesgo por cercanía de regiones con HLB. Región con presencia=4, Región



Contigua a una con presencia de HLB=3, Región Intermedia a una con presencia de HLB=2 y Región Distante a una con presencia de HLB=1;  $Positivos_{veg}$ : Incidencia de número de muestras vegetales positivas a HLB por región;  $Positivos_{psil}$ : Incidencia de número de muestras de vector positivas a HLB por región.

$$IndTrasp = [(Ind_{AsentHum}) + (Ind_{SupCitri}) + (Ind_{Agri})]/3 \quad [E.11]$$

**Dónde:**  $Ind_{AsentHum}$  = Índice generado a partir de la superficie (ha) del territorio municipal entre la superficie (ha) de asentamientos humanos, ambos reportados por INEGI;  $Ind_{SupCitri}$  = Índice generado con la superficie citrícola (ha) del municipio entre la superficie (ha) territorial del municipio;  $Ind_{Agri}$  = Índice generado con la superficie agrícola (ha) del municipio entre la superficie (ha) territorial del municipio.

**Potencial de dispersión del HLB.** El modelo propuesto establece que el tamaño de las ARCOs (número de hectáreas) estará en función del potencial de dispersión del HLB y el factor de riesgo regional con base en las variables de inductividad epidémica. La base cuantitativa implicó el análisis de datos de epidemias de HLB en Brasil (San Pablo) (Bassani et al., 2005), EUA (Florida) (Irey, 2009) y México (Colima y Yucatán) (Robles-González et al., 2013; Flores-Sánchez et al., 2011). Los escenarios epidémicos (Cuadro 2) determinan la intensidad de la dispersión de la enfermedad en función de los vientos dominantes: gradiente mayor ( $GradMayor$ ) a favor del viento y gradiente menor ( $GradMenor$ ) en contra del viento, los cuales fueron implementados originalmente en estudios regionales para dispersión del Amarillamiento letal del Cocotero (Góngora-Canul et al., 2004b). Posteriormente, el estudio de gradientes se implementó en la determinación de áreas de manejo regional para el primer foco epidémico en México (Flores-Sánchez et al., 2017) empleando un algoritmo espacio-temporal que implica (Figura 5 y Cuadro 2):

$$ARCO = \left( \left( 3.15 * (tasa_{disp} * Area_{Riesgo} * Riesgo_{Regional})^2 \right) * t \right) * 100 \quad [E.12]$$

**Dónde:**  $Area_{Riesgo}$  = Superficie de riesgo (hectáreas) por región;  $3.15$  = Valor constante para cálculo de área;  $tasa_{dis}$  = Distancia de dispersión del HLB por mes a partir de un foco inicial en una región de reciente ingreso con dispersión activa;  $Riesgo_{Regional}$  = Producto de las variables de ponderación seleccionadas;  $t$  = Tiempo para determinar el tamaño de un área de riesgo.

**Cuadro 2. Tasas de dispersión mensual del HLB por gradiente, en cuatro escenarios epidémicos.**

País	Región	Tasa de Dispersión/mensual		Escenarios Epidémicos
		GradMayor (km)	GradMenor (km)	
EUA	Florida	34	17	Alto
Brasil	San Pablo	12.5	8.9	Moderado
México	Colima	12.6	2	Moderado
México	Yucatán	6	2.6	Bajo

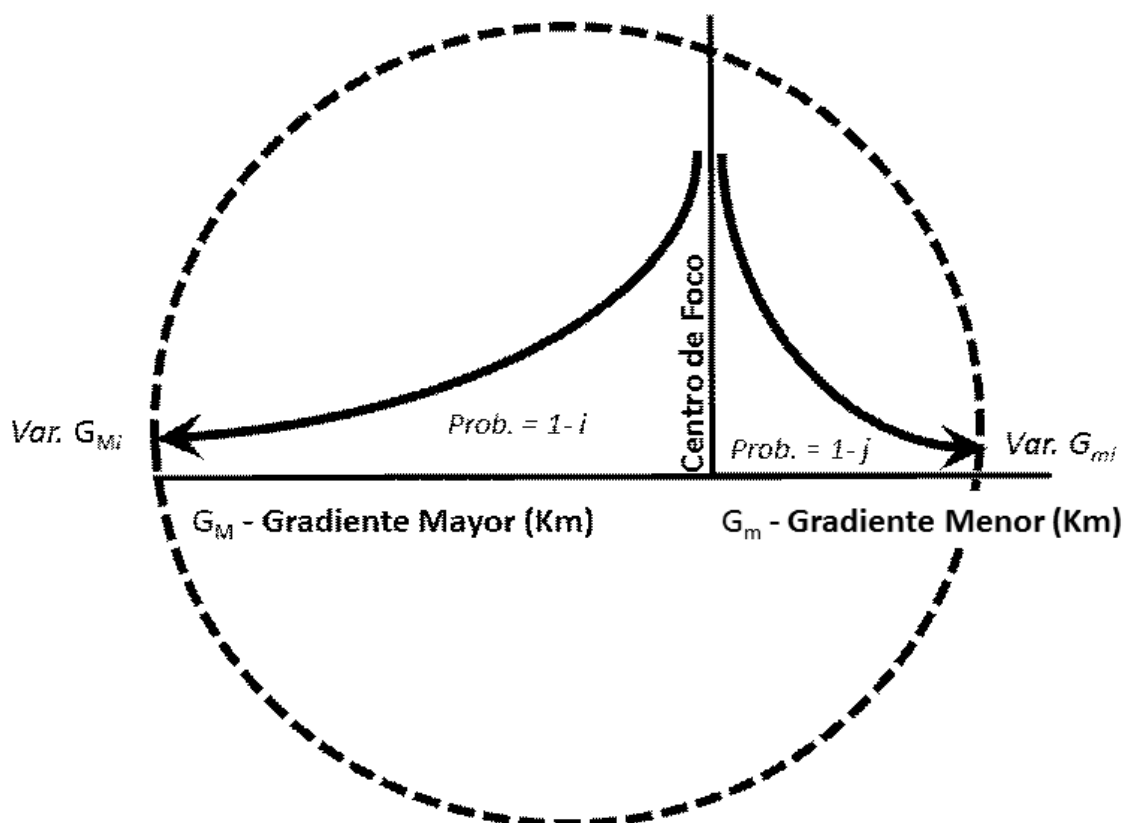


Figura 5. Modelo epidemiológico para determinación de un ARCO basado en el concepto de gradiente asimétrico de dispersión de CLas por *D. citri* (Flores-Sánchez *et al.*, 2017).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Enfoque temporal (ET).** El uso de modelos temporales asociados a regiones epidémicas del HLB en México permitió estimar el número de hectáreas (ha) potenciales a ser establecidas en Áreas Regionales de Control de *D. citri* (ARCOs) para el manejo del HLB en el país. La estimación de riesgo para hectáreas (ha) con HLB se realizó para el año 2015, la región de mayor riesgo fue el *GOLFO* y resto del país con 245,916 ha, la región de riesgo moderado fue *PCO* con 68,717 ha y la región con menor riesgo fue *PEN* con 23,195 ha, lo que corresponde al

73, 20 y 7% de la superficie citrícola establecida, respectivamente. Este resultado es congruente con el *status* del HLB en México. La región con mayor riesgo es el Golfo y resto del país, la cual presenta la menor prevalencia del HLB en México (Figura 6). Notoriamente, *PEN* fue la región donde se detectaron los focos iniciales del HLB en México, y es la región con menor riesgo determinada con esta metodología, lo cual puede ser por la prevalencia del HLB en traspatios y las acciones de erradicación y control de DC realizadas con mayor énfasis por los Comités Estatales de Sanidad Vegetal (CESV) de esta región.

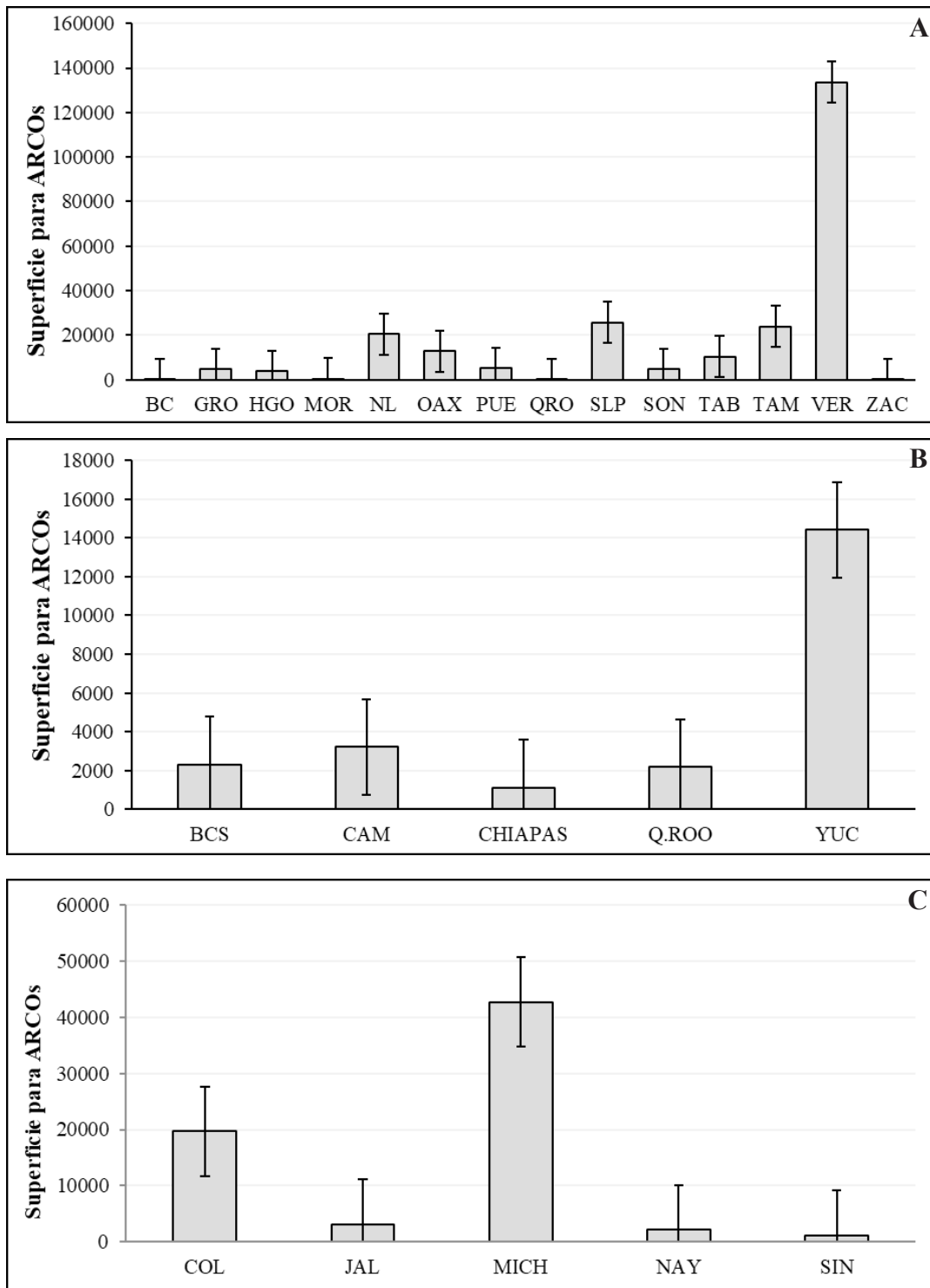


Figura 6. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB estimadas mediante el ET para: A) Centro-Golfo incluidos BC y Sonora, B) Península, incluidos BCS y Chiapas y C) Pacífico.

El análisis por región permitió determinar que en la región *GOLFO* los estados con mayor número de hectáreas (ha) a establecerse en ARCOs para Veracruz con 133,583 ha (54%), SLP, con 25,643 ha (10.4%), Tamaulipas, con 23,916 ha (9.7%), NL, con 20,434 ha (8.3%), Oaxaca, con 12,863 ha (5.2%); y Tabasco, con 10,277 ha (4%) (Figura 6A). Por lo que las acciones de monitoreo y control de *D. citri* deberían enfatizarse en estos estados dentro de la región. En la región *PEN* el estado con mayor riesgo fue Yucatán con 14,412 ha (62%), Campeche, con 3,210 ha (14%), BCS, con 2,294 ha (10%), Q. Roo, con 2,169 ha (9%); y Chiapas, con 1,108 ha (5%) (Figura 6B). En la región *PCO* los estados con mayor riesgo fueron Michoacán con 42,700 ha (62%), Colima, con 19,661 ha (29%), Jalisco, con 3,100 ha (5%), Nayarit, con 2,153 ha (3%); y Sinaloa, con 1,102 ha (1%) (Figura 6C).

**Enfoque espacial (EE).** La estimación de riesgo con esta metodología se realizó con la combinación de un factor de riesgo regional el cual se estimó mediante un método ponderativo de las variables de inductividad epidémica y con el potencial de dispersión del HLB. La región de mayor riesgo fue el *GOLFO* y resto del país con 142,754 ha potenciales a enfermarse con HLB, la región de riesgo moderado fue *PCO* con 75,696 ha y la región con menor riesgo fue *PEN* con 25,469 ha, lo que corresponde al 59, 31 y 10%, respectivamente (Figura 7). Esta metodología, se generó con elementos parciales de la propuesta de Áreas Regionales de Control del Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs) desarrollada para la definición del número, tamaño y localización de las mismas. Sin embargo, la propuesta planteada en este documento utiliza el área total de riesgo definida por el modelo y no es afectada por el componente logístico por capacidad operativa.

El análisis por región permitió detectar diferencias en la estimación de las hectáreas potenciales a

establecer en ARCOs. Para la región *GOLFO* los estados de mayor riesgo fueron Tabasco con 53,509 ha (38%), NL, con 21,188 ha (15%), Tamaulipas, con 18,059 ha (13%), Puebla, con 17,736 ha (12%), Oaxaca, con 8,339 ha (6%), Sonora, con 7,331 ha (5%); y Veracruz, con 4,227 ha (3%) (Figura 7A). Aparentemente, Veracruz tiene un menor peso debido al potencial de dispersión del HLB y debido a la cobertura de monitoreo en los estados alejados como Puebla, Tabasco y Tamaulipas. En la región *PEN* también se observan cambios en la estimación con éste método ponderativo, el estado con mayor riesgo fue Yucatán con 13,630 ha (53.5%), Campeche, con 4,315 ha (17%), Chiapas, con 3,552 ha (14%) BCS, 2,675 ha (11%); y Q. Roo con 1,297 ha (5 %) (Figura 7B). En la región *PCO* los estados con mayor riesgo fueron Michoacán con 45, 171 ha (60%), Colima, con 20,834 ha (28%), Jalisco, con 4,649 ha (6%), Sinaloa, con 3,869 ha (5.2%); y Nayarit con 1,171 ha (2%) (Figura 7C).

**Análisis integrativo del ET y EE.** Las estimaciones de hectáreas con potencial para establecerse en ARCOs para el manejo del HLB generadas con ambos enfoques epidemiológicos son coincidentes y definen la región *GOLFO* como la de mayor riesgo y en la cual se debería priorizar estratégicamente bajo un escenario de recursos humanos y económicos limitados. Sin embargo, el resto de las regiones deben ser atendidas con una mínima superficie. Los resultados indican que el enfoque temporal (*ET*) podría ser empleado como un escenario de mayor intensidad epidémica, mientras que el enfoque espacial (*EE*) representa un escenario moderado para un planteamiento a gran escala (p.e., nacional) de manejo del HLB, ya que con *ET* se estimaron 337,828 ha y con *EE* 243,919 ha, lo que representa el 67.5% y 48.7% de la superficie cítrica del país, respectivamente (Figura 8A y 8C). En la región *GOLFO* Veracruz, SLP, y Tabasco, el *ET* tiende a sobrestimar la estimación de las AR-

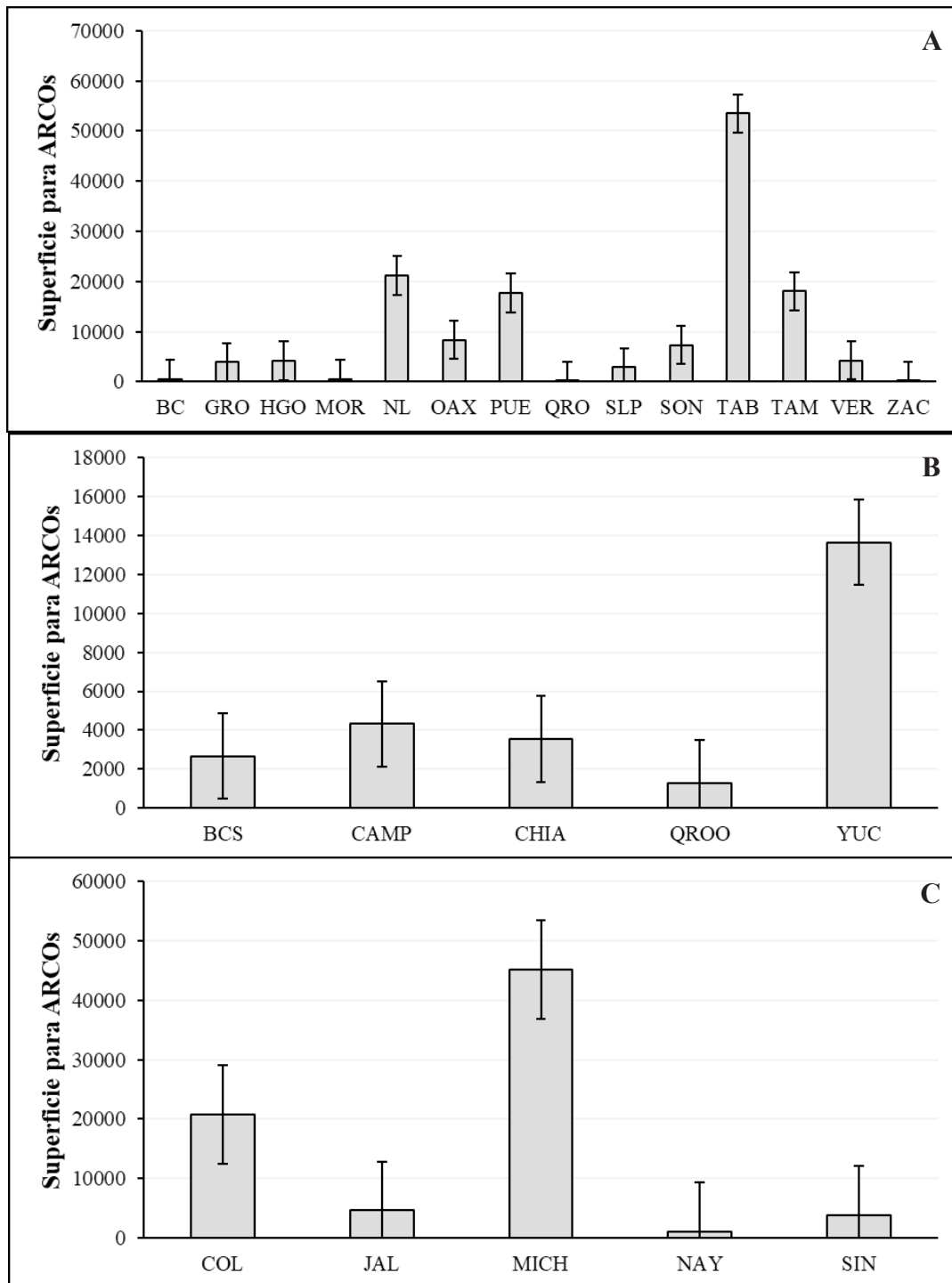


Figura 7. Hectáreas (ha) cítricas a establecerse en ARCOs para el manejo del HLB estimadas mediante el EE para: A) Centro-Golfo incluidos BC y Sonora, B) Península, incluidos BCS y Chiapas y C) Pacífico.

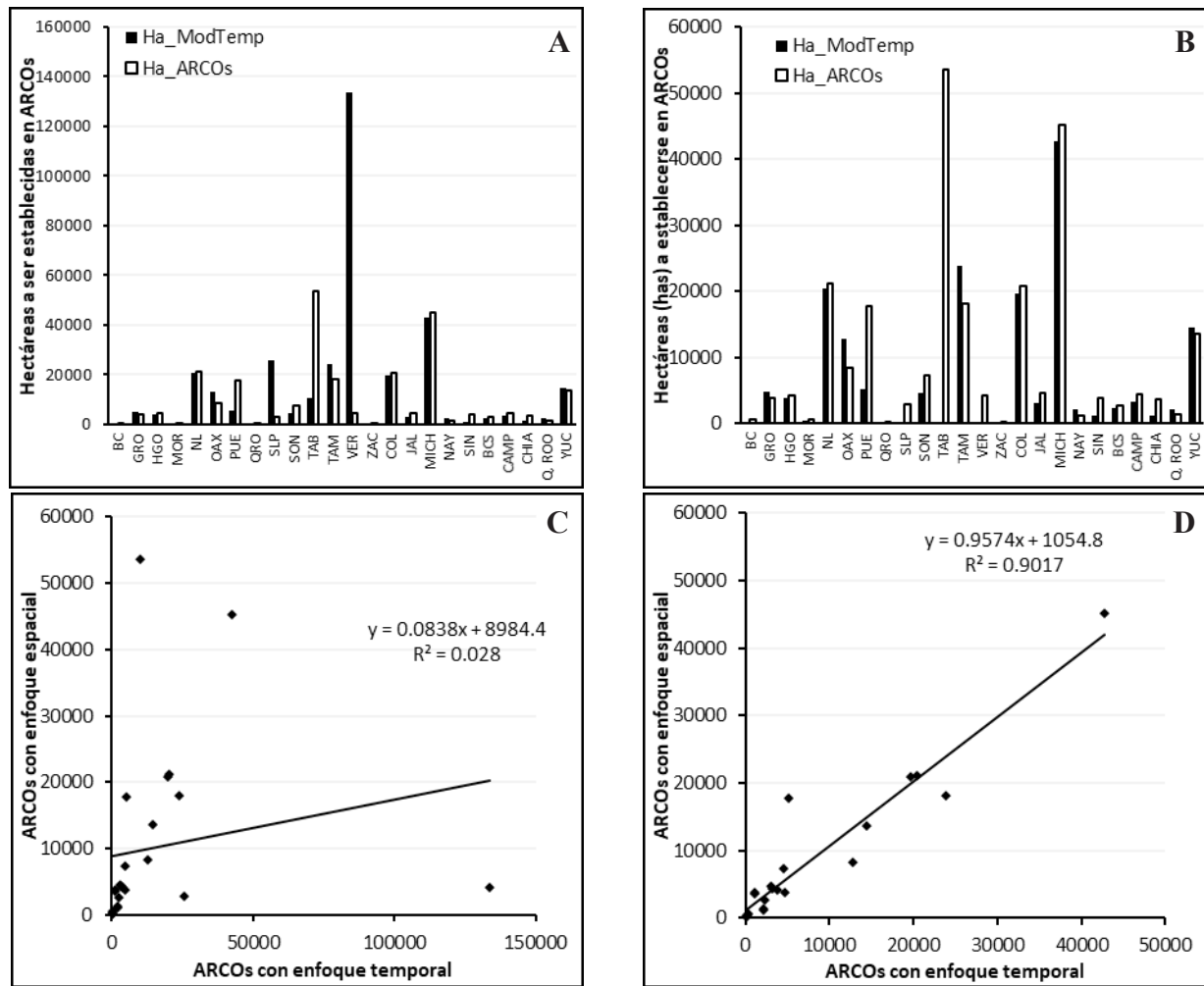


Figura 8. A) Comparativo entre *ET* y *EE* de las hectáreas estimadas para ARCOs considerando todos los estados citrícolas en los cálculos. B) Correlación de hectáreas estimadas por *ET* y *EE* considerando todos los estados citrícolas en los cálculos. C) Comparativo entre *ET* y *EE* de las hectáreas estimadas para ARCOs excluyendo Veracruz, SLP y Tabasco. D) Correlación de hectáreas estimadas por *ET* y *EE* excluyendo Veracruz, SLP y Tabasco.

COs ( $r^2=0.02$ ), en comparación con *EE* ( $r^2=0.90$ ) (Figura 8B y 8D), esto debido a que con *ET* se emplearon modelos temporales de epidemias de Yucatán a nivel regional y Campeche a nivel municipal (Cuadro 1), por similitud regional y falta de estudios específicos para estos estados por ausencia del HLB, mientras que el *EE* emplea el factor de riesgo regional como criterio inherente a cada región citrícola. Por lo que variables de inductividad

epidémica como la diversidad de especies (Naranja=213,000 ha, LP= 36,308 ha, MD= 10,474 ha y T=7,300 ha) en Veracruz, SLP, y Tabasco podría tener un efecto al maximizar la estimación con el modelo multidimensional generado con *ET*. Esta hipótesis se validó con otros estados de la región GOLFO como NL y Tamaulipas, los cuales tienen menor diversidad de especies, con prevalencia de Naranja y Toronjo, donde la estimación de

hectáreas en riesgo fue similar con ambos métodos (Figura 8). Adicionalmente, el análisis de regresión lineal entre la hectáreas estimadas con ambos métodos, sin incluir a Veracruz, SLP y Tabasco, el coeficiente de correlación mejora considerablemente ( $r^2=0.9$ ) (Figura 8D), lo cual sugiere que la estimación con ambas metodologías es confiables y que el *ET* podría emplearse bajo la premisa de un escenario agresivo en comparación con *EE*. Ambas propuestas robustecen y coadyuvan a la estrategia ARCOs, al optimizar los recursos económicos y humanos administrados por el SENASICA-DGSV, para el manejo regional del HLB en México.

Coincidentemente, la ubicación de las ARCOs mediante mapas interpolados de las hectáreas estimadas con ambos métodos sugiere que en la región *GOLFO* el *ET* maximiza el riesgo y asigna mayor superficie (ha) en los estados de Veracruz, SLP, y Tabasco, en comparación con *EE* (Figura 9A), el cual podría reducir el efecto por consideración de las variables de inductividad epidémica del HLB. En la región *PEN*, ambas metodologías explican adecuadamente el riesgo del HLB, ya que discriminan cuatro áreas que requieren ser incorporadas en las ARCOs, las cuales corresponden a las zonas de producción de cítricos de los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo (Figura 9B).

En la región *PCO*, los mapas también sugieren que ambos métodos serían adecuados, ya que la definición de las ARCOs coinciden con las zonas de mayor intensidad epidémica del HLB en los estados de Colima, Michoacán, Jalisco, Nayarit, Sinaloa (Figura 9C), Sonora, BC y BCS (Figura 9D). Sin embargo, la estimación con el *ET* sugiere un escenario más agresivo, el cual en el caso de esta región requiere considerarse debido al estatus endémico del HLB (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; SENASICA, 2015); probablemente, lo adecuado sería enfatizar los recursos en la región del *GOLFO* puesto que el escenario epidémico de esta en-

fermedad es de riesgo por procesos de dispersión activa, asociada a los casos de muestras positivas recientemente detectados en planta y vector (SENASICA, 2015). El uso de los enfoques espacial y temporal para estimar el riesgo de dispersión y establecimiento de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) tuvo como fin proporcionar estimaciones regionales de riesgos bajo la premisa de que la dispersión y el incremento de la incidencia del HLB es gradual, no lineal, y con una tasa dependiente de factores climáticos, varietales, manejo productivo y biológicos (asociados al vector *Diaphorina citri* y CLAs) (Mora-Aguilera *et al.*, 2013; 2014; Bassanezi *et al.*, 2013; Salcedo *et al.*, 2010), a partir de los cuales se estimarán las ARCOs con *ET* y *EE*. En esta concepción también se incorporó el efecto de cronicidad inherente a una infección sistémica como la inducida por CLAs. Los enfoques empleados en este estudio tienen dos implicaciones en esta concepción:

- Aplicación de un modelo(s) temporal que estima la gradualidad infecciosa en un horizonte de tiempo (*ET*).
- Desarrollo de un modelo(s) espacial que estima la gradualidad infecciosa en un área (*EE*).

Aunque existen otros estudios que analizaron el efecto del control local versus el control regional, como bases para plantear que la estrategia más adecuada y sustentable para el manejo del HLB es el control regional (Bassanezi *et al.*, 2013), y que las áreas CHMAs deberían definirse con base en criterios de riesgo para priorizar su tamaño, localización y número (Gottwald *et al.*, 2014), dichos estudios omitieron el efecto temporal de dispersión, direccionalidad y velocidad de la misma, lo cual en la presente propuesta se integró al enfoque espacial como un componente esencial para definir el tamaño de las ARCOs. Con lo anterior, se espera

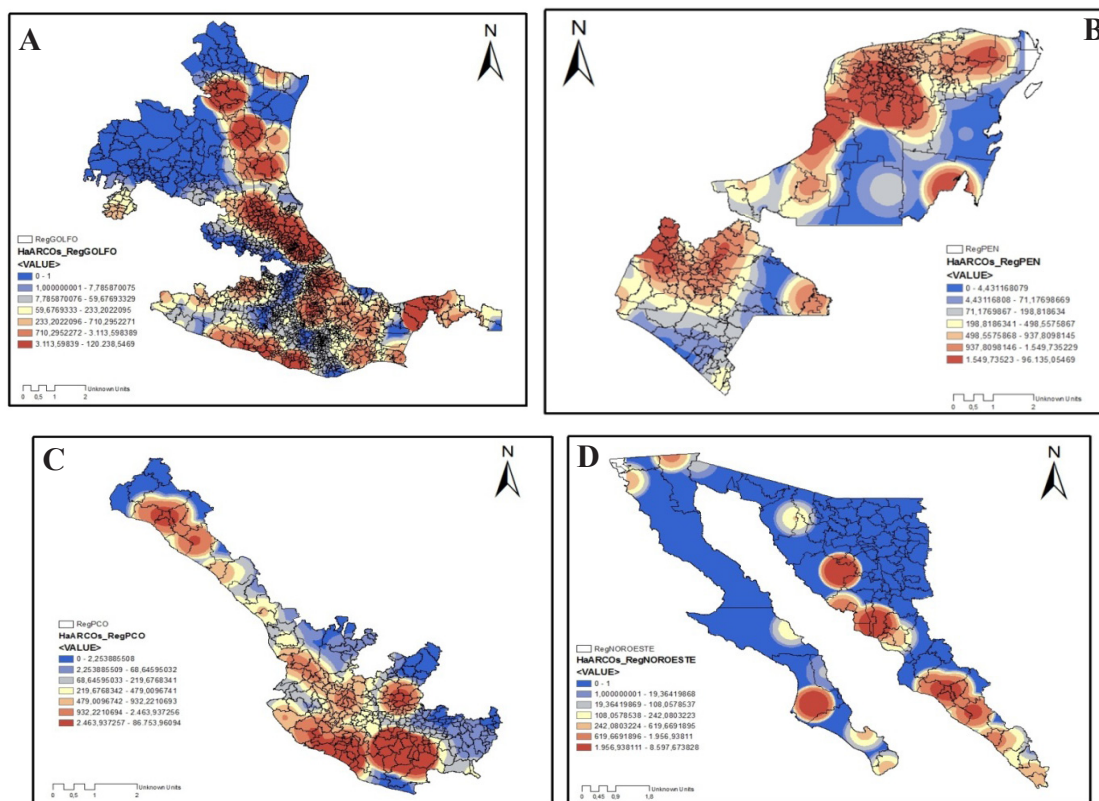


Figura 9. Mapas de riesgo de hectáreas (ha) potenciales a ser infectadas por HLB estimadas mediante las metodologías método ponderativo en las regiones A) Golfo, B) Península, C) Pacífico y D) Noroeste.

que bajo las condiciones de pequeños productores y un escenario de recursos humanos y financieros que caracteriza a México, esta propuesta tenga gran aplicación en la reducción de la dispersión y carga de inóculo de CLas.

**Aplicación @RCOs v1.0 para estimación de hectáreas en riesgo.** Se generó una aplicación en MS-Excel con cinco hojas de cálculo y una presentación del programa (Figura 10A). El sistema @RCO's HLB v1.0 determina el número, localización y tamaño de áreas regionales de control del HLB (ARCOs) con base en el enfoque espacial (Figura 10B). Al especificar las condiciones epidémicas de tiempo se ejecutan algoritmos (E.8 – E.12)

para generar proyecciones espacio-temporales a partir de las simulaciones estocásticas empleando un MonteCarlo con  $i=5000$  iteraciones que permiten cuantificar su estabilidad (E.12 y Figura 10C). El modelo usa parámetros epidémicos asociados a *GradMayor* y *GradMenor* (Figura 5 y Cuadro 2) para representar el radio de un área de manejo bajo un escenario y tiempo determinado ( $t = 1 \dots n$ ) (Figura 9D). Las proyecciones permiten establecer  $n$ -escenarios por mes/año con la finalidad de comparaciones.

Adicionalmente, la configuración de ubicación espacial del ARCO permite la selección en función del centroide de la zona citrícola principal a nivel de



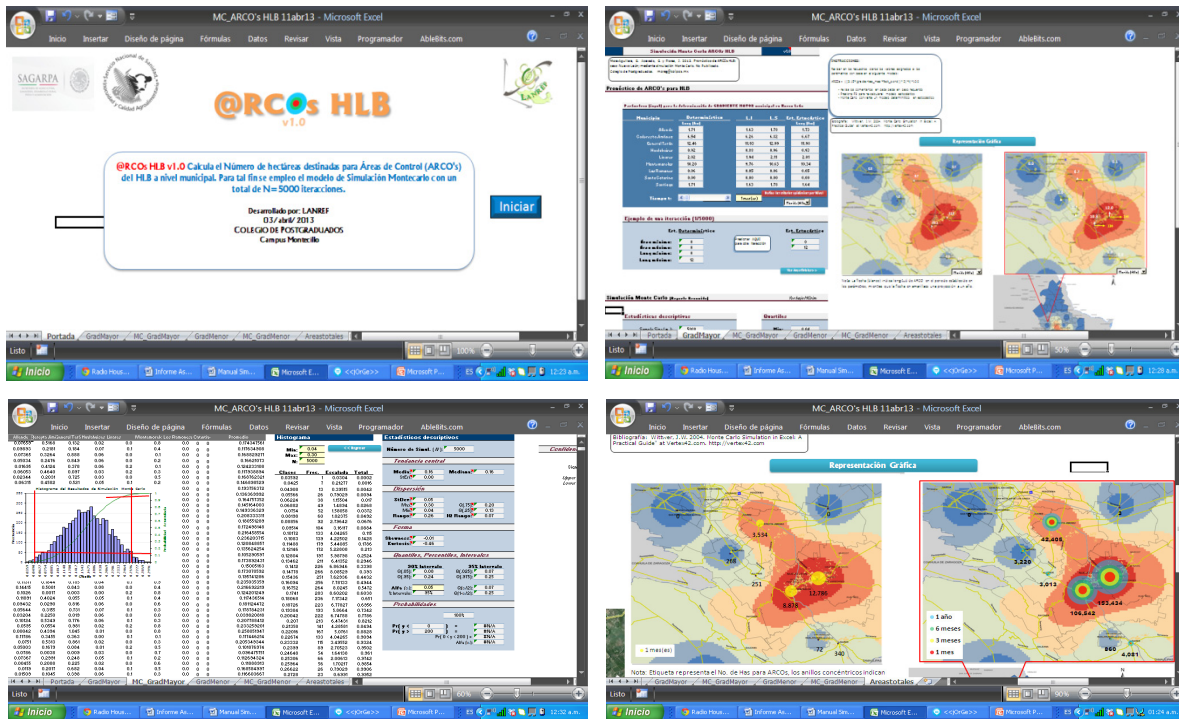


Figura 10. A) Aplicación @RCOs v1.0 desarrollada en MS-Excel para la estimación de hectáreas en riesgo, a partir del riesgo regional y tasa de dispersión del HLB. B) Hoja de visualización de cálculo de hectáreas de manejo a nivel cuantitativo y representación espacial. C). Modelo de simulación MonteCarlo con  $i=5000$  iteraciones. D) Representación espacial y simulación de hectáreas de manejo a cuatro escenarios de tiempo ( $t$ ).

municipio ( ), centroide de foco positivo que puede ser planta y/o vector (E.10). Otras determinaciones espaciales como ubicación de empacadoras no son opciones directamente seleccionables pero se incluyen mediante algoritmos epidemiológicos como el índice de traspaso (E.11), el cual incluye zonas urbanas como factor de riesgo.

## CONCLUSIONES

La aplicación de criterios biológicos y epidemiológicos con enfoque regional permite proporcionar estrategias racionales para la determinación de riesgo, el cual se emplea para el establecimiento de *Áreas Regionales de Control de Diaphorina*

*citri* (ARCOs), con base en los principios de prevención (riesgo) como estrategia esencial para el manejo del HLB en México. La integración de enfoques temporal y espacial permitieron optimizar la estimación del número, hectáreas de cobertura, localización y riesgo intervenido de ARCOs por entidad federativa. Durante la etapa de dispersión de CLAs, la propuesta de ARCOs permitió priorizar la superficie cítrica programada para aplicar medidas de manejo del HLB, y para optimizar recursos humanos y financieros en áreas estratégicas con el fin de reducir la dispersión y carga de inóculo de CLAs bajo las condiciones de México.

## AGRADECIMIENTOS

Al SENASICA-DGSV por el financiamiento y apoyo con

información oficial. A los Comités Estatales de Sanidad Vegetal por la disposición a incorporar la estrategia ARCOs. Al equipo CP-LANREF por el soporte logístico y operativo.

## LITERATURA CITADA

- Arredondo-Bernal H. 2013. Control Biológico: Componente de las Áreas Regionales de Control del PAC. *In: Memorias de la Reunión Nacional de Sanidad Vegetal*. México, D.F. 16-19 Abril. SENASICA México.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Gimenes-Fernandes N, Yamamoto PT, Gottwald TR, Amorim L, Bergamin Filho A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0314-RE>
- Bassanezi RB. 2012. Epidemiology of Huanglongbing in Citrus. IV Simposio Nacional y III Internacional sobre Bacterias Fitopatógenas. Guadalajara. Jalisco. México.
- Bassanezi RB, Busato LA, Bergamin-Filho A, Amorim L and Gottwald TR. 2005. Preliminary spatial pattern analysis of Huanglongbing in São Paulo, Brazil. *In: Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA, USA: IOCV, 341-55. <https://doi.org/10.5070/C576s629f9>
- Belasque JJ, Filho BA, Bassanezi BR, Barbosa JC, Fernandes GN, Yamamoto TP, Lopes AS, Machado MA, Pereira-Leite JR, Ayres JA and Massari CA. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology*. 34(3): 137-145. doi: 10.1590/S1982-56762009000300001
- Bové JM. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo, State, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 94 (3): 465-467. <https://www.jstor.org/stable/45156274>
- Cabrera-Hidalgo A, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Rebollar-Alviter A y Marbán-Mendoza N. 2014. Ocurrencia de *Nacobus aberrans* en Cultivos Hortícolas del Noroeste de Michoacán México. *Nematropica* 44: 107-117. <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/83326>
- Domínguez-Monge S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Texcoco Edo. de México. 63 pp. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/527?locale-attribute=es>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionalmente por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952012000800003&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952012000800003&script=sci_abstract)
- Esquivel-Chávez F. 2011. Análisis Histológico y Epidemiológico de limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Texcoco Edo. de México. 56 pp. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/532>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Gutiérrez-Espinosa MA, Velázquez-Monreal JJ, Domínguez-Monge S, Bassanezi RB, Acevedo-Sánchez G, Robles-García P. 2017. Diffusion Model for Describing the Regional Spread of Huanglongbing from First-Reported Outbreaks and Basing an Area Wide Disease Management Strategy. *Plant Disease* 101(7):1119-1127. doi: 10.1094/PDIS-04-16-0418-RE.
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G, Rivas-Valencia P, Ruiz-García N, López-Arroyo JI, Hernández-Chan E, Novelo-Cocon A, López-Sánchez P y Sánchez-Rebolledo F. 2011. Gradientes de Dispersión del HLB a partir de Focos Iniciales de Infección en la Península de Yucatán. (Presentación en poster) *In: Memoria del 2do. Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México*. 5 y 6 de Diciembre. Colegio de Postgraduados. Montecillo Texcoco Edo. de México. pp: 83-87.
- Góngora-Canul CC. 2004a. Regionalización riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del Citrus Tristeza Closterovirus en Tamaulipas México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. 90 pp.
- Góngora-Canul CC, Pérez-Hernández O, Pech-Cauich O, Escamilla-Bencomo JA and Mora-Aguilera G. 2004b. Gradientes de diseminación del amarillamiento letal en cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Sisal Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22:370-376. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61222309>
- Gottwald T, Luo W, Riley T and Parnell S. 2014. Commercial risk-based survey for HLB and implications for efficacy of Citrus Health Management Areas (CHMAs). *Journal of Citrus Pathology* 1: 110-111. <https://doi.org/10.5070/C411024819>
- IRAC (Insecticide Resistance Action Committee). 2012. IRAC MoA Classification Scheme. IRAC International MoA Working Group. IRAC executive. Version 7.2 23 p. <https://irac-online.org/content/uploads/MoA-classification.pdf>
- Irey M. 2009. Current Status of Management in Florida. Taller Internacional de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. Villahermosa Tabasco. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61243856003.pdf>
- Jesús Junior WC, Pozza EA, Vale FXR and Mora-Aguilera G. 2005. Análise Temporal de Epidemias. 127- 191p. *In: Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas*. Vale F.X.R, Jesús Junior W.C, Zambolim L. (eds). Perfil Editora (Brasil). <https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/mod/resource/view.php?id=15798>
- López-Arroyo JI y Rocha-Peña M (Eds.). 2012. 3º Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Memorias. 10-12 diciembre Veracruz Ver.

- Loeza-Kuk E, Jasso-Argumedo J, Lozano-Contreras M, Hernandez-Chan E. 2010. Dispersión *Candidatus Liberibacter* spp. en huertas cítricas de Yucatán México. In: 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 8 y 9 de diciembre. Monterrey N. L. pp:125-134.
- Márquez PF, Márquez GJ, Rodríguez MML, Esquivel CF, Mora AG y Acevedo SG. 2011. Análisis espacial y temporal del Huanglongbing (HLB) de los cítricos en el municipio de Xalisco Nayarit. In: 2do. Taller Internacional de Plagas Cuarentenarias de los Cítricos. 1519 de agosto. Manzanillo Col.
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Sánchez JL, González-Gómez R and Robles-García P. 2013. Applied Epidemiology to Plant Disease Risk Analyses. Pp. 27-29 In: IV Brazilian Workshop of Plant Disease Epidemiology. December 2<sup>nd</sup>-4<sup>th</sup>. Curitiba-Parana Brazil.
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JI, Velázquez-Monreal JJ, Flores-Sánchez JL, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S y González-Gómez R. 2014. Situación Actual y Perspectivas de Manejo del HLB de los Cítricos. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 108-119. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092014000200108](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200108)
- Mora-Aguilera G and Campbell CL. 1997. Multivariate techniques for selection of epidemiological variables. Pp 51-58 In: Exercises in Plant Disease Epidemiology. (Francel L. J. and Neher D. A. eds) APS Press. St. Paul Minnesota USA. 233 p.
- OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). 2013. Norma Regional de Sanidad Vegetal (NRSV): Lineamientos de Armonización Normativa Regional de Certificación Fitosanitaria de Material Propagativo de Cítricos. <https://www.oirsa.org/contenido/documentos/sanidad-vegetal/sanidad-vegetal-normativas-fitosanitarias/oirsa-s1-p1-nrsv-02-2004-lineamientos-normas-regionales-en-sanidad-vegetal-del-oirsa.pdf>
- Pazolini K, Arruda JH, Chinelato GA, Bergamin Filho A, and Belasque J. 2021. Temporal progress of huanglongbing epidemics and the effect of noncommercial inoculum sources on citrus orchards in São Paulo State, Brazil. Plant Disease 105. doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1945-RE
- Pacheco CJ, Samaniego RJ y Fontes PA. 2012. Tecnología para el manejo integrado del psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en cítricos en Sonora. Folleto Técnico No. 88. INIFAP. <https://docplayer.es/3052107-Tecnologia-para-el-manejo-integrado-del-psilido-diaphorina-citri-kuwayama-hemiptera-psyllidae-en-citricos-en-sonora.html>
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Orozco-Sánchez M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI y Flores-Virgen R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1): 15-31. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2013000100002](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2013000100002)
- Robles GP. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>.
- Rogers ME, Stansly PA and Stelinski LL. 2010. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a Psyllid Management Plan. University of Florida IFAS Extension Gainesville FL. <http://www.crec.ifas.ufl.edu/chma/>
- Ruiz-Cancino E, Coronado-Blanco JM y Myartseva SN. 2008. Psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera:Psyllidae). In: Casos de Control Biológico en México Arredondo HC y Rodríguez del Bosque LA. (Eds.)Ed. Mundi-Prensa. 323-331 pp.
- Salcedo BD, Hinojosa R, Mora-Aguilera G, Covarrubias I, De Paolis JRF, Mora S, Cíntora C. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Cítrica Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p. <http://repositorio.iica.int/handle/11324/7271>
- SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe octubre 2015. Revisado en web el 27 de octubre 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
- Torres-Pacheco I, López-Arroyo JI, Aguirre-Gómez JA, Guevera-González RG, Yanez-López R, Hernández-Zul MI y Quijano-Carranza JA. 2013. Potential Distribution in Mexico of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of Huanglongbing pathogen. Florida Entomologist 96: 36-47. <https://journals.flvc.org/flaent/article/view/82151>

# Identification of Mexican lime hybrids (*Citrus aurantifolia*) with greater tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*

## Identificación de híbridos de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con mayor tolerancia a *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Marciano Manuel Robles-González\*, Silvia Heréndira Carrillo-Medrano, Miguel Ángel Manzanilla-Ramírez, José Joaquín Velázquez-Monreal, Mario Orozco-Santos, INIFAP Campo Experimental Tecomán. Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo. Tecomán, Colima, México. C.P. 28930. Victor Manuel Medina-Urrutia† Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco C.P.45200.

\*Autor para correspondencia mmrobles55@hotmail.com

Received: August 28, 2022.

Accepted: October 26, 2022.

Robles-González MM, Carrillo-Medrano SH, Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ, Orozco-Santos M and Medina-Urrutia VM. 2022. Identification of Mexican lime hybrids (*Citrus aurantifolia*) with greater tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 183-196.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-7>

**Resumen.** Con el fin de identificar genotipos con mayor tolerancia a CLAs, una población de 621 híbridos, desarrollados mediante el cruzamiento de cuatro genotipos de limón mexicano con tres variedades de limón italiano, cuatro citranges, un citrumelo, dos híbridos somáticos que portan genoma de citrange, un híbrido somático con genoma de pomelo y un limequat, se establecieron en campo, en un sitio con altas poblaciones del vector *D. citri* y alta carga del patógeno. A dos años y medio, cuando el 100 % de los híbridos fueron totalmente sintomáticos e iniciaron la fase de fructificación, se caracterizaron mediante un índice de expresión de

síntomas, desarrollado con base el color del follaje y tonalidad del moteado. De las cruces de limón mexicano x citranges y de limón mexicano x limones italianos, se detectaron 60 genotipos híbridos con bajo índices de expresión de síntomas. El menor índice de expresión de síntomas se asoció a bajas concentraciones de CLAs en hojas. Las concentraciones de CLAs fueron más bajas en los híbridos que contenían genoma de citranges. Por su nivel de tolerancia a CLAs y características físicas de fruta, 16 híbridos fueron seleccionados y enviados a la fase de evaluación semicomercial.

**Palabras clave:** Mejoramiento genético, Híbrido, Huanglongbing, enfermedad, síntomas.

En los últimos años el cultivo del limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] ha estado amenazado por la presencia de enfermedades que ponen en riesgo su permanencia como actividad agrícola de alta importancia económica. El

Huanglongbing (HLB), asociada a la infección por la  $\alpha$ -proteobacteria ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ (CLas) es el reto más grande que ha enfrentado este cultivo en México. Se ha determinado que el HLB provoca la pérdida generalizada de vigor en los árboles, lo que se traduce en reducción de su capacidad de producción de fruta (Robles-González *et al.*, 2018). Cuando los síntomas de HLB se manifiestan en el 100% del dosel de los árboles, la producción de fruta se reduce hasta en 50%, comparado con árboles sin síntomas (Robles-González *et al.*, 2013).

Se ha señalado al HLB como la enfermedad más destructiva de los cítricos (Wang *et al.*, 2016) ya que ha impactado fuertemente tanto las superficies cultivadas, como los rendimientos y los costos de producción, en distintas regiones productoras de cítricos en el mundo (Hodges y Spreen, 2012; Djeddour *et al.*, 2021; Da Costa *et al.*, 2021). A pesar de los extensos esfuerzos de investigación, hasta hoy, esta enfermedad es muy difícil de controlar debido a la complejidad de las interacciones planta-vector-bacteria (Alquézar *et al.*, 2021).

De acuerdo con Stover *et al.* (2015a) y McCollum *et al.* (2016), el desarrollo de variedades de cítricos resistentes o tolerantes a CLas es la mejor solución a largo plazo para esta enfermedad. Además de ser la más eficiente, económica y ambientalmente segura (Pappu *et al.*, 1995). Una de las estrategias de mejoramiento genético es la producción de híbridos mediante la metodología convencional, usando genotipos tolerantes o resistentes. Desafortunadamente, la mayoría de las variedades comercialmente importantes, así como muchos parientes cercanos de los cítricos, son susceptibles a la enfermedad (Albrecht y Bowman, 2011). Por lo que, hasta hoy no hay disponible ninguna variedad de cítricos resistente a HLB (McCollum *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2021; Alves *et al.*, 2021).

Aunque, como lo señala McCollum *et al.* (2016) no existe una verdadera resistencia a CLas, hay informes de la existencia de genotipos que han mostrado diferentes niveles de tolerancia. Según Wang *et al.* (2016) y Wu *et al.* (2021) algunas especies y/o variedades de cítricos han mostrado distinto grado de tolerancia y más alto nivel de expresión de genes relacionados con mecanismos de defensa.

Al respecto, Folimonova *et al.* (2009) al evaluar la respuesta de 30 genotipos de cítricos a los aislamientos de CLas de Florida, bajo condiciones controladas en invernadero o cuarto de crecimiento, observaron que las plantas de *C. halimii*, la mandarina ‘Clementina Nules’ (*C. clementina*) y el tangelo ‘Minneola’ (*C. paradisi* x *C. reticulata*), resultaron ser los más sensibles y por lo general fueron las primeras en morir. La mandarina ‘Sun Chu Sha’ (*C. reticulata*), la naranja agria (*C. aurantium*), el limón ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana*), el limón ‘Macrofila’ (*C. macrophylla*), el citrume-lo ‘Swingle’ (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*), la cidra (*C. medica*), la lima dulce de Palestina (*C. limettioides*), el limón ‘mexicano’ (*C. aurantifolia*), el calamondín (*Citrofortunella microcarpa*) y *C. micrantha*, desarrollaron síntomas cloróticos distintivos, pero continuaron creciendo y se clasificaron como “moderadamente tolerantes. El limón ‘Eureka’ (*C. limon*), la lima ‘Persa’ (*C. latifolia*), el citrange ‘Carrizo’ (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) y *Severinia buxifolia*, fueron altamente tolerantes al patógeno. Las plantas de estos cítricos desarrollaron pocos o ningún síntoma visual bajo condiciones de invernadero y continuaron creciendo vigorosamente, de manera similar a los árboles no inoculados. Sin embargo, los autores señalan que para *P. trifoliata* los resultados fueron inconsistentes.

Por su parte Stover *et al.* (2010) al estudiar las diferencias en la aparente tolerancia/resistencia a CLas, expresada por concentraciones bajas de la

bacteria, en una plantación de *P. trifoliata* y sus híbridos injertados sobre mandarina ‘Sun Chu Sha’ y que estuvieron expuestos a la infección natural en campo, observaron que *P. trifoliata* tenían una cantidad de CLas no detectable o baja, al igual que dos citranges, y concluyeron que *P. trifoliata* y algunos de sus híbridos pueden “tolerar” a CLas, al suprimir significativamente su replicación en el floema, incluso cuando se injertan en un genotipo fuente de alta concentración de la bacteria.

Así mismo, Stover y McCallum (2011) al evaluar ocho cultivares de cítricos que crecían en plantaciones comerciales con presión de enfermedades típicas de Florida, determinaron que, la incidencia y severidad del HLB variaron considerablemente entre las huertas y detectaron diferencias específicas entre las variedades. El tangor ‘Temple’ (*C. reticulata*) mostró consistentemente la incidencia más baja de síntomas de HLB y del título de CLas. En cambio, el tangor ‘Murcott’ y tangelo ‘Minneola’ tuvieron mayor incidencia de síntomas y mayores concentraciones de la bacteria. Por lo que concluyeron que se puede encontrar una resistencia útil al HLB con síntomas reducidos y concentraciones bajas de CLas en cultivares convencionales. Albrecht y Bowman (2012) también informaron que los portainjertos citrange ‘Carrizo’, US-897 y US-942 resultaron tolerantes, US-802, US-812 y el limón ‘Volkameriano’ moderadamente tolerantes, y la mandarina Cleopatra susceptible a CLas.

No se han identificado genes específicos de tolerancia a CLas en *P. trifoliata*, pero estudios recientes han demostrado que los genes de resistencia a enfermedades constitutivas se expresaron en niveles mucho más altos en híbridos de *Poncirus* tolerantes a este patógeno en comparación con los genotipos susceptibles (Rawat *et al.*, 2017). Los informes de la mayor tolerancia expresada por *P. trifoliata* y algunos citranges, alienta a los grupos de investigación para generar híbridos complejos cruzando *Citrus* x *Poncirus* (McCollum *et al.*, 2016).

Por otra parte, la apomixis, también conocida como embrionía nucelar, embriogénesis adventicia o poliembriónía (Kishore, 2014) ha sido un fuerte obstáculo para la generación de variedades a través de la hibridación convencional (Wang *et al.*, 2017; Simsek *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2021). En las semillas de especies poliembriónicas, al mismo tiempo que se inicia el crecimiento del embrión sexual o cigótico, se desarrollan varios embriones de origen nucelar, (Kepiro y Roose, 2010; Mondal *et al.*, 2015) que compiten con el embrión de origen sexual, tanto por espacio dentro de la semilla como por nutrientes, y generalmente terminan eliminándolo en etapas muy tempranas de su desarrollo (Moore *et al.*, 1993). Por lo tanto, el rescate oportuno y germinación *in vitro* de embriones inmaduros se ha convertido en una estrategia muy útil para superar el problema de apomixis y avanzar en el mejoramiento genético de cítricos.

A partir de 2009 el Campo Experimental Tecmán del INIFAP, en el estado de Colima, México, inició el programa de mejoramiento genético de limón mexicano por el método de hibridación convencional, asistido por técnicas de rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros, con la finalidad de generar variedades con mayor tolerancia a patógenos causantes de enfermedades de importancia económica como son el HLB, virus tristeza de los cítricos y antracnosis (*Colletotrichum acutatum*).

Este estudio tuvo como objetivo identificar genotipos con mayor tolerancia a CLas, en una población de híbridos F1, desarrollados mediante el cruzamiento de cuatro genotipos de limón mexicano con tres variedades de limón italiano, cuatro citranges, un citrumelo, dos híbridos somáticos que portan genoma de citrange, un híbrido somático con genoma de pomelo y un limequat bajo condiciones de infección natural, en un sitio con altas poblaciones del vector *D. citri* y alta carga del patógeno

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en los terrenos del Campo Experimental Tecomán del INIFAP, ubicado en el Km 35 carretera Colima-Manzanillo, en Tecomán Colima, México, a los 18°53'7" latitud norte y 103°50'30" longitud oeste, a 30 msnm. Se usaron 621 árboles confirmados como híbridos, y que resultaron de 31 combinaciones genéticas generadas por el cruzamiento de los genotipos 'Colimex', Mex 13, Mex 20 y Mex 24 de limón mexicano con las variedades 'Limoneira 8A', 'Rosenberg' y 'Eureka' de limón italiano (*C. limon*), los Citranges 'Benton', 'C-32' y 'C-35' (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) y 'Yuma' (*P. trifoliata* x *C. sinensis*) el Citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) los híbridos somáticos HS 10 y HS 11 (*C. amblycarpa*) + (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), y HS 15 (*C. amblycarpa*) + (*C. maxima*) y el limequat, (*C. aurantifolia* × *Fortunella japonica*) como se presentan en el Cuadro 1. Los árboles injertados sobre limón 'Macrofila' (*C. macrophylla*) se llevaron a campo entre el 15 al 18 de julio del 2014. La plantación se hizo a doble hilera, dejando 2.5 m entre árboles, 2.0 m entre hileras y seis metros entre cada doble hilera, (1,600 árboles/ha). El sitio experimental se encuentra en una zona de alta incidencia del vector *D. citri* y altas concentraciones del patógeno, que resulta un ambiente adecuado para observar la respuesta de los híbridos a la infección natural de CLas (Albrecht y Bowman, 2011; Albrecht *et al.*, 2014). El suelo es del tipo migajón arcilloso con alto contenido de CaCO<sub>3</sub> y pH de 7.8. Se aplicaron riegos por aspersión tres veces por semana con una duración de 6 horas/día. La fertilización se hizo de acuerdo al paquete tecnológico de limón mexicano (Robles-González *et al.*, 2017). No se hizo control de *D. citri*, con el fin de mantener sus poblaciones altas y promover la infección natural del CLas en los árboles híbridos y de esa manera poder estudiar su respuesta a la enfermedad.

## Dinámica de aparición de árboles con síntomas de HLB

A partir del 8 diciembre de 2014, semana 19 desde la plantación (DP), hasta el 17 de agosto de 2015, semana 48 DP, y cuando el 100 % de los árboles en la progenie de los híbridos presentaron hojas con moteado difuso asimétrico, síntoma característico del HLB, se completaron seis inspecciones visuales de los árboles con el objetivo de registrar datos del número y porcentaje de árboles sintomáticos y con ello, determinar la dinámica de infección en las poblaciones de híbridos. Para el análisis, se calcularon las frecuencias de árboles con síntomas para cada inspección y para cada una de las combinaciones genéticas, resultado de las hibridaciones.

## Color del follaje y tono del moteado amarillento en hojas sintomáticas

En diciembre de 2016, cuando los híbridos completaron dos años y medio de exposición a la infección natural de CLas y el 100 % de los árboles presentaron síntomas evidentes de la enfermedad, desde una distancia de tres metros, se revisó su copa, para determinar su respuesta a la enfermedad en función a tres niveles del color del follaje; Verde (1), Verde amarillento (2) y Amarillo (3), luego desde una distancia de 30 a 50 cm, se revisaron y caracterizaron las hojas sintomáticas con 70 a 80 días de edad, con base a tres niveles del tono del moteado; Verde claro (1), verde amarillento (2) y amarillo (3). Los valores del color del follaje se multiplicaron por los valores del tono del moteado y se generaron seis índices de expresión de síntomas del HLB (IES), con valores de 1, 2, 3, 4, 6, y 9. Para el análisis se calcularon las frecuencias (%) de árboles que mostraron cada uno de esos IES para cada una de las combinaciones genéticas.

**Cuadro 1. Combinaciones genéticas entre limones mexicanos con otros cítricos que tienen potencial de generar genotipos híbridos con mayor tolerancia a CLas.**

Progenitor Femenino	Progenitor masculino
'Colimex' ( <i>C. aurantifolia</i> )	HS 10: 'Amblicarpa'+'Benton': ( <i>C. amblycarpa</i> ) + ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
	HS 11: 'Amblicarpa'+'C-35': ( <i>C. amblycarpa</i> )+( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
	HS 15: 'Amblicarpa'+Pomelo: ( <i>C. amblycarpa</i> ) +( <i>C. maxima</i> )
	Citrange 'Benton' ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
	Citrange 'Yuma': ( <i>P. trifoliata</i> x <i>C. sinensis</i> )
	Citrange 'C-32': ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
	Citrange 'C-35': ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
	Citrumelo-'Swingle': ( <i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i> )
	Pomelo: ( <i>C. maxima</i> )
	'Eureka'( <i>C. limon</i> )
	Limoneira L8A: ( <i>C. limon</i> )
	'Rosenberg': ( <i>C. limon</i> )
	'Limequat' ( <i>C. aurantifolia</i> x <i>Fortunella japonica</i> )
	Mex 13 ( <i>C. aurantifolia</i> )
'Eureka': ( <i>C. limon</i> )	
'Rosenberg': ( <i>C. limon</i> )	
Citrange 'C-35': ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )	
Mex 20 ( <i>C. aurantifolia</i> )	Citrange 'C-32': ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
	'Limequat': ( <i>C. aurantifolia</i> x <i>Fortunella japonica</i> )
Mex 24 ( <i>C. aurantifolia</i> )	Citrange 'Yuma': ( <i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i> )
'Eureka' ( <i>C. limon</i> )	'Colimex': ( <i>C. aurantifolia</i> )
	Mex 13: ( <i>C. aurantifolia</i> )
Limoneira L8A ( <i>C. limon</i> )	Mex 20: ( <i>C. aurantifolia</i> )
	'Colimex': ( <i>C. aurantifolia</i> )
	Mex 13: ( <i>C. aurantifolia</i> )
'Rosenberg' ( <i>C. limon</i> )	Mex 20: ( <i>C. aurantifolia</i> )
	'Colimex': ( <i>C. aurantifolia</i> )
	Mex 13: ( <i>C. aurantifolia</i> )
	Mex 20: ( <i>C. aurantifolia</i> )

### Tono del moteado y concentración de bacterias de CLas en la hoja

Se seleccionaron 82 árboles híbridos F1 de las distintas combinaciones genéticas que presentaran algunos de los IES; 1, 2, 4 y 6, con 22, 19, 22, y 19 árboles respectivamente. Con el fin de promover

brotación vegetativa simultánea en todos los árboles, y tener hojas de la misma edad, se les podó una ramilla en cada punto cardinal, cortando en el punto donde tuvieran de 8 a 10 milímetros de diámetro, sin importan que no coincidiera con la base ramilla. Después de 80 días, cuando las hojas de los brotes vegetativos emergidos después de la poda, comple-



taron su desarrollo y las hojas presentaban ya los síntomas característicos del moteado de HLB, se colectaron 10 hojas sintomáticas por cada árbol. Se etiquetaron, se metieron en bolsas de papel, luego se pusieron en una hielera con gel refrigerante y se enviaron al Centro Nacional de Recursos Genéticos para que mediante la técnica de qPCR se determinaran las concentraciones de la bacteria a través del número de copias de gen 16S ribosomal de CLas por miligramo de tejido.

El ADN se extrajo usando el método CTAB (Doyle y Doyle, 1990). Las amplificaciones de PCR tiempo real se llevaron a cabo utilizando el sistema LightCycler 1.5 (Roche). Las reacciones se hicieron con un volumen de 10 µL conteniendo Master mix 1X, 250 nM de cada iniciador HLBas y HLBr, 150 nM de la sonda HLBp (TaqMan), 100 ng de DNA y H<sub>2</sub>O grado molecular (Li *et al.*, 2006). Las secuencias de los iniciadores y la sonda utilizadas fueron HLBas: 5'-TCGAGCGCG-TATGCAATACG-3', HLBr: 5'-CTACCTTTTTC-TACGGGATAACGC-3' y HLBp: 5'-AGACGGG-TGAGTAACGC-3'. Las condiciones de reacción para la amplificación fueron de 95°C por 20 min seguido de 50 ciclos a 95°C por un min y 58°C por 40 segundos. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en cada corrida y se incluyó un control negativo y otro positivo.

## DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### Dinámica de aparición de árboles con síntomas de HLB

Los híbridos de todas las combinaciones genéticas mostraron igual sensibilidad a ataque de las plagas y enfermedades comunes para el limón mexicano en la región. A excepción de la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) a la que la mayoría

de árboles no presentaron los síntomas correspondientes. Esto se explica por el hecho de que esta enfermedad solo ataca a los genotipos de limón mexicano (Orozco-Santos *et al.*, 2013) y no afecta a las otras especies de cítricos que se usaron en los cruzamientos y, por lo tanto, los híbridos heredaron su tolerancia o resistencia de esos progenitores. Esto ya representa un logro importante y una ventaja respecto al limón mexicano convencional.

En este sitio, las altas poblaciones de *D. citri* están presentes desde el 2006 y el HLB es endémico desde mayo de 2011, por lo que, para el tiempo en que se establecieron los híbridos en campo, la incidencia de árboles sintomáticos en la zona era de 100%. Dadas esas condiciones de alta concentración del patógeno en la zona, en un término de tres meses, los árboles de algunos cruzamientos ya presentaban hojas con síntomas característicos del HLB. Como se muestra en el Cuadro 2, para la semana 19 DP, el 14.3 % de árboles en la población de híbridos, presentaron el moteado característico del HLB. A nivel particular, los mayores porcentajes de árboles sintomáticos (16.6 % a 44.4 %), los presentaron los progenitores de limón mexicano y los de limón italiano, así como los híbridos de limón mexicano x limones italianos y de limón mexicano x híbridos somáticos. Esto demuestra una respuesta temprana a la enfermedad que tienen los limones mexicanos y los limones italianos para presentar los síntomas de la enfermedad del HLB, como lo sugiere de Curtolo *et al.* (2020). Este resultado contrasta con lo señalado para otros cítricos (Lee *et al.*, 2015). Las cruces de limones mexicanos x citranges y de limón mexicano x 'Limequat', presentaron los menores porcentajes de árboles sintomáticos para esta variable en esta fecha.

Para las inspecciones posteriores, la proporción de árboles sintomáticos en todas las combinaciones genéticas, fue aumentando gradualmente hasta alcanzar un promedio general de 83.88 % en la se-

**Cuadro 2. Frecuencias (%) de árboles híbridos F1 de las cruzas de limón mexicano con otros cítricos y sus progenitores que presentaron síntomas del HLB entre las semanas 19 a la 48 después de su establecimiento en campo.**

Genealogía	Árboles Núm.	Semanas desde la plantación					
		19	26	30	37	42	48
Mexicanos x Citranges	384	3.6	5.6	25.7	42.3	64.6	71.6
Mexicano x 'Limequat'	41	0.0	0.0	9.2	23.4	64.7	66.4
Mexicano x HS	138	27.8	39.2	55.9	88.2	95.6	97.2
Mexicanos x Italianos	825	22.4	44.3	62.9	82.9	91.6	95.6
Limonos Mexicanos	19	16.6	52.8	88.9	100.0	100.0	100.0
Limonos Italianos	16	44.4	66.6	66.6	100.0	100.0	100.0
Citranges <sup>y</sup>	24						25.0
'Limequat' <sup>y</sup>	2						100.0
Híbridos somáticos <sup>y</sup>	15						93.0
Pomelo <sup>y</sup>	10						90.0
Promedio general		14.3	26.1	38.6	54.6	64.6	83.9

<sup>y</sup>HS=Híbridos somáticos; <sup>y</sup>Los datos se tomaron solo en agosto de 2015 de árboles adultos expuestos al HLB desde el año de 2011.

mana 48 DP. Los limones mexicanos y los limones italianos alcanzaron el 100 % de árboles sintomáticos desde la semana 37 DP. Por su parte las cruzas de limones mexicanos x híbridos somáticos y de limones mexicanos x limones italianos superaron el 95 % hasta la semana 48 DP. Los híbridos de las cruzas de limones mexicanos x citranges registraron apenas un 71 % de árboles con síntomas en el último muestreo. Los citranges, que estuvieron creciendo en el banco de germoplasma, alcanzaron solo un 24 % de árboles sintomáticos, a pesar de que estuvieron expuestos a la infección natural desde mayo de 2011, cuando se detectó la enfermedad en este sitio experimental.

De estos resultados se puede apreciar que como lo señalan (Albrecht y Bowman, 2012; Folimonova *et al.*, 2009; Stover y McCallum, 2011) los genotipos con genoma de *P. trifoliata* presentan un comportamiento distinto en relación la dinámica de aparición de árboles sintomáticos en poblaciones expuestas a la infección natural. Lo anterior se puede explicar por el hecho de que los árboles de este género y sus híbridos son menos visitados por

*D. citri* como lo señalan Westbrook *et al.* (2011) y George y Lapointe (2019) y eso determina una dinámica más lenta para su infección. O como sucede en otros cítricos, la infección se mantiene latente y los síntomas tardan más tiempo en expresarse como lo señalan Lee *et al.* (2015).

#### Color del follaje y tono del moteado amarillento en hojas sintomáticas

Entre los progenitores hubo diferente respuesta al HLB. En el Cuadro 3 se presentan las frecuencias de árboles, de los distintos progenitores usados para los cruzamientos, que presentaron cada uno de los seis niveles del IES. Los IES con valor más alto corresponden a un nivel de tolerancia al patógeno más bajo. Ninguno de los progenitores registro el IES 9, lo que significa que sus árboles no alcanzaron el máximo nivel de amarillamiento en el follaje o que el tono del moteado causado por el HLB tampoco fue el más alto. Todos los árboles siguen produciendo fruta con características físicas normales y mantienen su calidad comercial. Los progenitores

**Cuadro 3. Frecuencias (%) de árboles que mostraron alguno de los seis índices de respuesta al HLB entre los progenitores usados en cruces de limón mexicano con otros cítricos.**

Progenitores	Árboles Núm.	Índice de respuesta al HLB					
		1	2	3	4	6	9
Hibrido Somático 10	5	-	-	25	50	25	-
Hibrido Somático 11	5	-	-	25	50	25	-
Hibrido Somático 15	5	-	-	25	50	25	-
'Eureka'	4	-	-	-	50	50	-
'Limoneira 8A'	4	-	-	-	25	75	-
'Rosenberg'	5	-	-	-	60	40	-
'Colimex'	8	-	-	-	-	100	-
Mex 13	7	-	-	-	28.5	71.5	-
Mex 20	4	-	-	-	50	50	-
Mex 24	4	-	-	-	25	75	-
Citrange 'C-32'	5	100	-	-	-	-	-
Citrange 'C-35'	4	80	20	-	-	-	-
Citrange 'Benton'	5	80	20	-	-	-	-
Citrange 'Yuma'	5	80	20	--	-	-	-
Citrumelo 'Swingle'	5	80	20	-	-	-	-
'Limequat'	2	-	-	-	50	50	-
Pomelo	3	-	-	-	75	25	-

de limones mexicanos, los limones italianos, el 'Limequat' y el pomelo, registraron IES 4 y 6. Esto sugiere que sus árboles presentan follaje verde o verde amarillento y el moteado puede ser de tono verde claro o incluso amarillo. Esto indica un nivel de tolerancia de medio a alto, lo que coincide con lo señalado por Folimonova *et al.* (2009). Sin embargo, los citranges "C-32" y 'C-35', 'Benton', 'Yuma', el citrumelo 'Swingle' registraron IES de 1 y 2 ya que sus árboles presentaron hojas con coloración de verde o verde claro y el moteado verde claro o verde amarillento. Esta es la expresión más baja de la enfermedad, indicando que estos genotipos tienen un mayor nivel de tolerancia a CLas como lo reportaron Stover *et al.* (2010).

Respecto a las poblaciones de híbridos, también mostraron gran variación respecto a esta variable. Después de dos años y medio desde la plantación, los árboles presentaron buen desarrollo, a pesar de estar plantados en un suelo con alto contenido de CaCO<sub>3</sub>. Esto se debe a que el portainjerto macrofi-

la le confirió adaptación a esa condición del suelo. Aunque hubo árboles amarillentos debido al síntoma de HLB, no se registró defoliación como lo reportan Stover *et al.* (2012) y Stover *et al.* (2015a) que sucede en árboles de toronja con alta sensibilidad al HLB. Tampoco se observó reducción de vigor. La mayoría de los árboles habían iniciado el periodo fructificación, pero no se detectaron síntomas de la enfermedad en la fruta, confirmando un nivel de tolerancia de medio a alto, como lo señala Folimonova *et al.* (2009) para limón mexicano y limón 'Eureka'.

Ya que los árboles fueron infectados prácticamente desde la fecha de su establecimiento en campo, para este tiempo, el 100 % de su dosel presentó los síntomas del moteado asimétrico. Solo las hojas de brotes vegetativos con edad menor a los 60 días no lo presentaron, ya que, para este estado de desarrollo de las hojas, los síntomas de la enfermedad aún no se manifiestan claramente (Robles-González *et al.*, 2013). Se pudo identificar árboles con

follaje amarillento y aspecto clorótico, provocado por la expansión de las manchas del moteado asimétrico en las hojas seniles. Sin embargo, también se pudo encontrar árboles que mantenían su follaje verde, con aspecto saludable a pesar de mostrar hojas con los síntomas de HLB. En las hojas sintomáticas también se detectó variación en el tono del moteado.

Como se observa en el Cuadro 4, en la mayoría de las combinaciones genéticas se detectaron árbo-

les para los distintos IES. Los IES 4, 6 y 9 tuvieron las frecuencias de híbridos más altas con esa clasificación y promediaron 25.2 %, 48.1 % y 23.5 % respectivamente. Estos síntomas considerados de medio a alto en la escala utilizada en el estudio. Con frecuencias menores, pero importantes se detectaron árboles híbridos para los IES 1 y 2, con promedios de 16.2 % y 11.9 % respectivamente. Estos árboles presentaron follaje verde, saludable y el moteado fue del tipo verde claro. Sobresalen

**Cuadro 4. Frecuencias (%) de híbridos de limón mexicano que mostraron alguno de los seis niveles de expresión de síntomas del HLB con base al color de follaje color y tono del moteado después de 48 semanas de estar expuestos a la infección natural en campo.**

Cruzas	Híbridos Núm.	Índice de expresión de síntomas					
		1	2	3	4	6	9
'Colimex' x HS 10	9		11.1		11.1	66.6	11.1
'Colimex' x HS 11	22		4.5		18.2	50.0	27.2
'Colimex' x HS 15	22		4.5		13.6	68.2	13.6
'Colimex' x 'Benton'	1				100.0		
'Colimex' x 'Yuma'	8	12.5	12.5			12.5	62.5
'Colimex' x 'C-32'	43	37.2	23.2	6.9	11.6	11.6	9.3
'Colimex' x 'C-35'	17	23.5	17.6		23.5	29.4	5.9
'Colimex' x 'Suingle'	6	16.6				50	33.3
'Colimex' x 'Pomelo'	7					100.0	
'Colimex' x 'Limequat'	26	11.5	7.7	3.8	7.7	65.4	3.8
'Colimex' x 'Eureka'	4				25.0	25.0	50.0
'Colimex' x 'Limoneira 8A'	2		50.0			50.0	
'Colimex' x 'Rosenberg'	69	2.9	2.9	5.8	8.7	52.1	27.5
Mex 13 x 'Limoneira 8A'	29		10.3	3.4	20.7	55.1	10.3
Mex 13 x 'Eureka'	15				26.6	46.6	26.6
Mex 13 x 'Rosenberg'	22		13.0		43.4	30.4	13.0
Mex 13 x 'C-35'	92	17.4	5.4	2.1	21.7	47.8	5.4
Mex 13 x 'C-32'	8	22.2	11.1		33.3	33.3	
Mex 13 x 'Yuma'	16	6.2	6.2			62.5	25.0
Mex 19 x 'C-32'	32	21.8	9.3	3.1	21.8	37.5	6.2
Mex 19 x 'Limequat'	8			11.1		66.6	22.2
Mex 24 x 'Yuma'	5	33.3				66.6	
'Eureka' x Mex 13	1				40.0	40.0	20.0
'Limoneira 8A' x 'Colimex'	29		3.4	3.4	6.9	34.5	51.7
'Limoneira 8A' x Mex 13	9				55.5	44.4	
'Limoneira 8A' x Mex 20	3					66.6	33.3
'Rosenberg' x 'Colimex'	25	1.3	3.2	1.3	10.3	47.7	36.1
'Rosenberg' x Mex 13	19		15.8		5.2	47.3	31.5
'Rosenberg' x Mex 20	72	4.1	15.2	1.4	25.0	38.9	15.2
Porcentaje promedio		16.2	11.9	4.2	25.2	48.1	23.5

las cruzas en las que intervinieron principalmente los progenitores de citranges y el citrumelo 'Swin-gle' por presentar híbridos con IES 1, el más bajo de la escala. Estos híbridos mostraron una buena respuesta a la enfermedad bajo las condiciones en que se realizó el estudio y pueden ser tomados en cuenta para posteriores trabajos de evaluación agronómica y de calidad de fruta, o bien en próximos trabajos de retrocruzas con el fin de recuperar características deseables de limón mexicano y eliminar o reducir las no deseadas que confiere *Poncirus* y que son dominantes.

Los resultados de este trabajo tienen semejanza con los reportados por Stover *et al.* (2010) quienes consignan que el género *Poncirus* y algunos de sus híbridos tienen tolerancia a CLas. También hay coincidencia con lo señalado por Stover *et al.* (2012) quienes señalan que, en la progenie de la cruce entre dos variedades altamente sensibles a este patógeno, pueden aparecer genotipos con mayor tolerancia que sus progenitores. Estos autores observaron que la toronja 'Triumph', un híbrido producto de la cruce de toronja x naranja dulce, dos variedades con alta sensibilidad al HLB, presentó un mejor comportamiento y mayor tolerancia a CLas bajo un ambiente de donde la enfermedad es endémica.

Algunos híbridos de las cruces de limones mexicanos x limones italianos también presentaron IES 1 y 2. Lo que sugiere que en las segregación y recombinación genética que se da en las hibridaciones entre cítricos, que normalmente son altamente heterocigóticos, se generan nuevas combinaciones de genes, en las que, como lo menciona Stover *et al.* (2012), se pueden ganar genes de tolerancia o se pueden perder genes para sensibilidad. Cualquiera que sea el caso, es muy importante lograr genotipos que incrementen su nivel de tolerancia a este patógeno en limón mexicano.

### **Expresión de síntomas y concentración de bacterias de CLas en la hoja**

De las 82 muestras que se enviaron al laboratorio del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP para determinar presencia y cantidad de la bacteria con base al número de copias de gen 16S ribosomal de CLas, solo se procesaron exitosamente 60 muestras. El laboratorio reportó los resultados como número de bacterias/mg de tejido de hoja. Se detectó una gran variabilidad en el número de bacterias detectadas en las distintas muestras. Se obtuvieron concentraciones de CLas desde 55 hasta 17,565,313 bacterias/mg de tejido. Al organizar los datos con base al IES se observa cierta relación entre el valor del IES y la concentración del patógeno. En el Cuadro 5 se puede apreciar que los árboles con IES 1, promediaron 129,011 bacterias /mg, la concentración más baja del patógeno. Por el contrario, los árboles que tuvieron el IES 6 alcanzaron 2,342,563 bacterias /mg, el promedio más alto de concentración del patógeno. Los árboles con IES 2 y 4, tuvieron promedios intermedios. Cuando los datos se agruparon base a las combinaciones genéticas generadas por cruzar los limones mexicanos x otros cítricos, el grupo de híbridos de la cruce de limón mexicano x Citranges promedió 120,782 bacterias/mg, la concentración más baja del patógeno. Le siguió el grupo de híbridos entre limones mexicanos x limones italianos con 448,879 bacterias/mg y finalmente el grupo que resultó de las cruces entre limones mexicano x híbridos somáticos con 1,989,220 bacterias/mg, que resultó el promedio más alto. De acuerdo a estos resultados, la concentración de CLas en los tejidos parece estar relacionada con el genoma que se empleó en los cruzamientos. Las combinaciones donde se usaron como progenitores los citranges fueron las que tuvieron las concentraciones más bajas de la bacteria. En sus trabajos Stover *et al.* (2015b) encontraron

**Cuadro 5. Número de copias del 16S ribosomal de *C. Liberibacter* con base al Índice de Expresión de Síntomas y a tres combinaciones genéticas de limón mexicano con otros cítricos.**

Factor	Bacterias /mg de tejido
Índice de expresión de síntomas	
IES 1	129,011
IES 2	303,483
IES 4	261,503
IES 6	2,342,563
Combinaciones genéticas	
Limones mexicanos x Citranges	120,782
Limones mexicanos x limones italianos	448,879
Limones mexicanos x Híbridos somáticos	1,989,220

relaciones similares y determino que el pedigrí de los progenitores tuvo efecto significativo en las concentraciones de CLas.

De los híbridos que mostraron follaje menos afectado por el HLB, se seleccionaron 16 genotipos que además presentaron, ausencia de síntomas de antracnosis y fruta sin semilla. Estos materiales se clonaron y se llevaron a la fase de evaluación semicomercial, donde durante tres años han estado expuestos a la infección natural de CLas. La mayoría de esos genotipos siguen produciendo follaje verde con aspecto sano y mejor comportamiento ante la enfermedad. Un híbrido de limón mexicano x limón italiano, por su hábito de crecimiento, follaje, tamaño y forma de la fruta, recuerdan al limón ‘persa’ (Figura 1B). Otro híbrido entre Mex 13 x citrange ‘C-35’, produce fruta del tamaño y forma semejante al limón mexicano. pero sin semilla y con floración constante durante todo el año, lo que lo hace de interés comercial. La evaluación de estos híbridos continuara en la región citrícola de Colima, una de las primeras áreas endémicas de CLas en México y con las mayores cargas de inóculo. La evaluación de estos híbridos continuara en la región citrícola de Colima, una de las primeras

áreas endémicas de CLas en México y con las mayores cargas de inóculo.

## CONCLUSIONES

La exposición a la infección natural en campo, en un sitio con alta carga del patógeno causante del HLB, permitió identificar 60 de híbridos originados del cruzamiento de los genotipos ‘Colimex’, Mex 13, Mex 20 y Mex 24 de limón mexicano con limón italiano variedad ‘Rosenber’ y los citranges ‘Yuma’, ‘C-32’ y ‘C-35’ y el citrumelo ‘Swingle’ con índices de expresión de síntomas bajos y una aparente mayor tolerancia a CLas.

## AGRADECIMIENTOS

Al fondo SEP-CONACYT por el financiamiento del proyecto de investigación: Hibridación interploide para generar genotipos de limón mexicano triploides, sin semilla y con tolerancia a tristeza. Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias por el financiamiento del proyecto de investigación: Evaluación y mejoramiento de híbridos de limón mexicano con mayor tolerancia al HLB-antracnosis y buena calidad de fruta.

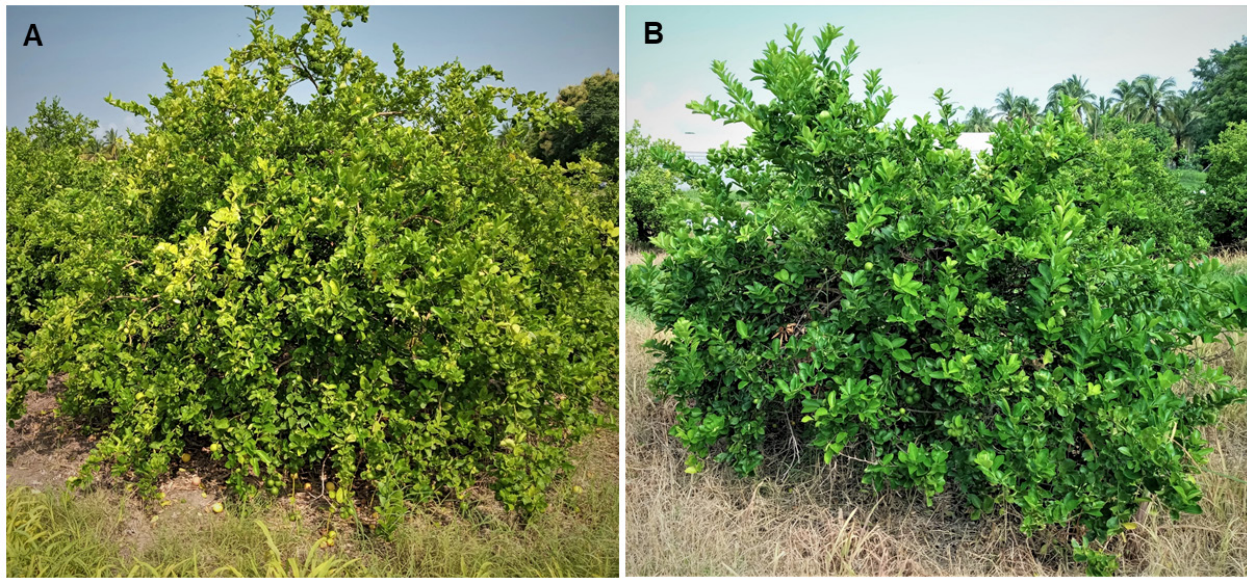


Figura 1. A) Árbol de limón mexicano variedad ‘Colimex’ mostrando fuertes síntomas del HLB. B) Árbol híbrido Mex 13 x ‘Rosenberg’, mostrando follaje con síntomas menos severos del HLB.

## LITERATURA CITADA

- Albrecht U and Bowman KD. 2011. Tolerance of the Trifoliolate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. HORTSCIENCE 46(1):16–22. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.1.16>.
- Albrecht U and Bowman KD. (2012) Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Scientia Horticulturae 147:71–80. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.036>
- Albrecht U, Hall DG and Bowman KD. 2014. Transmission efficiency of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and progression of huanglongbing disease in graft and psyllid-inoculated citrus. HortScience 49:367-377. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.3.367>.
- Alquizar B, Carmona L, Bennici S and Peña L. 2021 Engineering of citrus to obtain huanglongbing resistance. Curr Opin Biotechnol.70:196-203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.003>.
- Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P and Peña L. 2021. Resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. Frontiers in Plant Science 11:617664. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617664>.
- Curtolo M, de Souza Pacheco I, Boava LP, Takita MA, Granato LM, Galdeano DM, de Souza AA, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2020. Wide-ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki*, *Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. Scientific Reports 10(1):20865. doi: 10.1038/s41598-020-77840-2.
- Da Costa GV, Neves CSVJ, Bassanezi RB, Pereira Leite P Jr and Telles TS. 2021. Economic impact of Huanglongbing on orange production. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal 43(3): 1-10. <https://doi.org/10.1590/0100-29452021472>
- Djeddour D, Pratt C, Constantine K, Rwomushana I and Day R. 2021 The Asian citrus greening disease (huanglongbing): Evidence note on invasiveness and potential economic impacts for East Africa. CABI Working Paper 24, 94 pp. <https://dx.doi.org/10.1079/CABICOMM-62-8158>.
- Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12:13-15.
- Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S and Dawson WO. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. Phytopathology 99(12):1346-1354. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1346>.
- George J and Lapointe SL. 2019. Host-plant resistance associated with *Poncirus trifoliata* influence oviposition, development and adult emergence of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Pest management science 75(1):279-285. <https://doi.org/10.1002/ps.5113>.
- Hodges A and Spreen T. 2012. Economic impacts of citrus greening (HLB) in Florida, 2006/07–2010/11. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. EDIS FE903. <https://doi.org/10.32473/edis-fe903-2012>.

- Kepiro JL and Roose ML. 2010. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes* 6: 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0223-z>.
- Kishore K. 2014. Polyembryony. pp. 355–370. *In*: Ramawat KG, Mérillon JM and Shivanna K. (eds.) *Reproductive Biology of Plants*. CRC Press. Boca Raton FL. 390 p. <https://doi.org/10.1201/b16535>.
- Lee JA, Halbert SE, Dawson WO, Robertson CJ, Keesling JE and Singer BH. 2015. Asymptomatic spread of Huanglongbing and implications for disease control. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 112(24):7605–7610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508253112>.
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. “Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing”. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>.
- Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ, Bermúdez-Guzmán MJ, García-Mariscal KP, Orozco-Santos M y Robles-González MM. 2018. Manejo integral del cultivo de limón mexicano en un escenario de alta incidencia de HLB. *Campo Experimental Tecmán, INIFAP. Folleto para productores No. 20*. Tecmán, Colima, México. 26 p.
- McCullum G, Hilf M, Irey M, Luo W and Gottwald T. 2016. Susceptibility of Sixteen Citrus Genotypes to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Plant Disease* 100(6):1080–1086. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0940-RE>.
- Mondal B, Pramanick S, Saha R and Karmakar M. 2015. Application of simple sequence repeats markers for demarcation of *Citrus reticulata* nucellar and hybrid seedlings. *International Journal of Biosciences* 6(2):128–133. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/6.2.128-133>.
- Moore GA, Jacomo J, Neidinger L, Laurence SD and Cline K. 1993. Transformation in Citrus. pp.194–208. *In*: Bajaj YPS (Eds). *Plant protoplast and genetic engineering IV. Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer. Berlin Heidelberg. N. Y. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-78037-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-642-78037-0_15).
- Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, Robles-González M, Orozco-Romero J, Pérez-Zamora O, Velázquez-Monreal JJ, Timmer LW y Guzmán-González S. 2006. Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. *Campo Experimental Tecmán, INIFAP. Folleto Técnico Núm. 2*. Tecmán. Colima. México. 73 p.
- Pappu HR, Pappu SS, Kano T, Koizumi M, Cambra M, Moreno P, Su HJ, Garnsey SM, Lee RF and Niblett CL. 1995. Mutagenic Analysis and Localization of a Highly Conserved Epitope Near the Amino-Terminal End of the Citrus Tristeza Closterovirus Capsid Protein. *Phytopathology* 85(10): 1311–1315. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1311>.
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan YP, Bowman KD, Gmitter FG Jr and Deng Z. 2017. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. *Horticulture research* 15(4):17064. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.64>.
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI y 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. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MÁ, Velázquez-Monreal JJ, Carrillo-Medrano SH y García-Preciado JC. 2017. Limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). pp. 89–109. *En*: Bonilla Cárdenas JA. et al. (compiladores). *Agenda técnica agrícola Colima. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Publicación especial*. 319 p. [https://vun.inifap.gob.mx/BibliotecaWeb/\\_Content](https://vun.inifap.gob.mx/BibliotecaWeb/_Content).
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ, Medina-Urrutia VM y Sanches-Stuchi E. 2018. Experiencias con Huanglongbing en limón mexicano en el estado de Colima, México. *Citrus Research & Technolog* 39: 2–12. <https://doi.org/10.4322/crt.16518>.
- Simsek O, Donmez D, Eti S, Yesiloglu T and Kacar Y. 2018. Comparative transcriptome sequencing to determine genes related to the nucellar embryony mechanism in citrus. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 43(1): 58–68. <https://doi.org/10.3906/tar-1806-10>
- Stover E, Shatters R Jr, McCollum G, Hall DG and Duan Y. 2010. Evaluation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Titer in Field-infected Trifoliolate Cultivars: Preliminary Evidence for HLB Resistance. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 123:115–117.
- Stover, E and McCollum G. 2011. Incidence and severity of Huanglongbing and *Candidatus Liberibacter asiaticus* titer among field-infected citrus cultivars. *HortScience* 46:1344–1348. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.10.1344>.
- Stover E, McCollum G, Chaparro J and Ritenour M. 2012. Under Severe HLB and Citrus Canker Pressure, ‘Triumph’ and ‘Jackson’ Perform Better Than ‘Flame’ and ‘Marsh’ Grapefruit. 125. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. <https://journals.flvc.org/fshs/article/view/83927/80826>
- Stover E, McCollum GT, Driggers R, Lee R, Shatters R Jr, Duan YP, Ritenour M, Chaparro JX and Hall DG. 2015a. Resistance and Tolerance to Huanglongbing in Citrus. *ISHS Acta Horticulturae* 1065: XII International Citrus Congress - International Society of Citriculture. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.111>.
- Stover EW, Mccollum TG, Ramos JE and Shatters RG. 2015b. Growth, health and *Liberibacter asiaticus* titer in diverse citrus scions on mandarin vs. trifoliolate hybrid rootstocks



- in a field planting with severe huanglongbing. Proceedings of Florida State Horticultural Society 127:53-59. file:///C:/Users/User/Downloads/perrycollins-53-59%20(5).pdf
- Wang Y, Zhou L, Yu X, Stover E, Luo F and Duan Y. 2016. Transcriptome Profiling of Huanglongbing (HLB) Tolerant and Susceptible Citrus Plants Reveals the Role of Basal Resistance in HLB Tolerance. *Frontiers in plant Science* 7:933. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00933>.
- Wang X, Xu Y, Zhang S, Cao L, Huang Y, Cheng J, Wu G, Tian S, Chen C, Liu Y, Yu H, Yang X, Lan H, Wang N, Wang L, Xu J, Jiang X, Xie Z, Tan M, Larkin RM, Chen LL, Ma BG, Ruan Y, Deng X and Xu Q. 2017. Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction. *Nature Genetics* 49(5): 765-774. <https://doi.org/10.1038/ng.3839>
- Westbrook CJ, Hall DG, Stover EW, Duan YP and Lee RF. 2011. Colonization of Citrus and Citrus-related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *HortScience* 46:1-9. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.7.997>.
- Wu B, Li N, Deng Z, Luo F and Duan Y. 2021. Selection and Evaluation of a Thornless and HLB-Tolerant Bud-Sport of Pummelo Citrus With an Emphasis on Molecular Mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 31;12:739108. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.739108>.
- Xu Y, Jia H, Wu X, Koltunow AM, Deng X and Xu Q. 2021. Regulation of nucellar embryony, a mode of sporophytic apomixis in Citrus resembling somatic embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 59:101984. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.101984>

# Resistance inducers and amino acids in orange, lemon and grapefruit inoculated with *Candidatus Liberibacter asiaticus*

## Inductores de resistencia y aminoácidos en naranja, limón y toronja inoculados con *Candidatus Liberibacter asiaticus*

**Yazmin G. Zapata-Contreras**, <sup>1</sup>División de Estudios de Posgrado e Investigación-Facultad de Ingeniería y Ciencias-Universidad Autónoma de Tamaulipas. Centro Universitario Adolfo López Mateos, Cd. Victoria, Tamaulipas, México. C.P. 87000 Tel. 834 3181721, ext. 2111, <sup>1</sup>**Eduardo Osorio-Hernández\***, **Sergio de los Santos-Villalobos**, Departamento de Ciencias del Agua y Medio Ambiente, Instituto Tecnológico de Sonora, **Juan Alberto Ascacio-Valdes**, <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo, Saltillo, Coahuila, <sup>2</sup>**Claudia Magdalena López-Badillo**, <sup>2</sup>**Lizeth G. Campos-Múzquiz**, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo, Saltillo, Coahuila, <sup>2</sup>**Raúl Rodríguez-Herrera**.

\*Autor para correspondencia: eosorio@docentes.uat.edu.mx

Received: July 30, 2022.

Accepted: October 25, 2022.

Zapata-Contreras YG, Osorio-Hernández E, de los Santos-Villalobos S, Ascacio-Valdes JA, López-Badillo CM, Campos-Múzquiz LG and Rodríguez-Herrera R. 2022. Resistance inducers and amino acids in orange, lemon and grapefruit inoculated with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 197-210.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-14>

**Resumen.** Una de las problemáticas que enfrenta la citricultura, es la presencia de la enfermedad conocida como Huanglongbing ya que esta afecta el tamaño y producción de la fruta, por tal motivo, el objetivo de este estudio fue evaluar en condiciones de invernadero, el efecto de inductores de resistencia y aminoácidos en cítricos inoculados con la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Se analizaron plantas de 1.9 años de *Citrus lemon* sobre

los portainjertos *Citrus aurantium*, *C. volkameriana* y *C. macrophylla*, además plantas de *C. sinensis* y *C. paradisi* sobre el portainjerto *C. aurantium*, donde se aplicó 20 mL de fosfitos de potasio/5 L de agua, 4 mL de aminoácidos/5 L de agua y 15 g de fosetil Al/5 L de agua. La mayor altura de plantas se alcanzó con *C. lemon/C. macrophylla* con fosfitos de potasio. La concentración bacteriana de CLas en *C. sinensis/C. paradisi* fue de  $2.51 \times 10^{10}$  con fosfitos de potasio, y de  $3.03 \times 10^{10}$  con aminoácidos. El portainjerto que promovió la mayor altura fue *Citrus volkameriana* con la aplicación de aminoácidos. La aplicación de inductores de resistencia y aminoácidos presentaron efectos positivos en el desarrollo de las plantas de cítricos inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

**Palabras clave:** Cítricos, fosfitos de potasio, fosetil Al, huanglongbing.

El cultivo de los cítricos está distribuido en más 114 países de todo el mundo (Hu *et al.*, 2021). Los principales países productores son China, Brasil, Estados Unidos y México (Sáenz *et al.*, 2019). A nivel nacional los principales cítricos que se producen son: naranja (*Citrus sinensis*), limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), lima persa (*Citrus latifolia*) y mandarina (*Citrus reticulata*) (González *et al.*, 2020). Actualmente, una de las mayores problemáticas que enfrenta la citricultura a nivel mundial, es la presencia de la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB), ya que el tamaño y producción de la fruta se ven afectados (Dala-Paula *et al.*, 2019). Además, provoca la muerte y reducción del tamaño del árbol, moteado asimétrico en las hojas y malformación el fruto, así como, alta acidez, semillas inviables y de menor tamaño (Balan *et al.*, 2018). HLB es considerada la enfermedad más destructiva para los cítricos, se asocia con la  $\alpha$ -proteobacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) (Yang *et al.*, 2022), y es transmitida por el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*) (Balan *et al.*, 2018). Se ha buscado la implementación de un manejo integrado de esta enfermedad, en el cual se incluya: nutrición, manejo de plagas y enfermedades, podas adecuadas, riego calendarizado, aplicaciones de insumos dependiendo de la fisiología y ciclo biológicos de la planta (Vásquez *et al.*, 2020). Además, una alta densidad de plantación, especies de cítricos más productivas y adaptadas a condiciones ambientales variables (de Carvalho *et al.*, 2022). Así como el uso de portainjertos tales como: *Citrus volkameriana*, *Citrumelo Swingle* y *Citrango Carrizo* ya que estos modifican la calidad del fruto, aumentan el rendimiento y tolerancia a plagas y enfermedades (González *et al.*, 2020).

Para el control de hongos, bacterias y nematodos patógenos se ha empleado el uso de fosfitos ( $H_2PO_3^-$ ; Phi) y fosfatos ( $H_2PO_4^-$ ; Pi) como fungi-

cidas y bioestimulantes, la diferencia es un átomo de oxígeno que es sustituido por otro de hidrógeno (Yáñez-Juárez *et al.*, 2018). Además, el fósforo (P) es un mineral esencial para el crecimiento de las plantas ya que tiene una función principal en las estructuras de macromoléculas como fosfolípidos y ácidos nucleicos (Morales-Morales *et al.*, 2022). Cabe mencionar que las plantas de cítricos se caracterizan por la presencia de metabolitos secundarios principalmente antocianinas, flavones, flavononas y flavonoides (Mannucci *et al.*, 2018). Están presentes en las hojas de cítricos y su papel es muy importante, ya que presentan una respuesta frente al estrés abiótico y biótico (Nehela *et al.*, 2020). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de inductores de resistencia y aminoácidos en *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi* y *Citrus lemon* inoculados con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del experimento agronómico.** El experimento se estableció en el invernadero de la posta zootécnica “Ingeniero Herminio García González” de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (23° 56' 26 .5" y 99° 05' 59.9", y 193 msnm) en Güémez, Tamaulipas, México.

**Material vegetal.** Se utilizaron plantas de *Citrus lemon* injertadas sobre los portainjertos *Citrus aurantium* (6 plantas), *Citrus volkameriana* (4 plantas) y *Citrus macrophylla* (5 plantas), además de plantas de *Citrus sinensis* (13 plantas) y *Citrus paradisi* (6 plantas), estas dos últimas especies sobre el portainjerto *Citrus aurantium*.

**Manejo agronómico.** Las plantas se trasplantaron en macetas de 50×23 cm con una distancia de 1 m. Cada maceta fue llenada con suelo de la posta

zootécnica, posteriormente se le aplicó un riego a capacidad de campo. Dentro del manejo agronómico, se aplicaron riegos por goteo cada dos días, por otro lado, las podas de formación se practicaron cada dos meses para eliminar los brotes desarrollados en el tallo principal, el manejo de plagas fue en base a lo que se visualizó haciendo aplicaciones de jabón roma 5 g por 1 L de agua. Las plantas de *Citrus lemon*, *Citrus sinensis* y *Citrus paradisi* fueron injertados con yemas de árboles positivos al Huanglongbing detectadas por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas.

**Tratamientos a las plantas de cítricos.** Se utilizaron 3 productos químicos 1.- fosfitos de potasio (20 mL/ 5 L de agua), 2.-Aminoácidos (4 mL / 5 L de agua), 3.- Fosetil Al (15 g/ 5 L de agua). Se realizaron 2 aplicaciones en un intervalo de 20 días, así mismo, se tenía un tratamiento control, el cual no recibió ningún tipo de aplicación. Las aplicaciones fueron de manera foliar a punto de goteo, con un aspersor manual de 5 L de capacidad (JACTO).

#### **Determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus***

**Extracción de ADN.** Se recolectaron de cada planta una muestra de 20 hojas, sin daños aparentes de plagas o enfermedades. Así mismo, las muestras se almacenaron y etiquetaron en papel aluminio. Posteriormente, las muestras se colocaron en una hielera para su traslado al laboratorio. El procedimiento fue el siguiente: 0.2 g del peciolo y una parte de la nervadura y se maceró hasta obtener un polvo fino. Se adicionaron 600 µL de buffer de extracción 1 (200 Mm de NaCl, 2% SDS, 1% Polivinilpirrolidona 40, 25 Mm EDTA, 100 Mm Tris HCl ph 8) después se agregaron 12 µL de proteinasa K y 12 µL de β-mercaptoetanol, posteriormente se agitó con el vortex, y se incubó a 65 °C por 15 min,

además se agregó la solución buffer de extracción 2 (2% de CTAB, 1.4 M NaCl, 2% Polivinilpirrolidona 70, 100 Mm Tris-HCl ph 8, 20 Mm EDTA) y se añadieron 600 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló manualmente, posteriormente, se centrifugó a 13300 g por 10 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL, se agregó un volumen de CIA y se mezcló manualmente, después se centrifugó a 13300 g por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se agregaron 50 µL de acetato de amonio e isopropanol para precipitar, se dejó incubando a -4 °C por 12 horas, después se centrifugó a 13300 g por 20 min a 4 °C, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se resuspendió el ADN con TE. Se almacenó a -20 °C (Congelador Fisher Scientific) hasta su posterior utilización, para verificar su pureza.

**Amplificación del ADN por qPCR.** La obtención de productos de amplificación a partir del ADN se llevó a cabo utilizando el método descrito por Li *et al.* (2006), utilizando la técnica de PCR con iniciadores específicos donde se preparó un master mix en tubos para PCR de 200 µL con las siguientes cantidades primer HLB 30 µM F 4.00 µL (5'TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG 3'), primer HLB 30 µM R 4.00 µL (5'GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG 3'), primer COX 10 µM F 1.00 µL (5'GTA TGC CAC GTC GCA TTC CAG A 3'), primer COX 10 µM R 2.00 µL (5' GCC AAA ACT GCTAAG GGC ATT C 3'), buffer 10x 2.50 µL, DNTP 0.50 µL, taq polimerasa 0.25 µL, ADN 5.00 µL, sonda HLB 30 µM 2.00 µL (5' FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCG/BHQ-1 3'), sonda COX 10 µM 3.00 µL y agua 0.75 µL (5' TET/ATC CAG ATG CTT ACG CTG G/BHQ- 2 3'). Después de mezclar bien todos los reactivos con vortex, se pasaron 20 µL de MM y 5 µL de ADN se agitaron en vortex, y se pasó la muestra a tubos SmartCycler de 25 µL, los que se centrifugaron por 6 s para

asegurar que todo el volumen de reacción estuviera en el fondo de los tubos, y se colocaron en el termociclador (SmartCycler), programado con las condiciones de amplificación (PCR) siguientes: 1 ciclo de pre-desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 5 min 40 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización del ADN a 94 °C durante 30 s, hibridación del oligonucleótido al ADN a de 58 °C durante 30 s, extensión de la cadena complementaria de ADN, sintetizada por la DNA polimerasa a una temperatura de 72 °C durante 30 s. La cuantificación bacteriana se realizó con base en la metodología establecida por Vasconcelos *et al.* (2021).

**Determinación de minerales presentes en plantas de naranja, limón y toronja inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** Se tomó una muestra foliar de 20 hojas de las plantas positivas a *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Posteriormente, se colocaron 1 g de hojas muestreadas (previamente secas y trituradas) en el espectrómetro de fluorescencia de rayos X de dispersión de energía (Epsilon 1, Panalytical, Holanda). Se cubrió la parte inferior del tubo y se agregó la muestra para su lectura. El análisis de los minerales se realizó utilizando el software Omnian® en un periodo de 20-23 min por muestra.

**Identificación de fitoquímicos en plantas de naranja, limón y toronja inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** La determinación de fitoquímicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a masas. Para ello, se pesó 1 g de hojas secas y molidas y se colocó en tubos de poliestireno estériles (Falcón®) de 50 mL. Posteriormente, se adicionó 3.5 mL de etanol y 3.5 mL de agua destilada y se sometieron a vibración sónica durante 20 min (sonicador Branson®, modelo 2510). Después, se centrifugaron a

420 g por 10 min y posteriormente se recuperó el sobrenadante para pasarlo por filtros de nylon de 0.45 µm y así colocar cada muestra en viales de 1.8 mL; los viales se colocaron en un equipo HPLC Varian ProStar 430 (Palo Alto, California, U.S.A.), con una bomba trifásica, un automuestreador (modelo 410) y un detector (UV-vis) con arreglo de diodos. Finalmente, se determinaron los fitoquímicos mediante el software Galaxy® (Ascacio-Valdez *et al.*, 2013).

**Altura de la planta y peso de raíz en plantas inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** Se midió la altura con una cinta métrica al finalizar el experimento. Se determinó el peso fresco de raíz se eliminó toda la parte aérea de la planta, así mismo se eliminó el exceso de suelo y fue pesado en una balanza analítica (Denver instrument).

**Análisis estadísticos.** El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar, con 6, 4, 5, 13 y 6 repeticiones. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y cuando fue necesario, las medias de tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey (P=0.05).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Determinación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** Para *Citrus lemon* sobre los portainjertos *Citrus macrophyla* y *Citrus aurantium* no hubo diferencia significativa en la concentración de células bacterianas debida a la aplicación de los tratamientos. Sin embargo, *Citrus lemon/Citrus volkameriana* mostró significativamente una menor concentración bacteriana  $3.04 \times 10^{10}$  que el tratamiento que se tenía como control, por otro lado, *Citrus paradisi/Citrus aurantium* con aplicación de aminoácidos mostró significativamente una menor concentra-

ción de células bacterianas ( $3.03 \times 10^{10}$  células de *Candidatus Liberibacter asiaticus*), mientras que *Citrus sinensis/Citrus aurantium* con fosfitos de potasio reporto el menor número de células bacterianas ( $2.51 \times 10^{10}$ ) (Cuadro 1). No hay reportes del uso de fosfitos de potasio para el control de HLB. Sin embargo, Gardner *et al.* (2020) mencionaron que aplicaciones combinadas de benzobromarona y ácido tolfenám e inyectadas al tronco de árboles de cítricos adultos, fueron eficaces para disminuir la infección por CLAs. Además, Ghosh *et al.* (2018) observaron que al hacer aplicaciones de 2S de albúmina-Nano-ZnO, disminuyeron las poblaciones de CLAs en un 96.2, 97.6, 95.6 y 97% de la carga bacteriana inicial (por 12.5 ng de ADN genómico) a los 30, 60, 90 y 120 días después del tratamiento. Por otro lado, aplicaciones de *Bacillus subtilis*

L1-21 a 104 unidades formadoras de colonias (ufc mL<sup>-1</sup>) contra CLAs, dieron como resultado una reducción de 1,000 en las copias de CLAs por gramo de nervadura central de la hoja (107 al 104) en 4 días, además en huertos de cítricos afectados por HLB durante un período de 2 años, la incidencia de CLAs se redujo a <3% (Munir *et al.*, 2022). La aspersión foliar de giberelina o antioxidantes (ácido úrico) reduce los síntomas de HLB en cítricos afectados (Ma *et al.*, 2020). Así mismo, Trinidad-Cruz *et al.* (2019) indicaron que la inoculación directa al suelo de *Azospirillum brasilense* mostró un efecto significativo en la reducción de la concentración de CLAs en arboles de limón mexicano en condiciones de invernadero. Por su parte, Trinidad-Cruz *et al.* (2019) mencionaron que al hacer aplicaciones foliares de opxytetraciclina y penicilina en condi-

**Cuadro 1. Cuantificación bacteriana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Citrus lemon*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*.**

Especie/ portainjerto	Tratamiento	Tet	ADN de la planta ng	Fam	Células bacterianas (Log 10)
<i>Citrus lemon /Citrus macrophylla</i>	Fosfitos de potasio	18.32	17.86	21.84	5.31 a
	Fosetil Al	16.94	16.47	28.77	3.32 a
	Aminoácidos	16.51	16.04	20.89	5.59 a
<i>Citrus lemon / Citrus aurantium</i>	Fosfitos de potasio	16.4	15.9	28.36	3.43 a
	Fosetil Al	17.46	17.0	26.84	3.87 a
	Control	19.03	18.55	28.87	3.29 a
<i>Citrus lemon /Citrus volkameriana</i>	Aminoácidos	17.08	16.6	27.14	3.79 a
	Fosetil Al	21.78	21.31	27.45	3.70 b
	Control	19.98	19.51	27.32	3.04 c
<i>Citrus paradisi / Citrus aurantium</i>	Aminoácidos	18.58	18.11	31.03	3.73 a
	Fosetil Al	17.34	16.87	29.56	3.09 b
	Control	16.67	16.20	25.89	4.15 a
<i>Citrus sinensis / Citrus aurantium</i>	Aminoácidos	17.56	17.09	29.78	3.03 c
	Control	18.45	17.98	26	4.11 a
	Aminoácidos	19.67	19.20	27.89	3.57 b
<i>Citrus aurantium</i>	Fosetil Al	19.8	19.33	28.45	3.41 c
	Fosfitos de potasio	18.65	18.18	31.56	2.51 d

\*Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes con una significancia de  $p=0.05$  de acuerdo a la prueba de Tukey \*Tet y Fam fluoroforos que marcan las sondas Cox (Citocromo oxidasa) y HLB respectivamente.

ciones de invernadero, a los 90 días después del tratamiento se reduce el título de CLas en cítricos afectados por HLB ( $p=0.0007$ ) con opxytetraciclina, y con penicilina ( $p=0.0020$ ), lo que sugiere que la penicilina tiene mayor actividad antibacteriana frente a CLas (Yang *et al.*, 2020).

**Altura de plantas inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** *Citrus lemon/Citrus macrophylla* presento la mayor altura de planta cuando se aplicó fosfitos de potasio, mientras que cuando esta combinación injerto/portainjerto fue sometida a fosetil Al su altura fue de 142.50 cm. *Citrus lemon/Citrus volkameriana* cuando recibió el tratamiento control presento una altura de 210.00 cm en comparación cuando se aplicó aminoácidos que presento 120 cm, para el portainjerto *Citrus aurantium*, la menor altura se registró en el tratamiento fosfitos de potasio con 147.00 cm, y presento una mayor altura el tratamiento control con 160.00 cm, por otro

lado, la especie *Citrus paradisi* sobre el portainjerto *Citrus aurantium* no mostró diferencia significativa en ninguno de los tratamientos, sin embargo, mostro un efecto positivo al aplicar fosetil Al en comparación con *Citrus lemon* y *Citrus sinensis* (Cuadro 2). Zhang *et al.* (2021) mencionaron que al hacer aplicaciones de antibióticos (penicilina) a cítricos infectados con HLB, presenta diferencia en la respuesta después de dos años de aplicación. Además, Bowman *et al.* (2016) notaron que la altura de la planta de *Citrus sinensis* no presento cambios con respecto al testigo, sin embargo, Stover *et al.* (2016) mencionaron que al hacer aplicaciones con imidacloprid combinado con un portainjerto, la altura y el desarrollo de la planta fueron mejores en comparación con árboles no tratados. Por otro lado, Nehela *et al.* (2020) observaron que al hacer aplicaciones de prolina ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), se aumentaba la altura de la planta de *Citrus sinensis*.

**Cuadro 2.** Altura de plantas de *Citrus lemon*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*.

Especie/portainjerto	Tratamiento	Altura (cm)
<i>Citrus lemon /Citrus macrophylla</i>	Fosfitos de potasio	219.00 a
	Aminoácidos	200.00 b
	Fosetil Al	142.50 c
	Control	210.00 a
<i>Citrus lemon /Citrus volkameriana</i>	Fosetil Al	202.00 b
	Aminoácidos	120.00 c
	Control	168.00 a
<i>Citrus lemon / Citrus aurantium</i>	Fosetil al	160.00 b
	Aminoácidos	150.00 c
	Fosfitos de potasio	147.00 d
<i>Citrus paradisi / Citrus aurantium</i>	Fosetil Al	103.00 a
	Control	100.00 a
	Aminoácidos	95.00 a
	Fosetil Al	110.75 a
<i>Citrus sinensis / Citrus aurantium</i>	Aminoácidos	125.66 a
	Control	131.00 a
	Fosfitos de potasio	108.80 a

\*Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes con una significancia de  $p=0.05$  de acuerdo a la prueba de Tukey.

**Peso de raíz de plantas inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** En la especie *Citrus lemon* se aprecia que con el portainjerto *Citrus volkameriana* hay respuesta más favorable al tratamiento de aminoácidos y en los portainjertos *Citrus macrophylla* y *Citrus aurantium* hay respuesta favorable a fosfitos de potasio. Mientras que al comparar el peso de raíz de las tres especies de cítricos con el mismo portainjerto (*Citrus aurantium*), se aprecia que responden favorablemente a Fosetil Al en comparación al control (Cuadro 3). Irigoyen *et al.* (2020) informaron que las raíces de las plantas de cítricos tienen un efecto significativo en el crecimiento del patógeno *Candidatus Liberibacter* spp. Por otro lado, Zuñiga *et al.* (2020) mencionaron que generaron cultivos de cítricos a partir de raíces de *Citrus aurantium* infectado con CLAs de donde después se llevaron a *ex vivo* y se identificaron brotes desarrollados de 5–10 cm. En cítricos la formación de raíces ocurre en ~90 días después del explante, y la bacteria *Candidatus Liberibacter*

*asiaticus* migra naturalmente hacia las raíces recién formadas (Mandadi *et al.*, 2017). Además, mencionaron que la pérdida de raíces, la mayoría de las veces se asocia con deficiencias nutricionales, cuando en realidad es la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, así como otro problema es la desigual distribución de la bacteria dentro de los árboles infectados y esto limita los brotes nuevos y las raíces en desarrollo (Alves *et al.*, 2021).

**Identificación de fitoquímicos en plantas de naranja, limón y toronja inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** En el Cuadro 4, se presenta la información de los metabolitos secundarios en las tres especies de cítricos, donde se apreció un total de 32 compuestos químicos distribuidos en diferentes especies y portainjertos, además las tres especies de cítricos destacan por la presencia de ácido cafeico 4-O-glucósido, así como ácido ferúlico 4-O-glucósido con excepción de *Citrus Paradisi*. Cabe mencionar que las tres es-

**Cuadro 3.** Peso de raíz de plantas de *Citrus lemon*, *Citrus sinensis*, *Citrus paradisi*.

Especie/portainjerto	Tratamiento	Peso (gr)
<i>Citrus lemon</i> / <i>Citrus macrophylla</i>	Fosfitos de potasio	652.50 a
	Aminoácidos	484.50 b
	Fosetil Al	437.50 c
	Control	664.00 b
<i>Citrus lemon</i> / <i>Citrus volkameriana</i>	Fosetil Al	560.00 c
	Aminoácidos	1090.00 a
	Control	415.00 a
<i>Citrus lemon</i> / <i>Citrus aurantium</i>	Fosetil al	469.00 a
	Aminoácidos	349.50 a
	Fosfitos de potasio	554.00 a
	Fosetil Al	224.00 a
<i>Citrus paradisi</i> / <i>Citrus aurantium</i>	Control	130.50 b
	Aminoácidos	72.50 c
	Fosetil Al	232.00 c
	Aminoácidos	286.67 b
<i>Citrus sinensis</i> / <i>Citrus aurantium</i>	Control	220.00 d
	Fosfitos de potasio	458.00 a

\*Medias con diferentes letras son estadísticamente diferentes con una significancia de  $p=0.05$  de acuerdo a la prueba de Tukey.



**Cuadro 4. Fitoquímicos presentes en cítricos con aplicaciones de inductores de resistencia y aminoácidos.**

Especie	Compuesto químico	Tratamiento				
		P.M	C	F-P	F-AI	A
<i>Citrus lemon / Citrus macrophyla</i>	Esculina	340.00			*	
	Ácido cafeico 4-O-glucósido	341.00		*	*	*
	Ácido protocatequiico 4-O-glucósido	314.90		*	*	
	Ácido ferúlico 4-O-glucósido	354.90		*	*	*
	Ácido 5-5'-deshidroferúlico	384.80		*	*	
	Apigenina 6,8-di-C-glucósido	592.90		*	*	*
	Isorhamnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido	622.90		*	*	*
	Quercetina 3-O-glucosil-xilósido	594.90		*	*	*
	Luteolina 7-O-glucurónido	460.90		*	*	*
	Ácido feruloiltartárico	325.00	NA		*	
	Ácido 4-hidroxibenzoico 4-O glucósido	298.9			*	
	Catequina	288.80		*	*	*
	Dímero de procianidina B1	576.90		*		*
	Diosmin	607.00		*		*
	Ácido feruloiltartárico	325.00				*
	Florina	286.90		*		*
	Crisoeriol 7-O-(6''-malonil-apiosil-glucósido)	680.90		*		
	Ácido m-cumárico	162.90		*		
	Ácido cafeico 4-O-glucósido	340.90	*	*		*
	Ácido protocatequiico 4-O-glucósido	314.90	*	*		*
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	354.90	*	*		*	
Ácido 5-5'-deshidroferúlico	384.80	*	*		*	
Apigenina 6,8-di-C-glucósido	592.90	*	*		*	
Isorhamnetina 3-O-glucósido 7-O-ramnósido	622.90	*	*		*	
Quercetina 3-O-glucosil-xilósido	594.90	*	*		*	
Luteolina 7-O-glucurónido	460.90			NA	*	
Dímero de procianidina B1	576.90	*	*		*	
Diosmin	606.90				*	
Crisoeriol 7-O-(6''-malonil-apiosil-glucósido)	680.80				*	
Luteolina	284.90		*			
Ácido m-cumárico	162.90		*			
Quercetina 3-O-(6''-acetil-galactósido) 7-O-ramnósido	650.80		*			
Catequina	288.90	*				
3,4-DHPEA-EA	377.10	*				
Ácido protocatequiico 4-O-glucósido	315.10	*	*	*		
Ácido ferúlico 4-O-glucósido	355.00	*	*	*	*	
Quercetina 3-O-xilosil-glucurónido	609.10	*				
Ácido 5-5'-deshidroferúlico	385.10	*	*	*	*	
Cianidina 3-O-rutinósido	593.20			*	*	
Isorhamnetin 3-O-glucoside 7-O-rhamnoside	623.20	*	*	*	*	
Luteolina 7-O-glucurónido	461.10	*	*	*	*	
Dímero de procianidina B1	577.10	*	*		*	
Diosmin	607.10		*	*	*	
Ácido cafeico 4-O-glucósido	341.00	*	*	*	*	
Quercetina 3-O-(6''-acetil-galactósido) 7-O-ramnósido	650.90		*	*	*	
Petunidina 3-O-(6''-acetil-glucósido)	521.00				*	
Apigenina 6,8-di-C-glucósido	592.90		*			

Cuadro 4. Continúa...

Especie	Compuesto químico	Tratamiento				
		P.M	C	F-P	F-AI	A
	Ácido cafeico 4-O-glucósido	341.00	*		*	*
	Ácido 5-5'-deshidroferúlico	385.00	*		*	*
	p-Cumaroil glucosa	325.00				*
<i>Citrus paradisi</i> /	Cirsimaritina	313.00	*			*
<i>Citrus aurantium</i>	Apigenina 6,8-di-C-glucósido	593.10	*	NA		*
	Luteolina 7-O-glucurónido	579.10	*		*	*
	Apigenina 7-O-diglucurónido	621.10	*		*	*
	Arabósido-glucósido de apigenina	563.10			*	
	Escopoletina	191.10				*
	Cirsimaritina	313.00		*	*	*
	p-Cumaroil glucosa	325.10				*
	Luteolina 7-O-glucurónido	593.10				*
	Dímero de procianidina B1	577.10				*
	Quercetina 3-O-xilosil-glucurónido	609.10				*
	Galocatequina	304.90	*			
	Ácido cafeico 4-O-glucósido	341.10	*	*	*	
<i>Citrus sinensis</i> /	Ácido ferúlico 4-O-glucósido	355.00	*			
<i>Citrus aurantium</i>	Ácido 5-5'-deshidroferúlico	385.10	*	*	*	
	Arabósido-glucósido de apigenina	563.10	*	*	*	
	Luteolina 7-O-rutinósido	593.10	*		*	
	Dímero de procianidina B1	577.10	*	*	*	
	Quercetina 3-O-xilosil-glucurónido	609.10	*	*	*	
	Catequinas	288.90			*	
	Apigenina 6,8-di-C-glucósido	593.10		*	*	
	Ácido hidroxicafeico	195.10		*	*	
	Espinacetina 3-O-glucosil-(1->6)-glucósido	669.00		*		

C: control, F-P: fosfitos de potasio, F-AI: fosestil AI, A: aminoácidos, NA: no hay tratamiento, PM: peso molecular \*Presencia del compuesto químico.

pecies de cítricos presentan ácido cafeico 4-O-glucósido. En la especie *Citrus lemon* sobre el portainjerto *Citrus macrophylla* se encontró la presencia de esculina al aplicar fosestil AI en comparación con la aplicación de los otros tratamientos que no manifiestan este compuestos químicos, así mismo al aplicar fosfitos de potasio se encontró la presencia de dímero de procianidina B, diosmin, florina, crisoriol 7-O-(6''-malonil-apiosil-glucósido), ácido m-cumárico compuestos que no se manifestaron al aplicar aminoácidos, al aplicar fosestil AI en el portainjerto *Citrus volkameriana* destaca la presencia de luteolina, ácido m-cumárico y quercetina 3-O-

(6''-acetil-galactósido) 7-O-ramnósido así como este último compuesto también se encontró en la especie *Citrus aurantium*, arabósido-glucósido de apigenina está presente en la especie *Citrus paradisi* al aplicar fosestil AI, en la especie *Citrus sinensis* destacan por tener la presencia de ácido hidroxicafeico, espinacetina 3-O-glucosil-(1->6)-glucósido al hacer aplicación de fosfitos de potasio (Cuadro 4). Por otro lado, al hacer aplicaciones de inductores de resistencia y aminoácidos en las tres especies de cítricos se expresan otros compuestos químicos. Aplicaciones de fosfitos de potasio en *Citrus lemon* sobre *Citrus volkameriana* inducen luteolina, ácido

m-cumárico, quercetina 3-O-(6''-acetil-galactósido) 7-O-ramnósido y al aplicar fosetil Al expresa diosmin, crisoeriol 7-O-(6''-malonil-apiosil-glucósido) diferentes a el control esto presentan una relación con el desarrollo de la raíz de las plantas. Las especies que expresaron mayor presencia de compuestos químicos fueron *Citrus lemon* sobre *Citrus macrophylla* y *Citrus sinensis* sobre *Citrus aurantium* (Cuadro 5).

Altos contenidos de flavonas y flavonoles mejoran la tolerancia de los cítricos al HLB ya que hay una reducción significativa en el título de CLas (Hijaz *et al.*, 2020). Por otro lado, Karimi *et al.* (2012) revelaron que los principales compuestos fenólicos en *Citrus aurantium* eran ácido gálico, pirogalol, ácido siríngico y el ácido cafeico además rutina, quercetina y naringina se detectaron como los principales compuestos pertenecientes a los flavonoides ya que estos presentan una actividad en la planta de ser los responsables de la actividad antioxidante y otras actividades biológicas en esta especie. Principalmente los flavonoides, hidroxici-namatos y alcaloides fueron los compuestos que se encontraron en cítricos infectados con CLas además y flavona-C- y -Oglucósidos, diosmetina, apigenina, luteolina, son muy abundantes en hojas de cítricos (Hijaz *et al.*, 2013). Además de Moraes *et al.* (2020) mencionaron que el ácido abscísico, la asparagina, la glucosa, el ácido p-hidroxicinámico, la isoleucina, el ácido transjasmónico, la fenilalanina, el ácido quínico, la sacarosa, el triptófano y la valina fueron mayor en hojas positivas a CLas.

**Determinación de minerales presentes en plantas de naranja, limón y toronja inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.** En *Citrus lemon/Citrus macrophylla* se presentó el mayor porcentaje de Calcio (Ca) (62.09) con el tratamiento fosfitos de potasio, este mineral es fundamental en las plantas debido a que forma parte de la pared

celular, membrana celular, participa en la división y elongación celular. Mientras que el mayor porcentaje de potasio (K) se observó en plantas con el tratamiento fosetil Al (32.3) (Figura 1 A). Por otro lado, *Citrus lemon/Citrus volkameriana* tuvo el mayor porcentaje (32.03) de K con el tratamiento fosfitos de potasio, este mineral es fundamental en las plantas para el balance hídrico dentro de la planta, está involucrado en la producción y transporte de azúcares, activación enzimática, y síntesis de proteínas. El potasio también es necesario para la síntesis de pigmentos, sobre todo licopeno (Figura 1 B). *Citrus lemon/Citrus aurantium* presento minerales como azufre (S), cloro (Cl), K y Ca con el mayor porcentaje (62.64) en el tratamiento control (Figura 1 C). Además, *Citrus paradisi* sobre el portainjerto *Citrus aurantium* fue el que presento el mayor porcentaje de Mg de las 3 especies con un 9.87% con el tratamiento control este mineral tiene la función principal de reserva de energía en las plantas y otra muy importante la fijación de bióxido de carbono CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis. Por otro lado, presento 62.26% de Ca con el tratamiento de aminoácidos (Figura 1 D). *Citrus sinensis* sobre el portainjerto *Citrus aurantium* con 64.09% de Ca y comparado con el menor que se presentó en el tratamiento control con 58.65%, además, fue la especie que presento el mayor porcentaje de Al con un 9.23% este mineral tiene la capacidad de reducir la formación y transferencia de citoquinina en esta especie se reportó la menor concentración bacteriana al aplicar fosfitos de potasio (Figura 1 E). Zhang *et al.* (2021) mencionaron que al hacer aplicaciones de fosetil Al en arboles con HLB, el contenido de N aumento comparado con el tratamiento control que no tenía ninguna aplicación química, así mismo, mencionaron que las concentraciones de B, Cu, Fe, Ca y Mn se redujeron en hojas afectadas por HLB bajo todos los tratamientos químicos, y que la concentración de K aumento en hojas con HLB. Tian *et*

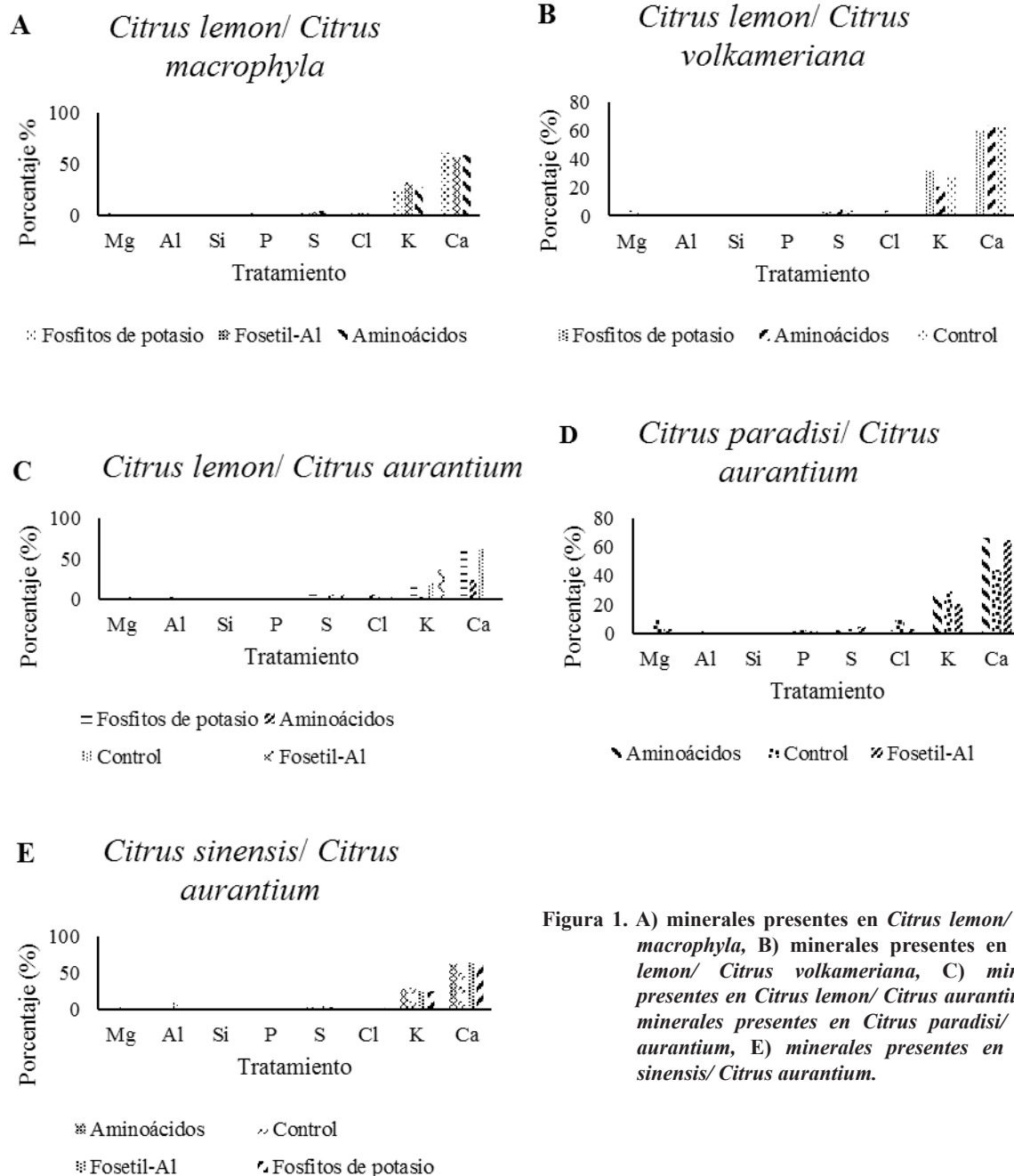


Figura 1. A) minerales presentes en *Citrus lemon/ Citrus macrophylla*, B) minerales presentes en *Citrus lemon/ Citrus volkameriana*, C) minerales presentes en *Citrus lemon/ Citrus aurantium*, D) minerales presentes en *Citrus paradisi/ Citrus aurantium*, E) minerales presentes en *Citrus sinensis/ Citrus aurantium*.

al. (2014) hablaron de los síntomas que presentan las plantas con HLB y así mismo reducen las concentraciones de Zn en plantas de *Citrus paradisi*. En otro estudio Atta *et al.* (2020) indican que al

tratar arboles de *Citrus reshni* infectados con HLB con Ca tienen a tener mayor brotación y al hacer la combinación con Mg incrementa el número de raíces y por lo tanto su grosor.

## CONCLUSIONES

La aplicación de inductores de resistencia y aminoácidos promovió efectos positivos en el desarrollo de las plantas de cítricos inoculadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*, específicamente en la altura de la planta, desarrollo radicular y la concentración de célula bacterianas, así como la activación de compuestos químicos presentes en cítricos. Las plantas de cítricos expresaban más compuestos químicos al aplicar fosfitos de potasio como apigenina 6,8-di-C-glucósido, ácido hidroxicafeico, espinacetina 3-O-glucosil-(1->6)-glucósido. El mineral Ca fue el más alto al hacer aplicaciones de inductores de resistencia y aminoácidos.

## AGRADECIMIENTOS

YGZC agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de Maestría en Ciencias. Este proyecto fue financiado por la Universidad Autónoma de Tamaulipas y la Universidad Autónoma de Coahuila

## LITERATURA CITADA

- Alves, M. N., Lopes, S. A., Raiol-Junior, L. L., Wulff, N. A., Girardi, E. A., Ollitrault, P., Peña, L. 2021. Resistance to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*,' the Huanglongbing associated bacterium, in sexually and/or graft-compatible *citrus* relatives. *Frontiers in Plant Science* 11: 617664. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617664>
- Atta, A. A., Morgan, K. T., Hamido, S. A., Kadyampakeni, D. M. 2020. Effect of essential nutrients on roots growth and lifespan of Huanglongbing affected citrus trees. *Plants*, 9(4), 483. <https://doi.org/10.3390/plants9040483>
- Balan, B., Ibáñez, A. M., Dandekar, A. M., Caruso, T., Martinelli, F. 2018. Identifying host molecular features strongly linked with responses to Huanglongbing disease in citrus leaves. *Frontiers in Plant Science* 9: 277. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00277>
- Bowman, K. D., Mccollum, G., Albrecht, U. 2016. Performance of 'Valencia'orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) on 17 rootstocks in a trial severely affected by Huanglongbing. *Sci. Hortic.* 201: 355–361. doi: 10.1016/j.scienta.2016.01.019
- Dala-Paula, B. M., Plotto, A., Bai, J., Manthey, J. A., Baldwin, E. A., Ferrarezi, R. S., Gloria, M. 2019. Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality, A review. *Frontiers in Plant Science* 9: 1976. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01976>
- de Carvalho, D. U., Neves, C., da Cruz, M. A., Longhi, T. V., Behlau, F., de Carvalho, S. A., Leite Junior, R. P. (2022). Late-season sweet orange selections under Huanglongbing and citrus canker endemic conditions in the Brazilian humid subtropical region. *Frontiers in Plant Science*, 13, 915889. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.915889>
- Gardner, C. L., da Silva, D. R., Pagliani, F. A., Pan, L., Padgett-Pagliani, K. A., Blaustein, R. A., Merli, M. L., Zhang, D., Pereira, C., Teplitski, M., Chaparro, J. X., Folimonova, S. Y., Conesa, A., Gezan, S., Lorca, G. L., Gonzalez, C. F. 2020. Assessment of unconventional antimicrobial compounds for the control of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*', the causative agent of citrus greening disease. *Scientific Reports* 10(1): 5395. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62246-x>
- Ghosh, D. K., Kokane, S., Kumar, P., Ozcan, A., Warghane, A., Motghare, M., Santra, S., Sharma, A. K. 2018. Antimicrobial nano-zinc oxide-2S albumin protein formulation significantly inhibits growth of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in planta. *PLoS One*, 13(10): e0204702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204702>
- González Hernández, Álvaro, Guillén Sánchez, D., Alia Tejacal, I., López Martínez, V., Juárez López, P., Bárcenas Santana, D. 2020. Comportamiento de variedades de naranja injertadas en diferentes portainjertos en Xalostoc, Morelos. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 11(5): 1123–1134. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2316>
- Hamido, S. A., Ebel, R. C., Morgan, K. T. 2019. Interaction of Huanglongbing and foliar applications of copper on water relations of *Citrus sinensis* cv. Valencia. *Plants* 8(9): 298. <https://doi.org/10.3390/plants8090298>
- Hijaz, F. M., Manthey, J. A., Folimonova, S. Y., Davis, C. L., Jones, S. E., Reyes-De-Corcuera, J. I. 2013. An HPLC-MS characterization of the changes in sweet orange leaf metabolite profile following infection by the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *PLoS one* 8(11): e79485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079485>
- Hijaz, F., Al-Rimawi, F., Manthey, J. A., Killiny, N. 2020. Phenolics, flavonoids and antioxidant capacities in *Citrus* species with different degree of tolerance to Huanglongbing. *Plant Signaling & Behavior* 15(5): 1752447. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1752447>
- Hu, B., Rao, M.J., Deng, X., Pandey, S.S., Hendrich, C., Ding, F., Wang, N., Xu, Q. 2021. Firmas moleculares entre cítricos y *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Patógenos PLoS One*, 17 (12): e1010071. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010071>
- Irigoyen, S., Ramasamy, M., Pant, S., Niraula, P., Bedre, R., Gurung, M., Rossi, D., Laughlin, C., Gorman, Z., Achor,

- D., Levy, A., Kolomiets, M. V., Sétamou, M., Badillo-Vargas, I. E., Avila, C. A., Irely, M. S., Mandadi, K. K. 2020. Plant hairy roots enable high throughput identification of antimicrobials against *Candidatus Liberibacter* spp. *Nature Communications* 11(1): 5802. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19631-x>
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A., Jaafar, H. Z. 2012. Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* bloom. *Molecules* 17(2): 1203–1218. <https://doi.org/10.3390/molecules17021203>
- Ma, W., Pang, Z., Huang, X., Xu, J., Pandey, S. S., Li, J., Achor, D. S., Vasconcelos, F., Hendrich, C., Huang, Y., Wang, W., Lee, D., Stanton, D., Wang, N. 2022. Citrus Huanglongbing is a pathogen-triggered immune disease that can be mitigated with antioxidants and gibberellin. *Nature Communications*, 13(1): 529. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28189-9>
- Mandadi, K., Irigoyen, S. C., Mirkov, T. E. (2017). Methods, compositions, and systems for culturing and characterizing fastidious plant microbes. *U.S. Pat. Appl.* 15, 1–10.
- Mannucci, C., Calapai, F., Cardia, L., Inferrera, G., D’Arena, G., Di Pietro, M., ... Calapai, G. 2018. Clinical pharmacology of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* for the treatment of anxiety. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1–18. doi:10.1155/2018/3624094
- Morales-Morales EJ, Martínez-Campos, Ángel R, López-Sandoval, J. A., Castillo González, A. M, Rubí-Arriaga M. 2022. Los fosfitos y sus aplicaciones en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 13(2): 345–354. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2906>
- Munir, S., Li, Y., He, P., He, P., He, P., Cui, W., Wu, Y., Li, X., Li, Q., Zhang, S., Xiong, Y., Lu, Z., Wang, W., Zong, K., Yang, Y., Yang, S., Mu, C., Wen, H., Wang, Y., Guo, J., ... He, Y. 2022. Defeating Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* with indigenous citrus endophyte *Bacillus subtilis* L1-21. *Frontiers in Plant Science* 12: 789065. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.789065>
- Nehela, Y., Killiny, N. 2020. The unknown soldier in citrus plants: polyamines-based defensive mechanisms against biotic and abiotic stresses and their relationship with other stress-associated metabolites. *Plant Signaling & Behavior* 15(6): 1761080. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1761080>
- Ramsey, J. S., Chin, E. L., Chavez, J. D., Saha, S., Mischuk, D., Mahoney, J., Mohr, J., Robison, F. M., Mitrovic, E., Xu, Y., Strickler, S. R., Fernandez, N., Zhong, X., Polek, M., Godfrey, K. E., Giovannoni, J. J., Mueller, L. A., Slupsky, C. M., Bruce, J. E., Heck, M. 2020. Longitudinal transcriptomic, proteomic, and metabolomic analysis of *Citrus limon* response to graft inoculation by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Journal of Proteome Research* 19(6): 2247–2263. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00802>
- Sáenz Pérez, C. A., Osorio Hernández, E., Estrada Drouaillet, B., Poot Poot, W. A., Delgado Martínez, R., Rodríguez Herrera, R. 2019. Principales enfermedades de los cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(7): 1653–1665. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1827>
- Sandoval-Mojica, A. F., Hunter, W. B., Aishwarya, V., Bonilla, S., Pelz-Stelinski, K. S. 2021. Antibacterial FANA oligonucleotides as a novel approach for managing the Huanglongbing pathosystem. *Scientific Reports* 11(1): 2760. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82425-8>
- Shi, Q., Pitino, M., Zhang, S., Krystel, J., Cano, L. M., Shatters, R. G., Jr, Hall, D. G., & Stover, E. 2019. Temporal and spatial detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* putative effector transcripts during interaction with Huanglongbing-susceptible, -tolerant, and -resistant citrus hosts. *BMC Plant Biology* 19(1): 122. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1703-4>
- Stover, E., Inch, S., Richardson, M. L., Hall, D. G. 2016. Conventional citrus of some scion/rootstock combinations show field tolerance under high Huanglongbing disease pressure. *HortScience* 51: 127–132. doi: 10.21273/hortsci.51.2.127
- Tian, S., Lu, L., Labavitch, J. M., Webb, S. M., Yang, X., Brown, P. H., He, Z. 2014. Spatial imaging of Zn and other elements in Huanglongbing-affected grapefruit by synchrotron-based micro X-ray fluorescence investigation. *Journal of Experimental Botany* 65(4): 953–964. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert450>
- Trinidad-Cruz, Jesús Rafael, Rincón-Enríquez, Gabriel, Quiñones-Aguilar, Evangelina Esmeralda, Arce-Leal, Ángela Paulina, Leyva-López, Norma Elena. 2019. Inductores de resistencia vegetal en el control de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón (*Citrus aurantifolia*) mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(2): 304-317. Epub 30 de septiembre de 2020. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1901-1>
- Vásquez Ortiz, R., Noriega-Cantú, D. H., Morales Guerra, M., Contreras Hinojosa, J. R., Salinas Cruz, E., Martínez Sánchez, J. 2020. Rentabilidad del sistema de producción manejo integrado de limón mexicano en copalillo, Guerrero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(6): 1247–1257. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.1908>
- Yang, C., Ancona, V. 2022. An overview of the mechanisms against “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”: virulence targets, citrus defenses, and microbiome. *Frontiers in Microbiology* 13: 850588. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.850588>
- Yang, C., Hu, H., Wu, Y., Lin, X., Fan, G., Duan, Y., Powell, C., Ancona, V., & Zhang, M. 2020. Metagenomic analysis reveals the mechanism for the observed increase in antibacterial activity of Penicillin against uncultured bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* relative to oxytetracycline in planta. *Antibiotics* 9(12): 874. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120874>
- Yáñez-Juárez, Moisés Gilberto, López-Orona, Carlos Alfonso, Ayala-Tafuya, Felipe, Partida-Ruvalcaba, Leopoldo, Velázquez-Alcaraz, Teresa de Jesús, Medina-López, Raymundo. 2018. Phosphites as alternative for the management of phytopathological problems. *Revista Mexicana*

- de Fitopatología, 36(1): 79-94. <https://doi.org/10.18781/rmex.fit.1710-7>
- Zhang, M., Karupaiya, P., Zheng, D., Sun, X., Bai, J., Ferrarezi, R. S., Powell, C. A., Duan, Y. 2021. Field evaluation of chemotherapy on HLB-affected citrus trees with emphasis on fruit yield and quality. *Frontiers in Plant Science* 12: 611287. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.611287>
- Zuñiga, C., Peacock, B., Liang, B., McCollum, G., Irigoyen, S. C., Tec-Campos, D., Marotz, C., Weng, N. C., Zepeda, A., Vidalakis, G., Mandadi, K. K., Borneman, J., Zengler, K. 2020. Linking metabolic phenotypes to pathogenic traits among “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and its hosts. *NPJ Systems Biology and Applications*, 6(1): 24. <https://doi.org/10.1038/s41540-020-00142-w>

# Physiological effects of Huanglongbing on Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) grafted on Macrophylla (*C. macrophylla*)

## Efectos fisiológicos de Huanglongbing en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) injertado en Macrofila (*C. macrophylla*)

Miguel Ángel Manzanilla-Ramírez\*, Jose Joaquin Velazquez-Monreal, Marciano Manuel Robles-González, Juan Eduardo Murillo-Herández, INIFAP Campo Experimental Tecomán. Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo. Tecomán, Colima, México. C.P. 28930; Angel Villegas-Montier, Posgrado en Fisiología Vegetal-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México. CP. 562302.

\*Autor para correspondencia manzanilla.miguel@inifap.gob.mx.

Received: September 6, 2022.

Accepted: October 30, 2022.

Manzanilla-Ramírez MA, Velazquez-Monreal JJ, Robles-González MM, Murillo-Herández JE and Villegas Montier A. 2022. Physiological effects of Huanglongbing on Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) grafted on Macrophylla (*C. macrophylla*). Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 211-223.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-11>

**Resumen.** La enfermedad del Huanglongbing (HLB), causa desequilibrios metabólicos por agotamiento de nutrientes y/o interferencia del transporte. En limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) ocurre una disminución de la producción. Por ello se planteó el objetivo de conocer los cambios fisiológicos con el uso del portainjerto Macrofila (*C. macrophylla*) en dos épocas (invierno y verano). Los tratamientos incluyeron árboles sanos y con HLB de pie franco e injertados. Se determinaron los contenidos nutrimentales, almidón y sacarosa, así como el rendimiento. En árboles con HLB los valores de Nitrógeno (N), Magnesio (Mg), almidón

y sacarosa fueron estadísticamente diferentes entre los injertados en comparación con los de pie franco (Tukey,  $P=0.05$ ). En árboles con HLB el uso del portainjerto Macrofila presentó concentraciones de N de  $19.5 \text{ mg g}^{-1}$  y sin injertar  $15.9 \text{ mg g}^{-1}$  en invierno, al igual que el Mg con  $1.26$  y  $0.98 \text{ mg g}^{-1}$  respectivamente. El almidón en hoja durante el verano concentró con Macrofila  $0.5\%$ , en contraste las plantas de pie franco  $1.0\%$ . La sacarosa en nervadura de injertadas en Macrofila  $17.39 \text{ mg g}^{-1}$  y sin injertar  $19.14 \text{ mg g}^{-1}$ . El uso del portainjerto Macrofila atenúa los efectos del HLB de forma estacional, sin embargo, no mejora los rendimientos en limón mexicano.

**Palabras clave:** Cítricos, carbohidratos, nutrimentos, portainjerto.

En 2010 se detectó la enfermedad del Huanglongbing (HLB), en la zona productora de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en el estado de Co-



lima. El HLB afecta a todas las especies y variedades de cítricos. No existen reportes de árboles sanados una vez infectados (Bové, 2006; National Academies of Sciences and Medicine, 2018). Es una de las enfermedades más complejas, debido a las interacciones entre el patógeno, vector, hospederos y ambiente (da Graça *et al.*, 2015). En Colima es causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), la cual puede ser transmitida por el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* y por injertos.

En cítricos el HLB causa desequilibrios metabólicos por agotamiento de nutrientes y/o interferencia del transporte (Duan *et al.*, 2009). Lo que tiene como consecuencia disminución de la producción, síntoma más impactante en las áreas productoras de cítricos del mundo (Bové, 2006; Gonzalez *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009; Robles-González *et al.*, 2017). A medida que se incrementa el tiempo de la infección por HLB, aumentan las deficiencias de nutrientes y desequilibrios de carbohidratos en hojas y raíces (Etxeberria *et al.*, 2009), detención del desarrollo de las plantas y se puede observar la muerte regresiva de brotes y ramas (Etxeberria *et al.*, 2009; Cimo *et al.*, 2013). En limón persa en México el HLB produjo un efecto perjudicial en el tamaño y peso de los frutos y se reportó la pérdida en producción de 2.4 t ha<sup>-1</sup> (Flores-Sánchez *et al.*, 2015).

En limón mexicano se ha registrado disminución de la producción desde etapas tempranas de la infección hasta cuando los árboles registran síntomas en más del 75% copa se reduce 50% y también se reportó disminución en el tamaño de la fruta cosechada. Los síntomas en hojas de limón mexicano incluyen puntos cloróticos, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteado y clorosis difusa hasta amarillamiento generalizado en la lámina foliar y defoliación. Histológicamente existe incremento de almidón en el

mesófilo de la hoja y se presenta hiperplasia, lo que ocasiona colapso del floema (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Los árboles de limón mexicano en producción sufren cambios fisiológicos en la distribución y concentración de los carbohidratos, tanto en hoja como en raíz (Manzanilla *et al.*, 2019). A pesar de estas afectaciones, González *et al.* (2018) describieron que después de varios años con la enfermedad el limón mexicano injertado sobre Macrofila (*C. macrophylla*), aunque disminuyen el vigor, continúa produciendo. Se ha demostrado que los dos hospederos preferentes de Pac son el limón mexicano y Macrofila, lo que explica la rápida diseminación de la enfermedad en las zonas productoras de Colima (Hall y Hentz, 2016). En contraste existen reportes que consideran al limón mexicano (Folimonova *et al.*, 2009; Iftikhar *et al.*, 2016; Ramadugu *et al.*, 2016; Stover *et al.*, 2016; Munir *et al.*, 2017) y Macrofila (Folimonova *et al.*, 2009; Ramadugu *et al.*, 2016; Munir *et al.*, 2017) entre tolerantes y moderadamente tolerantes al HLB. En complemento se reportó que los frutos cosechados de árboles con síntomas de HLB no se afectan significativamente (SST, acidez titulable, ácido ascórbico, pérdidas de peso e índice de color), excepto que los frutos son más sensibles al daño por frío (Saucedo-Veloz *et al.*, 2018).

La tolerancia observada en diferentes variedades y portainjertos pueden atribuirse a diversos factores, entre los que se incluyen: capacidad de colonización de los psílicos, ausencia de multiplicación de patógenos, replicación transitoria de la bacteria, falta de establecimiento de patógenos en la planta, infección retardada o recuperación de la infección (Ramadugu *et al.*, 2016).

En algunos casos, el portainjerto puede afectar los síntomas y niveles de gravedad de la enfermedad (Shokrollah *et al.*, 2011). Se ha reportado que los portainjertos como Macrofila que inducen mayor vigor, pueden permitir que los árboles so-

brevivan a los efectos dañinos del HLB (Albrecht *et al.*, 2012). Aunque no indujo altos niveles de resistencia al HLB en la variedad, se describieron diferencias en expresión de síntomas, el daño en la copa, crecimiento de brotes y calidad de la fruta (Albrecht y Bowman, 2012). También se sabe que el portainjerto principalmente los trifoliados, tiene efecto en la susceptibilidad al HLB de la variedad injertada (Ramadugu *et al.*, 2016), debido a que los portainjertos afectan caracteres hortícolas y fisiológicos, tolerancia a plagas y enfermedades, así como la compatibilidad con variedades (Castle, 2010).

Existe inconsistencia en los informes publicados con relación a la respuesta de los cultivares de cítricos al HLB, la variabilidad observada puede deberse a que son diversos genotipos del hospedero, ubicación geográfica, prácticas culturales o diferencias en la patogenicidad de diversos aislados de *Liberibacter* (Ramadugu *et al.*, 2016). Spann y Schumann en (2009) describieron que, se sabe relativamente poco acerca de los cambios de las plantas asociadas con Huanglongbing a pesar de que los síntomas en hoja a menudo se caracterizan como “similares a deficiencia de nutrientes”. El presente trabajo tiene como objetivo determinar si el portainjerto *Macrofila* disminuye los cambios fisiológicos que causa el HLB a árboles en producción de limón Colimex.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en las instalaciones del INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima (18°58'07.38"N 103°50'43.06"O). El clima en la región es cálido semi-seco con temperatura media anual de 26 °C y precipitación media anual de 750 mm. Durante dos periodos agosto-diciembre (invierno) de 2017 y marzo-septiembre (verano) de 2018 con la variedad de limón “Colimex” de pie

franco e injertada en *Macrofila*. En una estructura de malla antiáfidos de 4,000 m<sup>2</sup>. La plantación se realizó entre el 15 al 18 de julio del 2014. Se usó un arreglo topológico de 2.0 m entre árboles, 3.0 m entre hileras (1,600 árboles/ha). Los tratamientos se establecieron en contenedores con capacidad 60 litros. En sustrato compuesto de 1:1:1 (polvillo de coco, tierra y lombricomposta) con sistema de riego por goteo. El resto de labores de cultivo se realizaron de acuerdo al paquete tecnológico recomendado por el INIFAP (Figura 1). La parcela experimental consto de 5 árboles por tratamiento. El diseño experimental fue factorial 2X2 dos fechas (invierno y verano) con diferentes números de datos en función de la variable evaluada. Los datos se ingresaron a una base de Excel. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico InfoStat 2018. Para estudiar diferencias entre tratamientos se utilizó prueba estadística de Tukey. Con una significancia  $p \leq 0.05$ .

**Análisis foliar de nutrimentos.** Se evaluaron las concentraciones de macronutrientes: Nitrógeno total (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg) en hoja maduras de 120 días. Se colectaron 100 hojas de cada tratamiento. Para cada muestra se realizó una mezcla compuesta y tres repeticiones.

**Concentración de carbohidratos.** Se determinaron concentraciones de carbohidratos, en hojas y raíces de árboles de los diferentes tratamientos. Debido a que la principal azúcar presente en el floema de los cítricos es sacarosa y en lámina el almidón (Hijaz y Killiny, 2014). Se seleccionaron nervaduras y lamina foliar de hojas de 120 días para determinar almidón y sacarosa. Así como raíces secundarias para evaluar su contenido de almidón. La extracción de almidón se realizó a partir de 20 mg de tejidos por separado de hoja y raíz liofilizadas



Figura 1. Tratamientos y manejo de árboles de limón Colimex en contenedores. Control de malezas (A), sistema de riego por goteo (B), Tratamientos (C, D).

y molidas (Gonzalez *et al.*, 2011). La Sacarosa se realizó siguiendo la metodología descrita por (Geigenberger y Stitt, 1993).

**Rendimiento de fruta.** Se marcaron 15 brotes florales por tratamiento de cada una de las dos fechas y se registró el cuajado de fruto. Posteriormente se registraron las cosechas durante 12 meses en kilogramos/árbol.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Concentración nutrimental. Nitrógeno (N).** Este elemento en invierno mostró diferencias estadísti-

cas significativas entre todos los tratamientos, los árboles injertados sanos mostraron mayor concentración con  $20.6 \text{ mg g}^{-1}$  manteniéndose dentro intervalo óptimo de  $20.5 \text{ mg g}^{-1}$ , mientras que los demás tratamientos no alcanzaron el óptimo. Similar comportamiento se obtuvo en verano, aunque ningún tratamiento alcanzó el nivel óptimo, el tratamiento injertado sin HLB tuvo la mayor concentración con  $18.4 \text{ mg g}^{-1}$ . Pustika *et al.* (2008) reportaron en mandarinas reducciones en las concentraciones de N por HLB. En contraste en varios cítricos de Pakistán el nitrógeno resultó significativamente alto en árboles infectados con CLAs (Razi *et al.*, 2011). Estos contrastes en la concentración de nitrógeno en árboles con HLB está influenciado

por el genotipo y el manejo dado en cada experimento. Los resultados muestran que el HLB afecta la concentración de nitrógeno en árboles de limón Colimex. El portainjerto *Macrofila* aumentó la concentración de nitrógeno en las dos etapas evaluadas. En la etapa posterior a la floración, la concentración de N en las hojas de primavera disminuye, porque este tejido se convierte en una fuente de N para el desarrollo de fruta (Legaz *et al.*, 1982). La disminución por debajo del nivel óptimo de nitrógeno afecta la síntesis de metabolitos (García-Mina 2012), principalmente aminoácidos y proteínas, relacionados con los mecanismos de defensa, crecimiento y producción.

**Fósforo (P).** La concentración de fósforo en hojas obtenidas en invierno tuvo diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento injertado con HLB 2.27 mg g<sup>-1</sup> y el tratamiento sin injertar sano 1.77 mg g<sup>-1</sup>. El limón Colimex injertado con y sin HLB presentó contenido óptimo, en contraste, los tratamientos sin portainjerto no alcanzaron la concentración óptima 1.20 mg g<sup>-1</sup>. En verano se presentó mayor concentración en el tratamiento injertado sano con 2.35 mg g<sup>-1</sup>, y fue estadísticamente diferente al tratamiento sin injertar sano que tuvo 1.77 mg g<sup>-1</sup>. En esta etapa los tratamientos presentaron contenidos óptimos de fósforo. Se han reportado deficiencias de P en árboles infectados con HLB (Brlansky *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013) y se han sugerido que la deficiencia de fósforo se vincula con la sintomatología del HLB. Los resultados muestran que en limón Colimex el HLB no afecta las concentraciones de fósforo y que solo disminuye el nivel óptimo sin el uso de *Macrofila* en invierno en árboles con y sin HLB, debido a que un pH mayor de 6.0 facilita la absorción y los requerimientos de P en cítricos es baja (Obreza y Morgan 2008). Posiblemente debido a que la dependencia a las micorrizas disminuye al aumentar

el nivel de fertilización (Menge *et al.*, 1978). El uso de *Macrofila* incrementa la concentración de P en invierno y verano.

**Potasio (K).** Como en el caso de N, el K juega un papel importante en una gran cantidad de procesos fisiológicos, como la homeostasis del agua y el transporte dentro de la planta de diferentes nutrientes (Fe, Mg, NO<sub>3</sub>, etc.) y metabolitos (citrato, malato, etc.). También, forma parte en la expresión de los mecanismos de defensa de las plantas con una acción indirecta sobre la fisiología de las plantas y la biosíntesis de metabolitos que podrían estar asociados (García-Mina, 2012). El K en cítricos es importante en el rendimiento, el tamaño de la fruta y la calidad del jugo. La concentración de potasio fue mayor en los tratamientos sanos en las dos fechas evaluadas. En invierno existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos sin injertar sanos y enfermos con 31.18 y 19.52 mg g<sup>-1</sup> respectivamente. En verano existieron diferencias estadísticas entre el tratamiento injertado sano que tuvo 22.5 mg g<sup>-1</sup> y los demás tratamientos, la menor concentración la obtuvo el tratamiento sin injertar con HLB con 18.08 mg g<sup>-1</sup> de potasio. Cabe destacar que los tratamientos en las dos etapas estuvieron por encima del contenido óptimo de K de 12.0 mg g<sup>-1</sup> para cítricos. Se ha reportado que en plantas con HLB se incrementaron las concentraciones de K. (Schumann *et al.*, 2009). En limón Colimex este comportamiento no se presentó. Las deficiencias de potasio no son comunes cuando se fertiliza normalmente como ocurrió en nuestro experimento, pero se puede desarrollar en suelos con pH alto o cuando se incrementa la producción (Obreza y Morgan, 2008). Estos resultados muestran que no existió deficiencia de este nutrimento en los tratamientos, por lo que el HLB no disminuye su concentración por debajo del intervalo óptimo.

*Calcio (Ca)*. Es el elemento mineral más abundante en los árboles de cítricos (Obreza y Morgan, 2008), presente principalmente en las hojas como se observa en nuestros resultados. Las concentraciones de este elemento en invierno no tuvieron diferencias estadísticas en los tratamientos evaluados, aunque se observó mayor concentración en los tratamientos sanos. En verano se observaron diferencias entre el tratamiento injertado sano con 33.41 mg g<sup>-1</sup> y el enfermo con 25.57 mg g<sup>-1</sup>. La concentración óptima de Ca 30 mg g<sup>-1</sup> lo presentaron los tratamientos sin HLB en las dos etapas evaluadas y de los tratamientos con HLB solo las plantas no injertadas alcanzaron el óptimo en verano. Se ha reportado que el calcio disminuye de manera importante en árboles infectados con HLB (Schumann *et al.*, 2009) hasta observar deficiencias (Brlansky *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Los resultados en limón Colimex son similares con lo reportado, al disminuir por debajo del nivel óptimo el Ca en hoja, debido a la infección de CLAs. Esta disminución afecta el rol del calcio y complejo de Ca-calmodulina como segundos mensajeros en la respuesta inducida y por ende la activación de los mecanismos de defensa de la planta (García-Mina 2012). Por lo que estos mecanismos pueden ser afectados en limón Colimex infectado con HLB.

*Magnesio (Mg)*. Es componente esencial de la clorofila, su deficiencia produce un patrón clorótico característico y puede causar defoliación prematura. Las variedades de cítricos con semillas como la variedad Colimex necesitan mayores cantidades de Mg debido a que las semillas almacenan gran cantidad de Mg (Obreza y Morgan, 2008). El magnesio tuvo un comportamiento similar al Ca debido a que en verano e invierno se observó un mayor contenido en los tratamientos sanos que en los que tienen HLB, con diferencias estadísticas significativas. Las hojas concentraron mayor contenido de

Mg en tratamientos sin injertar y sin HLB en invierno con 2.11 mg g<sup>-1</sup> mientras que con HLB tuvo el menor contenido con 0.98 mg g<sup>-1</sup>. En verano las plantas injertadas sanas tuvieron el mayor contenido con 1.18 mg g<sup>-1</sup>. Los tratamientos presentaron menor contenido de Mg que el óptimo 3.0 mg g<sup>-1</sup>, en las dos etapas evaluadas. En condiciones de deficiencia de este elemento, el almidón tiende a acumularse ya que su hidrólisis, la síntesis de sacarosa y la carga de ésta en el floema requieren energía y ésta se halla ligada a la actividad ATPásica, que depende del magnesio. Con deficiencias de Mg no hay una adecuada partición de fotoasimilados, ya que éstos no llegan al fruto y su tamaño se ve reducido (Agusti *et al.*, 2003). La deficiencia de Mg también, aumenta la incidencia de enfermedades (Jones y Huber, 2007). Se ha reportado disminución del contenido y deficiencias de Mg en árboles infectados con HLB (Schumann *et al.*, 2009; Brlansky *et al.*, 2012). Similares resultados obtuvimos con limón Colimex que tiene disminución del contenido de magnesio debido al HLB.

#### **Concentración de almidón y sacarosa en hoja.**

El HLB tiene influencia en el metabolismo de los carbohidratos en la planta, acumulando almidón en hojas, mientras que el almidón de las raíces es consumido para sostener sus actividades metabólicas y un limitado número de azúcares le son desplazados (Etxeberria *et al.*, 2009). En complemento, la acumulación de sacarosa en hojas sugiere que la translocación de fotoasimilados se ve afectada, debido a la obstrucción del floema (Fan *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2012).

El Cuadro 2, se muestra el análisis químico de almidón, donde se obtuvieron mayores concentraciones en los tratamientos con HLB y fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos sanos en invierno. En plantas injertadas sanas 5.13% de almidón en contraste plantas injertadas positivas a

HLB con 18.54 %. Las plantas de pie franco tuvieron concentraciones en hojas sanas y enfermas de 2.98 y 17.81% respectivamente. En verano tuvieron una concentración de almidón baja en comparación con invierno y no existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos injertados con 0.38 % sanos y con HLB 0.50 %. Plantas de pie franco mostraron diferencias estadísticas significativas con las plantas injertadas y entre sí con 0.68 % en sanas y 1.0 % con HLB. Los resultados obtenidos en las concentraciones de almidón en la lámina foliar son similares a lo reportado por Boava *et al.*, (2017) quienes describieron que la acumulación de almidón en el parénquima de hoja en plantas infectadas con CLas se debe a la alteración de la función del floema por la acumulación de calosa afectando la movilización de azúcares de tejidos fotosintéticos. Los genes relacionados con la deposición de calosa en el floema de plantas infectadas (tanto cultivares susceptibles como tolerantes) se sobre regulan al igual que los genes involucrados en la biosíntesis del almidón. Fan *et*

*al.* (2012) describieron que en genotipos tolerantes los tubos cribosos del floema tuvieron taponamiento de calosa y se inhibió la carga de floema, aunque el transporte en floema fue menos afectado en comparación con genotipos susceptibles. La deficiencia en la degradación del almidón puede contribuir a su acumulación en las hojas infectadas y la disfunción del floema que causa acumulación de almidón puede ocurrir antes de que se produzca una obstrucción visible del floema durante la infección por HLB (Fan *et al.*, 2010). Las hojas de los cítricos acumulan almidón en condiciones normales, pero se pueden acumular cantidades elevadas como resultado de la deficiencia de Zn, HLB y/o temperaturas frías del invierno (Monerri *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2012) como sucede en las hojas de limón Colimex en invierno.

El limón Colimex durante el verano no mostró concentraciones elevadas de almidón en sus hojas. La menor inhibición de las actividades de transporte de floema en hojas maduras infectadas de CLas en genotipos tolerantes puede deberse a la forma-

**Cuadro 1. Concentración de macronutrientos en hojas de 120 días, de plantas de limón Colimex injertadas y de pie franco, sanas e infectadas con CLas. Evaluadas en invierno y verano, 2018.**

Nutriente	Etapa	Injertadas		Pie franco		DMS*	Intervalo de Concentración Optimo**
		(HLB -) <sup>w</sup>	(HLB +) <sup>x</sup>	(HLB -) <sup>y</sup>	(HLB +) <sup>z</sup>		
N	Invierno	20.6 a	19.5 b	18.75 c	15.9 d	0.300	20.5-23.5
	Verano	18.4 a	15.8 b	15.0 c	12.85 d	0.146	
P	Invierno	1.22 ab	2.27 a	1.05 b	1.15 ab	1.201	1.20-1.60
	Verano	2.35 a	2.24 ab	1.77 c	2.14 b	0.115	
K	Invierno	23.2 ab	19.62 b	31.18 a	19.52 b	11.437	12.0-17.0
	Verano	22.5 a	18.14 c	19.48 b	18.08 c	1.217	
Ca	Invierno	33.14 a	20.39 a	37.82 a	24.63 a	17.668	30.0-49.0
	Verano	33.41 b	25.57 c	41.78 a	31.34 bc	6.257	
Mg	Invierno	1.71 b	1.26 c	2.11 a	0.98 d	0.253	3.0-4.9
	Verano	1.91 a	1.41 b	1.37 b	1.18 c	0.137	

W, Injertada (HLB-) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas-); X, Injertada (HLB+) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas+); Y, Pie franco (HLB-) = Limón Colimex pie franco (CLas-); Z, Pie franco (HLB+) = Limón Colimex pie franco (CLas+). Medias en la fila con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ). DMS\* Diferencia mínima significativa. Concentración optima\*\* (Rogers *et al.*, 2017).

**Cuadro 2. Concentraciones de almidón y sacarosa de plantas de limón Colimex injertadas y de pie franco, sanas e infectadas con CLas. Evaluadas en invierno y verano, 2018.**

Tratamientos	Almidón Lámina (%)		Almidón Raíz (%)		Sacarosa Nervadura (mg/g)	
	Invierno	Verano	Invierno	Verano	Invierno	Verano
Injertada (HLB-) <sup>W</sup>	5.13 b	0.38 c	6.33 a	2.0 b	15.16 c	0.34 a
Injertada (HLB+) <sup>X</sup>	18.54 a	0.50 c	5.98 ab	1.81 b	17.39 b	0.46 a
Pie franco (HLB-) <sup>Y</sup>	2.98 b	0.68 b	5.59 ab	2.52 a	13.77 c	0.34 a
Pie franco (HLB+) <sup>Z</sup>	17.81 a	1.00 a	3.37 b	1.8 b	19.14 a	0.41 a

W, Injertada (HLB-) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas-); X, Injertada (HLB+) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas+); Y, Pie franco (HLB-) = Limón Colimex pie franco (CLas-); Z, Pie franco (HLB+) = Limón Colimex pie franco (CLas+). Medias en la columna con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ).

ción de nuevos tejidos funcionales de floema ya que se ha detectado la regulación positiva de genes de biosíntesis de la pared celular (Fan *et al.*, 2012). Una vez acumulado, el almidón de la hoja en los cítricos tiende a no degradarse, aunque puede producirse cierto agotamiento de las reservas de almidón durante las fases de crecimiento de los órganos demanda (Monerri *et al.*, 2011), como lo observado en las hojas de limón Colimex en verano.

En naranjas el contenido de almidón predice de manera confiable la presencia de HLB durante la “estación cálida” (de junio a noviembre), pero no en la “estación fría” (de diciembre a mayo). En este estudio en la estación fría, los niveles de almidón en árboles con HLB fueron bajos (Whitaker *et al.*, 2014). Lo cual muestra la importancia en los cambios en la concentración de almidón en hojas de cítricos con HLB a lo largo de las temporadas del año. Nuestros datos muestran mayor concentración de almidón en invierno en hoja de limón Colimex. Debido a que la fruta es una importante y prioritaria demanda de carbohidratos en cítricos, por lo que, la carga elevada de fruta reduce tanto el desvío de carbohidratos hacia el sistema radicular como la acumulación de reservas de carbohidratos como sucede en la época de verano donde existe

mayor producción de limones. En contraste, las mayores reservas de invierno se utilizan durante la brotación de yemas y en la producción por lo que la concentración de carbohidratos en las hojas disminuye hasta un valor mínimo en verano (Monerri *et al.*, 2011), como lo sucedido en limón Colimex.

**Concentración de almidón en raíz.** La mayor concentración de almidón se presentó con el uso de portainjerto sano en invierno con 6.33 % y fue estadísticamente diferente al de pie franco con HLB que tuvo 3.37% de almidón. El uso del portainjerto no mostro diferencias estadísticas significativas entre arboles sanos e infectados con CLas. Al igual que en hojas durante verano las raíces redujeron el contenido de almidón en todos los tratamientos evaluados, arboles de pie franco tuvieron la mayor concentración con 2.52% de almidón y la menor concentración estuvo en los tratamientos con HLB 1.80%, aunque este sin diferencia estadísticas con las plantas injertadas positivas y negativas a HLB (Cuadro 3).

Se ha registrado que en las raíces no existen importantes diferencias entre los tratamientos sanos y enfermos con HLB en cítricos tolerantes, probablemente debido a que los fotosintatos todavía se

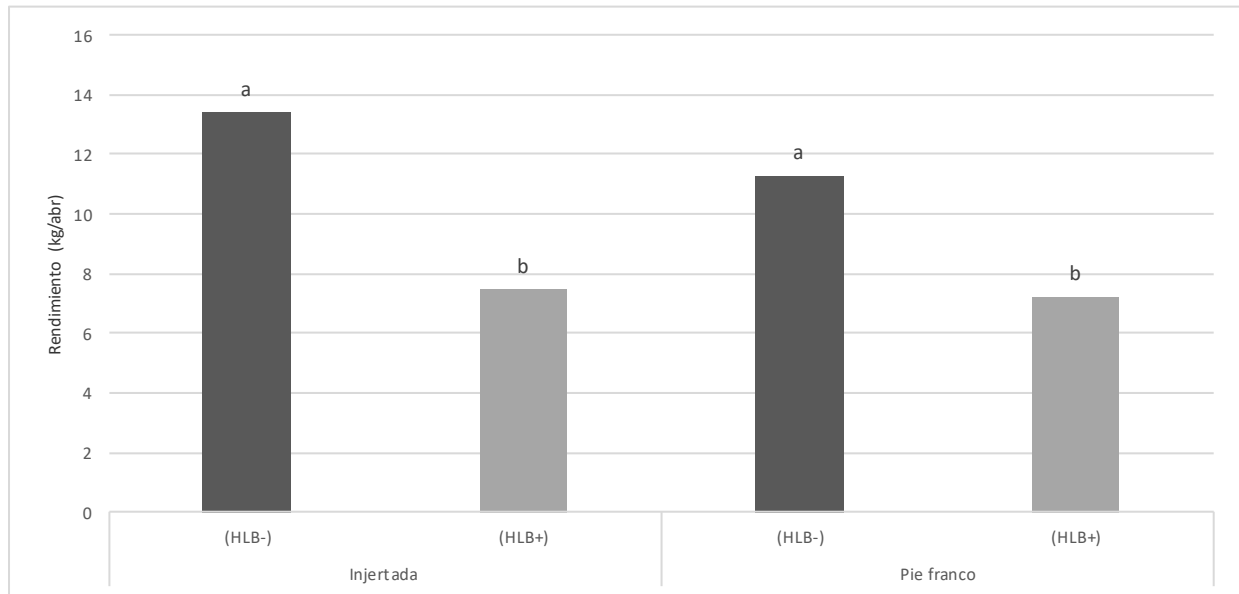
transportan en el floema de hojas afectadas a los órganos demanda como las raíces mientras que, las raíces de cítricos susceptibles sufrieron importantes daños (Fan *et al.*, 2012). Al mismo tiempo que se ha observado la acumulación de almidón en las partes aéreas, el agotamiento de las reservas de carbohidratos del sistema radicular no solo refleja la perturbación general en el metabolismo de los carbohidratos, sino que también se cree que es la razón principal de la senescencia de árboles asociada al HLB (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010). Al igual que en la hoja, la concentración de almidón en raíces de limón Colimex en producción tuvo diferencias entre invierno y verano. El uso del portainjerto Macrofila aumenta la concentración de almidón en raíces de invierno (almacenaje). Mientras que en verano hay una disminución de almidón en raíces debido a la alta demanda de carbohidratos por los frutos. El HLB no afecta la concentración de almidón de raíces de limón mexicano injertado en Macrofila.

**Concentración de sacarosa en hoja.** En el Cuadro 3, se observa que las nervaduras de hojas recolectadas en invierno tuvieron una mayor concentración de sacarosa en los tratamientos con HLB donde los árboles de pie franco e injertados tuvieron 19.14 y 17.39 mg g<sup>-1</sup> de sacarosa respectivamente con diferencias estadísticas entre ambos. Los tratamientos sanos fueron estadísticamente diferentes a los infectados con CLas mostrando la menor concentración con 15.16 las injertadas y pie franco 13.77 mg g<sup>-1</sup> respectivamente sin diferencias estadísticas entre ellas. En las hojas recolectadas en verano se tuvieron niveles bajos de sacarosa en nervaduras no detectando diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados. La mayor concentración la obtuvo el tratamiento injertado con HLB con 0.40 mg g<sup>-1</sup> mientras que la menor concentración se obtuvo de las nervaduras de los tratamien-

tos sin HLB que tuvieron 0.34 mg g<sup>-1</sup> de sacarosa. La sacarosa se acumuló en nervaduras de las hojas infectadas con HLB durante el invierno, consistente con las observaciones de Kim *et al.* (2009) y Fan *et al.* (2010) lo que implica que la translocación de fotoasimilados se ve afectada por la infección por HLB y la acumulación de sacarosa podría contribuir a algunos síntomas de HLB. Debido al estilo de vida de CLas que puede ser más parasitario que patógeno, ocasionado una partición deficiente de los carbohidratos como la acumulación de sacarosa y, por lo tanto, la inhibición de la fotosíntesis (Fan *et al.*, 2010). Es posible que la fotosíntesis en hojas esté regulada por la sacarosa en hoja en lugar de por el contenido de almidón (Cimo *et al.*, 2013). La fotosíntesis es inhibida por los productos fotosintéticos acumulados en hoja y la reducción del transporte de azúcares de la fuente (hoja) a la demanda (raíz, fruto, etc.) (Boava *et al.*, 2017). EL HLB aumenta las concentraciones de sacarosa en nervaduras de invierno. En verano disminuye la sacarosa en hoja, demostrando su transporte en limón Colimex a pesar de la infección con CLas en periodos de alta demanda de fotoasimilados.

**Rendimiento.** Existen reportes sobre la disminución de la producción como uno de los síntomas más impactante en las áreas productoras de cítricos del mundo {Bové, 2006 #231} (Bové, 2006; Li *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2012) y el caso de limón mexicano no es la excepción (Robles-González *et al.*, 2017). En la Figura 2, se observan el rendimiento de los tratamientos evaluados con diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos sin y con HLB en rendimiento anual. El tratamiento injertado sano tuvo 13.38 kg por árbol en contraste el tratamiento injertado con HLB 7.46 kg. Los tratamientos pie franco obtuvieron el sano y enfermo 11.26 y 7.20 kg/árbol respectivamente. Durante los periodos de abscisión de la fruta, la





**Figura 2.** Rendimiento de plantas de limón mexicano en contenedores. Injertada (HLB-) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas-); Injertada (HLB+) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas+); Pie franco (HLB-) = Limón Colimex pie franco (CLas-); Pie franco (HLB+) = Limón Colimex pie franco (CLas+). Medias en las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ).

competencia por los carbohidratos se considera un factor limitante y la nutrición se apoya en la fotosíntesis actual y los carbohidratos almacenados después de la antesis (Monerri *et al.*, 2011). Dutt *et al.* (2015) demostraron que la infección de HLB activa mecanismos de resistencia de la planta los cuales pueden afectar negativamente a la biomasa de los cultivos. Debido a la competencia metabólica entre ambos procesos biológicos (Cipollini *et al.*, 2003). También existe la hipótesis que la deposición de calosa en poros de tubos cribosos interfiere con el transporte de productos fotosintéticos a los órganos demanda (Boava *et al.*, 2017), afectando la productividad y la calidad de la fruta (Shen *et al.*, 2013). El rendimiento fue afectado por el HLB en limón Colimex aun estando injertado en

Macrofila. Se ha descrito que en limón mexicano el HLB provocan pérdidas en la producción del 50% (Robles-González *et al.*, 2017). Nuestros datos con limón Colimex con y sin el uso del portainjerto se asemejan a esta información.

## CONCLUSIONES

El uso del portainjerto Macrofila en árboles de limón Colimex con HLB disminuye el almidón en lámina foliar, la sacarosa en nervadura, y aumenta las concentraciones de nutrimentos (N y Mg) de forma estacional, sin embargo, aunque atenúa algunos efectos negativos del HLB, no mejora los rendimientos en limón mexicano.

## LITERATURA CITADA

- Achor D, Etxeberria E, Wang N, Folimonova S, Chung K and Albrigo L. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal* 9(2):56-64. <http://dx.doi.org/10.3923/ppj.2010.56.64>
- Albrecht U and Bowman KD. 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science* 185: 118-130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.09.008>
- Albrecht U, McCollum G and Bowman KD. 2012. Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. *Scientia horticultrae* 138: 210-220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.027>
- Boava LP, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2017. Physiologic, Anatomic, and Gene Expression Changes in *Citrus sunki*, *Poncirus trifoliata*, and Their Hybrids After 'Candidatus Liberibacter asiaticus' Infection. *Phytopathology* 107(5): 590-599. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0077-R>
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology* 88(1):7-37. <https://www.jstor.org/stable/41998278>.
- Brlansky R, Chung K and Rogers M. 2012. 2006. Florida citrus pest management guide: Huanglongbing (citrus greening). UF/IFAS Extension. <https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/00001370.pdf>
- Castle WS. 2010. A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience* 45(1):11-15. <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.45.1.11>
- Cevallos-Cevallos JM, Futch DB, Shilts T, Folimonova SY and Reyes-De-Corcuera JI. 2012. GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus Huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 69-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.010>
- Cimo G, Bianco RL, Gonzalez P, Bandaranayake W, Etxeberria E and Syvertsen JP. 2013. Carbohydrate and nutritional responses to stem girdling and drought stress with respect to understanding symptoms of Huanglongbing in citrus. *HortScience* 48(7): 920-928. <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.48.7.920>
- Cipollini D, Purrington CB and Bergelson J. 2003. Costs of induced responses in plants. *Basic and Applied ecology* 4(1): 79-89. <http://dx.doi.org/10.1078/1439-1791-00134>
- da Graça J, Kunta M, Sétamou M, Rascoe J, Li W, Nakhla M, Salas B and Bartels D. 2015. Huanglongbing in Texas: Report on the first detections in commercial citrus. *Journal of Citrus Pathology*. <http://dx.doi.org/10.5070/C421027939>
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW and Williams KP. 2009. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(8): 1011-1020. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>
- Dutt M, Barthe G, Irely M and Grosser J. 2015. Transgenic citrus expressing an Arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). 10(9): e0137134. DOI: 10.1371/journal.pone.0137134
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782. versión Online ISSN 2521-9766. Versión impresa ISSN 1405-3195
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.09.004>
- Fan J, Chen C, Brlansky R, Gmitter Jr F and Li ZG. 2010. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Plant pathology* 59(6): 1037-1043. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02328.x>
- Fan J, Chen C, Yu Q, Khalaf A, Achor DS, Brlansky RH, Moore GA, Li ZG and Gmitter Jr FG. 2012. Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection. *Molecular plant-microbe interactions* 25(11): 1396-1407. DOI: 10.1094/MPMI-06-12-0150-R
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>
- Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S and Dawson WO. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99(12): 1346-1354. DOI: 10.1094/PHYTO-99-12-1346
- García-Mina JM. 2012. Plant Nutrition and Defense Mechanism: Frontier Knowledge. In: Srivastava A. (eds) *Advances in Citrus Nutrition*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3_1)
- Geigenberger P and Stitt M. 1993. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189(3): 329-339. DOI: 10.1007/BF00194429
- Gonzalez P, Reyes-De-Corcuera J and Etxeberria E. 2012. Characterization of leaf starch from HLB-affected and unaffected-girdled citrus trees. *Physiological and molecu-*

- lar plant pathology 79: 71-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2012.05.002>
- Gonzalez P, Reyes J and Etxeberria E. 2011. Starch analysis of HLB-affected and control healthy citrus leaves reveal variations in the amylose/amylopectin ratio. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 124: 69-75. <http://journals.fcla.edu/.../81743>
- Hall DG and Hentz MG. 2016. An evaluation of plant genotypes for rearing Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). Florida Entomologist 471-480. <http://dx.doi.org/10.1653/024.099.0320>
- Hijaz F and Killiny N. 2014. Collection and chemical composition of phloem sap from *Citrus sinensis* L. Osbeck (sweet orange). PLoS One. 2014 Jul 11;9(7):e101830. DOI: 10.1371/journal.pone.0101830
- Iftikhar Y, Rauf S, Shahzad U and Zahid MA. 2016. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management—A review. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 15(1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.04.006>
- Kim J-S, Sagaram US, Burns JK, Li J-L and Wang N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: microscopy and microarray analyses. Phytopathology 99(1): 50-57. DOI: 10.1094/PHYTO-99-1-0050
- Koh E-J, Zhou L, Williams DS, Park J, Ding N, Duan YP and Kang BH. 2012. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. Protoplasma 249, 687-697. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-011-0312-3>
- Legaz F, Primo-Millo E, Primo-Yufera, Gil EC and Rubio JL. 1982. Nitrogen fertilization in citrus, I: absorption and distribution of nitrogen in Calamondin trees (*C. mitis* Bl.) during flowering, fruit set, and initial fruit development periods. Plant Soil 66:339-351. <https://doi.org/10.1007/BF02183800>
- Li W, Levy L and Hartung JS. 2009. Quantitative distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants with citrus huanglongbing. Phytopathology 99, 139-144. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-2-0139>
- Manzanilla-Ramírez MÁ, Villegas-Monter Á, Velázquez-Monreal JJ, Zavaleta-Mancera H A, Sandoval-Villa M y Muñoz-Orozco A. 2019. Cambios fisiológicos en árboles de limón mexicano en producción infectados con HLB. Revista mexicana de ciencias agrícolas 10 (7): 1603-1614. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1957>
- Menge JA, Johnson ELV and Platt RG. 1978. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. New Phytologist 81(3): 553-559. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1978.tb01628.x>
- Monerri C, Fortunato-Almeida A, Molina R, Nebauer S, García-Luis A and Guardiola J. 2011. Relation of carbohydrate reserves with the forthcoming crop, flower formation and photosynthetic rate, in the alternate bearing ‘Salustiana’ sweet orange (*Citrus sinensis* L.). Scientia Horticulturae 129(1): 71-78. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.009>
- Munir S, He P, Wu Y, He P, Khan S, Huang M, Cui W, He P and He Y. 2017. Huanglongbing Control: Perhaps the End of the Beginning. Microbial ecology 76(1):192-204 DOI: 10.1007/s00248-017-1123-7
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2018. A Review of the Citrus Greening Research and Development Efforts Supported by the Citrus Research and Development Foundation: Fighting a Ravaging Disease. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25026>
- Obreja TA and Morgan KT. 2008. Nutrition of Florida Citrus Trees, 2nd Edition. Florida Cooperative Extension Service. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Pustaka A, Subandiyah S, Holford P, Beattie G, Iwanami T and Masaoka Y. 2008. Interactions between plant nutrition and symptom expression in mandarin trees infected with the disease huanglongbing. Australasian Plant Disease Notes 3: 112-115. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03211261>
- Ramadugu C, Keremane ML, Halbert SE, Duan YP, Roose ML, Stover E and Lee RF. 2016. Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in Citrus relatives. Plant disease 100(9):1858-1869. DOI: 10.1094/PDIS-03-16-0271-RE
- Razi M, Khan IA and Jaskani MJ. 2011. Citrus plant nutritional profile in relation to Huanglongbing prevalence in Pakistan. Pakistan Journal of Agricultural Sciences 48(4):299-304.
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MÁ, Velázquez-Monreal JJ y Carrillo-Medrano SH. 2017. Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón mexicano en Colima, México. Revista mexicana de ciencias agrícolas 8(5): 1101-1111. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.111>
- Saucedo-Veloz C, Hernández-Rivera A, Arellano-Ostoa G, Robles-Gonzales MM, Jaén-Contreras D and Contreras-Oliva A. 2018. Calidad y vida poscosecha de frutos de limón mexicano provenientes de árboles con síntomas de HLB y asintomáticos. Revista mexicana de ciencias agrícolas 9(8): 1801-1807. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i8.1724>.
- Schumann AW, Syvertsen JP and Morgan KT. 2009. Implementing advanced citrus production systems in Florida: Early results. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 122:108-113. [https://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/economics/projects/econ\\_aps.pdf](https://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/economics/projects/econ_aps.pdf)
- Shen W, Cevallos-Cevallos JM, Da Rocha U, Arevalo HA, Stansly PA, Roberts PD and van Bruggen AH. 2013. Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus Liberibacter Ct* values in citrus trees infected with Huanglongbing. European journal of plant pathology 137: 727-742. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-013-0283-7>
- Shokrollah H, Abdullah TL, Sijam K and Abdullah SNA. 2011. Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks

- against HLB disease in Malaysia. *Crop protection* 30(5): 521-525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.005>
- Spann TM and Schumann AW. 2009. The role of plant nutrients in disease development with emphasis on citrus and huanglongbing. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 122: 169-171.
- Stover E, Shatters RG, Gruber B, Kumar P and Moore GA. 2016. Influence of Photoperiod Duration and Phloem Disruption through Scoring on Growth, Disease Symptoms, and Bacterial Titer in Citrus Graft Inoculated with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *HortScience* 51(10):1215-1219. DOI: 10.21273/HORTSCI11084-16
- Whitaker DC, Giurcanu MC, Young LJ, Gonzalez P, Etxeberria E, Roberts P, Hendricks K and Roman F. 2014. Starch Content of Citrus Leaves Permits Diagnosis of Huanglongbing in the Warm Season but Not Cool Season. *HortScience* 49(6): 757-762. <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.49.6.757>
- Zhao H, Sun R, Albrecht U, Padmanabhan C, Wang A, Coffey MD, Girke T, Wang Z, Close TJ and Roose M. 2013. Small RNA profiling reveals phosphorus deficiency as a contributing factor in symptom expression for citrus huanglongbing disease. *Molecular plant* 6(2): 301-310. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sst002>

# Comparative epidemiology of Huanglongbing disease in two regional citrus production scenarios in Mexico

## Epidemiología comparativa del Huanglongbing en dos escenarios cítricos regionales de México

Gustavo Mora-Aguilera\*, Gerardo Acevedo-Sánchez, <sup>1</sup>Colegio de Posgraduados - Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF). Texcoco, Estado de México. CP 56230; <sup>1</sup>Jorge Flores-Sánchez; Emiliano Loeza-Kuk, INIFAP Campo Experimental Mocochoá, Yucatán, México. C.P. 67413; M. Alejandra Gutiérrez-Espinosa; Colegio de Postgraduados, Fruticultura; <sup>1</sup>Santiago Domínguez-Monge; J. Joaquín Velázquez-Monreal, INIFAP Campo Experimental Tecoman, Colima, México. CP 28100. <sup>1</sup>Baldemar Santana-Peñaloza; Ricardo Munguía-Rosales, CESVY calle 19 #443 CP 97288 Mérida, Yuc.

\*Autor de correspondencia: morag@colpos.mx

Received: August 10, 2022.

Accepted: October 30, 2022.

Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Sánchez J, Loeza-Kuk E, Gutiérrez-Espinosa MA, Domínguez-Monge S, Velázquez-Monreal JJ, Santana-Peñaloza B and Munguía-Rosales R. 2022. Comparative epidemiology of Huanglongbing disease in two regional citrus production scenarios in Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 40(4): 224-243

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-18>

**Resumen.** Este trabajo tuvo como objetivo comparar los procesos epidémicos entre las regiones cítricas del Pacífico (PCO) y la Península de Yucatán (PEN) durante la fase activa de dispersión espacio-temporal de CLas, bacteria causante del Huanglongbing o HLB. Se evaluaron 15 variables específicamente asociadas al sistema epidemiológico. El HLB se encontró presente en 176/197 huertos de Colima con cronicidad promedio del 66% ( $\pm 16.7$ ); Michoacán (131) con 33.8% ( $\pm 30.7$ ); Yu-

catán (6) 6.5% ( $\pm 18.4$ ); Campeche (3) 1% ( $\pm 2.3$ ); y Q. Roo (2) con 25% ( $\pm 10.6$ ). Mediante análisis multivariado de factores, la región PCO fue significativamente mayor que PEN, respecto a cronicidad (49.9%,  $\pm 31.8$ ), especie cítrica, vigor de árboles, número de brotes (20.4,  $\pm 6.4$ ), número de plagas, concentración de CLas en planta (7.7,  $\pm 6.9$ ) y en vector (7.7,  $\pm 7.6$ ), número de generaciones potenciales (NGP) (16.4,  $\pm 3.4$ ), índice de abundancia cítrica (IAC) (0.34,  $\pm 0.18$ ) e índice de traspatio (IT) (0.21,  $\pm 0.10$ ) ( $p < 0.05$ ). Se generó un índice multivariado (IM) con las variables que en total explicaron el 90% de la varianza: edad de planta, nivel de manejo agronómico de huertos, concentración de CLas en planta, NGP y número de brotes. El IM fue significativamente mayor en la región PCO (Colima IM=0.01, Michoacán IM=0.005) que en PEN (Campeche y Yucatán IM=0.0004, Q. Roo IM=0.0007) ( $p < 0.0001$ ). Adicionalmente, el progreso temporal del HLB tuvo menor velocidad

e intensidad en PEN ( $1/b=0.02$ ) que en PCO ( $1/b=0.07$ ), lo cual se explica por la baja carga de inóculo de CLas en planta y vector y la reducida disponibilidad de tejido, y en consecuencia menor NGP. La región PEN tuvo una condición de baja prevalencia del HLB mientras que en PCO se determinó una condición endémica y crónica influenciado por la predominancia de cítricos agrios.

**Palabras clave:** CLas, *Diaphorina citri*, HLB, *Citrus sinensis*, *C. aurantifolia*, Carga Inóculo

La regionalidad en estudios fitosanitarios tiene como fin aportar criterios para la sustentabilidad productiva. Adicionalmente, si el cultivo y su productividad es el eje central de integración fitosanitaria y tecnológica, es posible desarrollar modelos racionales productivos y sustentables (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b). Un ejemplo de su importancia y necesidad es el estudio del cambio climático en la sanidad de cultivos, el cual es imposible analizar desde una dimensión espacial local o parcelaria (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014b; Parnell *et al.*, 2012). Un concepto importante en la regionalidad es el *manejo integrado de plagas en áreas amplias*, el cual de acuerdo con Hendrichs *et al.*, (2007) es mejor que el manejo parcelario, debido a que reduce poblaciones durante mayor tiempo, reduce el uso de insecticidas minimizando efectos ambientales y reduciendo costos de aplicación. Hendrichs *et al.* (2007) también señalaron que el enfoque parcelario es altamente reactivo y se basa en el control de la plaga cuando los niveles de la misma tienen implicación económica, mientras que el enfoque regional o de áreas amplias es preventivo y sustentable al cubrir una mayor área y tener un efecto duradero en la reducción de las poblaciones de la plaga. Este principio opera también en la Fitopatología, ya que el enfoque clásico de esta

disciplina se basa en el principio de infección. No obstante, en la Epidemiología tiene como propósito el estudio de la población de plantas enfermas (Vanderplank, 1963; Zadoks and Schein, 1979), es decir, estudio de focos de infección y bajo un escenario del principio de protección. Sin embargo, esta visión reactiva también es restrictiva y requiere la aplicación de una estrategia preventiva incluyendo el principio de regionalidad y los factores involucrados en una epidemia. Esto implica análisis del sistema epidemiológico, mediante la evaluación de variables del hospedante, patógeno, vector, clima, manejo, y suelo (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a; Flores-Sánchez *et al.*, 2012). Un enfoque de estas características y dimensiones fue propuesto inicialmente en 2003 (Mora-Aguilera, 2003. Notas de curso de Epidemiología Agrícola) y empleado como base racional para estudios epidemiológicos regionales en cocotero (Góngora *et al.*, 2004), cítricos (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Domínguez-Monge, 2011), nopal (Alonso-Barrera *et al.*, 2014), fresa (Ceja-Torrez *et al.*, 2014), café (Mora-Aguilera *et al.*, 2014e, 2014f, 2014g, 2021, Coria-Contreras *et al.*, 2014a, 2014b) y agave (Mendoza-Ramos *et al.*, 2021; López-Bautista *et al.*, 2020; Coria-Contreras *et al.*, 2019). Por lo anterior, la epidemiología regional se refiere al estudio de procesos epidemiológicos en un área constituida por un conjunto de unidades de producción que mantienen relaciones productivas, económicas y ambientales (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b).

La visión reactiva de la epidemiología se ha aplicado con el Huanglongbing de los cítricos (HLB), enfermedad ampliamente distribuida en la citricultura mundial (Bové, 2006; Da Graca, 1991; Gottwald, 2010). Los estudios epidemiológicos se han basado en modelos descriptivos del comportamiento del HLB, a nivel parcelario (Gottwald *et al.*, 2006; 1989; 2014b; Aubert *et al.*, 1984; Bassa-

nezi *et al.*, 2006). No obstante, en este patosistema, existen algunos estudios que muestran que el enfoque regional de control es más efectivo que el parcelario (Gottwald *et al.*, 2014a; Bassanezi *et al.*, 2013a; Bové, 2012; Rogers *et al.*, 2011). Bassanezi *et al.* (2013a) demostraron que el control regional de *Diaphorina citri* (DC), vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) y *C. L. americanus*, bacterias asociada al HLB en San Pablo, Brasil, permite reducir la incidencia de esta enfermedad hasta el 75%, requiere programas menos intensivos de control local del vector, y reduce los costos de manejo del HLB, porque las aplicaciones son menos intensivas y más eficientes. Sin embargo, en estos trabajos no se ha realizado un esfuerzo por entender el progreso epidémico a nivel regional que permita la planificación de control o estimar los potenciales impactos productivos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014c)

En México, el comportamiento epidémico de esta enfermedad permitió definir dos escenarios contrastantes (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a): 1) Región del Pacífico, de mayor intensidad epidémica y prevalencia en huertos comerciales, con una superficie citrícola de 100,932 ha, de las cuales el 90% es limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y limón persa (*Citrus latifolia*) (SIAP, 2015), y 2) Península de Yucatán, de menor intensidad epidémica y prevalencia en traspatios; con una superficie citrícola de 27,698 ha, de las cuales el 95% es naranja dulce (*Citrus sinensis*) (SIAP, 2015). Sin embargo, esta caracterización se basa principalmente en los reportes de plantas e insectos con CLas por parte del sector oficial de Sanidad Vegetal de México (SENASICA, 2015) y en algunos estudios parcelarios de diagnóstico epidemiológico y análisis de gradientes (Esquivel-Chávez, 2011; Márquez *et al.*, 2011; Flores-Sánchez *et al.*, 2011). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue realizar un análisis comparativo regional de procesos epidémicos entre las regiones del Pacífico y Península

de Yucatán con el propósito de operar acciones preventivas y protectivas racionales y eficientes que permitan la rentabilidad productiva de la cadena citrícola en México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Selección de sitios de estudio.** En un estudio epidemiológico regional la representatividad de la heterogeneidad es fundamental (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a, 2013). La selección de sitios de muestreo a nivel regional se realizó con base en la estimación de un factor de riesgo por unidad espacial (municipio), el cual se calculó con un método ponderativo de variables del sistema epidemiológico: hospedante, patógeno, vector, clima, manejo, y suelo. Esta metodología se ha empleado en diversos estudios para definir riesgos regionales y para establecer sistemas de vigilancia epidemiológica, en otros patosistemas (Cabrera-Hidalgo *et al.*, 2014; Mora-Aguilera *et al.*, 2014c; Mora-Aguilera *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2012). Las regiones de estudio fueron el Pacífico (PCO) con los estados de Colima (Tecomán y Armería) y Michoacán (Tepalcatepec, Buenavista, Apatzingán, Parácuaro, Múgica, Gabriel Zamora y La Huacana) y Península de Yucatán (PEN) con los estados de Quintana Roo (O. P. Blanco), Campeche (Campeche y Escárcega), y Yucatán (Tizimin, Dzan, Oxksutzcab, Ticul y Kinchil) (SIAP, 2015). El número de sitios de muestreo se estimó con las siguientes ecuaciones:

$$Nue = (Sup - i^{Fact} - i / \sum Fact - i) * N \quad [E.1]$$

**Dónde:** *Nue*= Número de unidades espaciales; *Sup-i*= Superficie citrícola por unidad espacial-*i*; *Fact-i*= Factor de ponderación por unidad espacial-*i*; *N*= número de unidades espaciales factibles de evaluar.

$$Fact - i = (Sup - i) * (Ind_{Suscep-i}) * (Carga_{CLas-i}) * (Ind_{DC-i}) * (Ind_{Trasp-i})$$

[E.2]

**Dónde:** *Fact-i* = Nivel de riesgo por unidad espacial-*i*; *Sup-i*= Superficie sembrada (ha) de especies cítricas por estado, distribuida en cuartiles, en relación al total de la superficie cítrica del estado. A mayor superficie mayor valor de ponderación; *Ind<sub>DC</sub>*= Índice de *D. citri* (DC) obtenido con el modelo de dinámica poblacional de *D. citri* generado por Torres-Pacheco *et al.*, 2013 a nivel nacional.

$$Indice_{Suscep} = [ \sum_{i=1}^n (Sup - i * PondSuscep_i) ] / Sup_{total}$$

[E.3]

**Dónde:** *Indice<sub>Suscep</sub>* = Índice de susceptibilidad relativa de especies cítricas a *Candidatus Liberibacter asiaticus*; *Sup-i*= Superficie sembrada de *n* especies de cítricos: limón mexicano=LM, limón persa=LP, limón italiano y toronjo=LI,T, mandarina=M y naranja dulce=ND, por unidad espacial; *PondSuscep<sub>i</sub>*= Valor ponderado de la susceptibilidad de especies cítricas a *Candidatus Liberibacter asiaticus*, LM=5, LP=4, LI, T=3, M=2 y ND=1 (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012); *SupCitri<sub>total</sub>*= Total de superficie cítrica sembrada en cada región.

$$Carga_{CLas} = (Región) + (Cercania_{foco}) + (Positivos_{veg}) + (Positivos_{psil})$$

[E.4]

**Dónde:** *Carga<sub>CLas</sub>* = Indicador del nivel de incidencia en planta y vector; *Región*= Vertientes con categorías epidémicas por su nivel de intensidad (Península=1, Pacífico=2); *Cercania<sub>foco</sub>*= Indicador (1-4) del riesgo por cercanía de regiones con HLB:

Región con presencia=4, Región Contigua a una con presencia de HLB=3, Región Intermedia a una con presencia de HLB=2 y Región Distante a una con presencia de HLB=1; *Positivos<sub>veg</sub>*: Incidencia de número de muestras vegetales positivas a HLB por municipio, con datos del SENASICA; *Positivos<sub>psil</sub>*: Incidencia de número de muestras de vector positivas a HLB por municipio, con base de datos del SENASICA.

$$IndTrasp = [(Ind_{AsentHum}) + (Ind_{Sup-i}) + (Ind_{Agri})] / 3$$

[E.5]

**Dónde:** *IndTrasp*=Índice de traspatio; *Ind<sub>AsentHum</sub>* = Índice generado a partir de la superficie (ha) del territorio municipal entre la superficie (ha) de asentamientos humanos. *Ind<sub>Sup-i</sub>* = Índice generado con la superficie cítrica (ha) del municipio entre la superficie (ha) territorial del municipio; *Ind<sub>Agri</sub>* = Índice generado con la superficie agrícola (ha) entre la superficie (ha) territorial del municipio.

Los huertos se seleccionaron por criterios de riesgo de presencia y dispersión de CLAs, tales como rutas de movilidad, preferencia a especies ácidas por mayor vulnerabilidad y atracción de DC.

**Método de muestreo.** El segundo nivel de muestreo en un estudio regional es el parcelario. El muestreo parcelario se realizó con el método "T", el cual se nombre así por la forma de selección de plantas a evaluar. Es un método sistemático y de gran practicidad por ser de patrón de muestreo continuo. Consiste en seleccionar 20 plantas por huerto, intercaladas 1 cada 3, se seleccionan 10 plantas del borde del huerto y 10 hacia el interior del huerto, en doble transecto sobre la planta 5 y 6. Esta propuesta se basa en el efecto borde de distribución



inicial del HLB, por infestación de vectores provenientes de fuente de inóculo externo que inducen infecciones en los árboles periféricos de los huertos cítricos, en un gradiente de dispersión de 30 a 40 m hacia el interior del huerto (Gottwald *et al.*, 2014b; Robles-González *et al.*, 2013; Bassanezi *et al.*, 2006). También se basó en estudios preliminares en México de la infestación de DC en huertos de tamaño medio (< 10ha), antes del ingreso de CLas, los cuales demostraron la colonización de bordo e interior del huerto dependiendo de la infestación del huerto (DGSV, 2008. Comunicación Personal).

**Variables de evaluación.** Se evaluaron 15 variables por huerto, las cuales se seleccionaron con base en los subsistemas del sistema epidemiológico: planta-patógeno-vector-manejo. A nivel de huerto se evaluó: tipo de especie cítrica (valor ponderado por vulnerabilidad de especie cítrica, LM=3, LP=2 y ND=1), superficie sembrada (ha), tipo de riego (rodado o microaspersión), nivel de manejo agronómico (BT=baja tecnificación y AT=alta tecnificación), índice de abundancia cítrica, índice de traspatio [E.5], cronicidad del HLB (promedio de severidad de 20 plantas evaluadas por huerto), concentración de CLas en planta y vector y número

de generaciones potenciales (NGP). A nivel de planta se evaluó: edad, vigor de árboles, brotación, número de plagas y enfermedades y severidad del HLB; para la evaluación de variables a nivel de planta se empleó una escala nominal (Cuadro 1).

El nivel de manejo agronómico se obtuvo mediante una encuesta a los productores, en la que se evaluaron las siguientes categorías: aspectos generales de los huertos como superficie, especie, propiedad del huerto (AG), nivel general de nutrición (N), vigor de árboles (V), control de maleza (CM), control general de plagas y enfermedades (CPE), y tipo y frecuencia de riego (R); a partir de estos datos se estimó un factor de ponderación por inductividad al HLB (FPI), el cual fue la suma de los valores parciales por categoría:

$$FPI = \sum(AG, N, V, CM, CPE, R) \quad [E.6]$$

El nivel de tecnificación por huerto se obtuvo con la regla de decisión:

$$NT = si(FPI \leq \frac{FPI}{2}, "BT", "AT") \quad [E.7]$$

**Dónde:** NT= Nivel de tecnificación de los huertos; FPI= Factor de ponderación por inductividad al

**Cuadro 1. Escala nominal empleada para la evaluación de cinco variables a nivel de planta, en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche.**

Clases	Edad (años)	Vigor	No. plagas y enfermedades	Brotación <sup>b</sup>	Severidad (%) <sup>c</sup>
0	2-4	Muerto	0	Número de brotes vegetativos	0
1	4-8	Malo	1-3	presentes en un cubo de	25
2	8-10	Bueno	4-8	50 cm <sup>3</sup> , en cuatro puntos	50
3	>10	Muy Bueno	>8	cardinales del dosel de los	75
4	NC	Excelente	NC	árboles	100

<sup>a</sup>NC: Clase no considerada; <sup>b</sup>Número de brotes vegetativos por punto cardinal evaluados con un cubo de 50x50x50 cm, del reciente periodo de brotación; <sup>c</sup>Porcentaje de copa con síntomas de HLB (Flores-Sánchez *et al.*, 2015).

HLB; BT= Baja tecnificación y AT= Alta tecnificación.

El índice de abundancia citrícola, un estimador de la abundancia relativa del hospedante a nivel de unidad espacial agrícola, en este caso se estimó por municipio asociado de los huertos evaluados. Se usó la siguiente ecuación:

$$IAC = \frac{Supcitri}{SupAgri} \quad [E.8]$$

**Dónde:** IAC= Índice de abundancia citrícola; *Supcitri*= Superficie citrícola sembrada del municipio; *SupAgri*= Superficie del municipio destinada a la producción de cultivos agrícolas.

Con el propósito de obtener un indicador de la población de *D. citri* y determinar su efecto en el estatus epidémico del HLB en las regiones evaluadas, se estimaron los grados días desarrollo (GDD) mediante el método del *seno simple* (Allen, 1976). El número de generaciones potenciales (NGP) se calculó dividiendo los GDD/ 211, el cual es una constante de los GDD necesarios para que *D. citri* complete una generación (Nava *et al.*, 2007). Los datos del promedio diario de temperatura se obtuvieron de la red de estaciones climáticas de la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA, 2015) distribuidas en México, durante el periodo 2005 al 2010; y se corrigieron por periodos de brotación por región citrícola y especie producida. Para corregir por periodos de brotación, se usaron los datos generados por esta investigación o se infirieron de Torres-Pacheco *et al.* (2013); Velázquez-Monreal *et al.* (2012); Lozano-Contreras y Jasso-Argumedo, (2012). Esta corrección se sustenta en estudios que sugieren que existe fenología apta para la colonización de DC, la cual no es constante durante todo el año (Tsai *et al.*, 2002; Liu and Tsai, 2000).

**Cuantificación de CLas en planta y vector.** Con el propósito de determinar la presencia y concentración de CLas en planta y vector. En cada huerto se colectaron muestras vegetales compuestas de ocho hojas por árbol, de los 20 árboles evaluados con el método "T"; y una muestra compuesta de adultos de DC. La cuantificación de CLas en planta y vector se obtuvo mediante la técnica PCR tiempo real. Inicialmente se realizó el aislamiento del ADN de tejido vegetal, con el método CTAB 2% (Doyle y Doyle, 1987) con buffer salino, para 100 mg de tejido vegetal. Para insectos, el ADN se extrajo con el kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA). La detección y cuantificación se realizó en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems®), con los primers HLBas (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBBr (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), y sonda (5'-AGA CGG GTG AGT AAC GCG-3') (Li *et al.*, 2006). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95 °C por 3min, 40 ciclos de 95 °C por 5 s; 59 °C por 40s y 59 °C por 35s. Para la cuantificación del número de copias genómicas de CLas en las muestras, se generó una curva de calibración externa. Se utilizó el fragmento del gen 16S rDNA clonado en un plásmido (PGEM-T® Promega®). El cual se purificó y cuantificó por uv-espectrofotometría (Nanodrop 1000) y se realizaron diluciones seriadas; éstas se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica base e=2.3132 para estimar la concentración de CLas (y) donde  $y = 41.95 (-3.373) * \ln(Ct) +$ , la cual se expresa en número de copias del gen 16S ADNr. Con el propósito de evitar variabilidad por la cantidad de ADN entre muestras, y para que estas fueran comparables, se realizó una dilución a 20 ng/μL.

**Análisis estadístico.** Se generó una matriz primaria de los valores promedio de cada variable por

huerto. Con el propósito de determinar a nivel exploratorio, la comparación entre entidades federativas con respecto a las variables de campo, se realizó un ANOVA y prueba de comparación de medias de dichas variables, por estado y municipio (Tukey,  $p < 0.05$ ). Las variables nominales se convirtieron a rangos mediante análisis no paramétrico con el procedimiento PROC RANK de SAS. Se generaron modelos de regresión múltiple por municipio citrícola para examinar la influencia de las variables del sistema epidemiológico en la cronicidad del HLB como indicador de la intensidad epidémica de esta enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 1993; Freud and Littell, 2000). Adicionalmente con la matriz primaria se realizó un análisis de componentes principales (ACP), de acuerdo con la metodología propuesta por Mora-Aguilera y Campbell (1997). Con esta metodología se busca reducir el número de variables a las más pertinentes, sin perder la capacidad explicatoria del conjunto de datos originales. Se eliminan variables con un peso relativamente alto de correlación (Hawkins y Fatti, 1984; Jolliffe, 2002). Inicialmente, se analizó la matriz de correlación del conjunto original de datos y la estructura de componentes principales (CPs), estimada con el procedimiento PROC PRINCOMP, para detectar el grado de colinearidad entre las variables. Mediante el ACP se determinó el número de CPs a seleccionar con el criterio de varianzas parciales altas ( $\lambda \geq 0.7$ ,  $\lambda = \text{eigenvalue}$ ) (Jolliffe, 2002) y el porcentaje acumulado de varianza total explicada por los CPs (70-90%). La selección preliminar de las variables asociadas a los CPs que se eligieron se hizo mediante el criterio de CPs mayores ( $\lambda \geq 0.7$ ) y menores ( $\lambda \leq 0.7$ ) analizando los eigenvectores de la matriz de correlación (Hawkins y Fatti, 1984). Las variables asociadas a CPs menores se eliminaron por correlacionarse con otras variables o por ser irrelevantes en la caracterización de la estructura de los datos. Posteriormente, se hizo la rotación de

CPs mediante el procedimiento PROC FACTOR seleccionando las variables con pesos absolutos altos asociadas a los factores (Mora-Aguilera y Campbell, 1997). Todos los análisis se realizaron en SAS® 9.0 (SAS Institute, 1900).

Para analizar el efecto de los factores integrados en la intensidad epidémica del HLB, por región citrícola, se generó un Índice Multivariado (IM) con los valores del análisis de factores obtenidos mediante el procedimiento PROC FACTOR de las variables que se seleccionaron a partir del análisis de CPs (Mora-Aguilera *et al.*, 2013), el cual se estimó con las siguientes ecuaciones:

$$IM = Ncp [(Factor1)(VpCp1) + \dots + (Factor - n)(VpCp - n)] \quad [E.9]$$

$$IndRel = 1/IndMulti \quad [E.10]$$

**Dónde:** *IM*: Índice multivariado; *NCPs*: Número de componentes principales; *VpCp*: Varianza proporcional del componente principal 1, ..., *n*.; *Factor 1*, *Factor 2*, *Factor n*: es el vector asociado al *Factor-i*. *IndRel*: Índice multivariado relativo a las regiones evaluadas.

El *IndRel* se utilizó para análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias (Tukey,  $p < 0.05$ ), por estado y municipio. El *IndRel* se empleó también para análisis geoestadísticos mediante mapas interpolados por entidad federativa, mediante el software ArcGis® 9.4 (ESRI, 2003) por el método de proyección geoestadística inverso de la distancia (IDW). Finalmente, con el propósito de determinar el efecto del comportamiento temporal del HLB en la intensidad epidémica, se ajustaron datos de incidencia (porcentaje de municipios con presencia de la enfermedad por

estado evaluado) y tiempo ( $t$ ) de detección (meses), mediante el modelo Weibull ( $y = 1 - \exp^{-(t/b)^c}$ ), el cual se utilizó con el método no derivativo DUD de PROC NLIN de SAS 9.4; donde  $y$  representa la incidencia del HLB,  $t$  es el tiempo,  $b$  es un estimador del parámetro de tasa en su forma inversa y  $c$  es el parámetro de forma de la curva (Pennypacker *et al.*, 1980; Mora-Aguilera *et al.*, 1996). El estimador de los parámetros  $b$ ,  $c$  y  $R^2$  se utilizaron para determinar el ajuste de los modelos. Adicionalmente, se estimó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) con la expresión:  $ABCPE = [\sum (y_i + y_{i+1})/2 dt_i]/n$ , donde  $y_i$  e  $y_{i+1}$  son los valores de incidencia del HLB y  $dt_i$  son los tiempos de detección (Shaner y Finney, 1977).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron 3940 árboles en 197 huertos comerciales de los cuales el 84% fue limón mexicano,

el 9% limón persa y el 7% naranja dulce, en 23 municipios citrícolas para determinar los factores determinantes en la inductividad de la intensidad epidémica del HLB en el Pacífico (PCO), que integró a Colima y Michoacán; y Península de Yucatán (PEN), con los estados de Yucatán, Q. Roo y Campeche. El HLB se encontró presente en 176 huertos del total evaluado, en Colima 35/35, con cronicidad promedio del 66% ( $\pm 16.7$ ); en Michoacán 131/132, con cronicidad promedio del 33.8% ( $\pm 30.7$ ); en Yucatán 6/15, con cronicidad promedio del 6.5% ( $\pm 18.4$ ); en Campeche 3/9, con cronicidad promedio del 1% ( $\pm 2.3$ ); y en Q. Roo 2/2, con cronicidad promedio del 25% ( $\pm 10.6$ ) y (Cuadro 2).

**Efectos por factor individual del sistema epidemiológico sobre la intensidad epidémica del HLB.** La región del Pacífico fue significativamente mayor que la Península de Yucatán, en cuanto a cronicidad (49.9%,  $\pm 31.8$ ), especie citrícola (165.1, moda= 111.0), vigor de árboles (119.1, moda=

**Cuadro 2. Promedio de valores por variable evaluada en 191 huertos de 17 municipios de mayor importancia citrícola en Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche.**

Variables	Pacífico		Península de Yucatán		
	Colima	Michoacán	Yucatán	Q. Roo	Campeche
<sup>a</sup> Especie	111.0 a	109.6 a	13.4 b	13.0 b	15.3 b
Superficie	10.8 a	11.4 a	4.9 a	2.5 a	2.8 a
<sup>a</sup> Edad	114.5 a	84.6 a	135.3 a	150.0 a	122.8 a
<sup>a</sup> Manejo	114.6 a	113.4 a	83.4 a	70.5 a	93.2 a
<sup>a</sup> Riego	120.4 a	85.2 a	146.1 a	62.5 a	105.4 a
Cronicidad	66.0 a	33.9 ab	7.8 b	25.0 b	0.29 b
<sup>a</sup> Vigor	148.2 a	89.8 ab	73.8 b	42.0 b	54.1 b
Brotos	23.8 a	19.5 ab	12.4 bc	7.4 c	5.8 c
<sup>a</sup> Plaga	176.0 a	77.7 b	75.9 b	108.3 b	105.7 b
CLas planta	10.6 a	7.0 ab	0.88 b	1.1 b	0.07 b
CLas vector	10.5 a	6.9 ab	0.56 b	0.4 b	0.01 b
NGP	19.6 a	15.5 b	10.9 c	12.0 bc	11.4 c
IACi	0.34 a	0.33 a	0.24 ab	0.005 b	0.03 b
IT	0.35 a	0.17 b	0.13 c	0.08 c	0.09 c

<sup>a</sup>Variables nominales convertidas a rangos con análisis no paramétrico mediante el procedimiento PROC RANK de SAS V9.4. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey,  $P < 0.05$ )

151.8), número de brotes (20.4, ±6.4), número de plagas (126.9, moda= 91.3), concentración de CLas en planta (7.7, ±6.9) y vector (7.7, ±7.6), número de generaciones potenciales (NGP) (16.4, ±3.4), índice de abundancia citrícola (IAC) (0.34, ±0.18) e índice de traspatio (IT) (0.21, ±0.10) ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 2; Figura 2E). En las variables superficie, edad de plantación, tipo de riego y manejo agronómico no se encontraron diferencias significativas entre regiones. Los valores más altos se encontraron en Colima y Michoacán. Los valores más bajos corresponden a Campeche (Cuadro 2).

En los huertos de estudio la cronicidad del HLB se correlacionó con la concentración de CLas en planta y vector y con el IT (Cuadro 3). La concentración de CLas en planta se correlacionó con CLas en el vector. La especie citrícola se correlacionó con el número de brotes y NGP. El nivel de manejo

agronómico se correlacionó con el tipo de riego. El IAC se correlacionó con el ICC. Todas las correlaciones tuvieron un efecto positivo entre variables (Cuadro 3). Adicionalmente, los modelos de regresión múltiple de la cronicidad del HLB como variable dependiente, indicaron que las variables del sistema epidemiológico que mejor predicen son: concentración de CLas en planta y vector, vigor, edad y brotación. Los modelos se generaron por municipio para reducir la variabilidad interregional dependiente del municipio (Cuadro 4). En el caso de PEN, los municipios con presencia de la enfermedad se ajustaron únicamente a la concentración de CLas (Cuadro 4).

La cronicidad del HLB está relacionada positivamente con la concentración de CLas en planta, lo cual previamente se sugirió a partir de un estudio parcelario (Flores-Sánchez *et al.*, 2015), con CLas

**Cuadro 3. Coeficientes de correlación y niveles de significancia de 15 variables descriptivas estimadas en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche.**

Variables	Superficie	Edad	Riego	Manejo	Vigor	Plaga	Brotos	Cron-HLB	CLas-Planta	CLas-Vector	NGP	IAC	IT	ICC
Especie	0.2	-0.2	-0.2	0.1	0.3	0.1	<b>0.6**</b>	0.4	0.3	0.3	<b>0.5**</b>	0.4	0.3	0.4
Sup		-0.1	0.2	0.3	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	-0.1	0.2	0.1
Edad			0.0	-0.1	-0.3	0.2	-0.2	-0.2	-0.2	-0.2	-0.1	0.0	0.1	-0.1
Riego				<b>0.7**</b>	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.2	0.0
Manejo					0.2	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	-0.1	0.2	0.0
Vigor						0.4	0.4	0.3	0.2	0.1	0.3	0.1	0.3	0.2
Plaga							0.2	0.4	0.3	0.2	0.3	-0.1	0.4	0.0
Brotos								0.4	0.3	0.3	0.4	0.3	0.4	0.4
Cron-HLB									<b>0.9**</b>	<b>0.8**</b>	0.2	0.0	<b>0.5**</b>	0.1
CLas-Planta										<b>0.9**</b>	0.1	0.0	0.3	0.1
CLas-Vector											0.1	0.0	0.3	0.1
NGP												0.2	0.4	0.3
IAC													0.4	<b>0.5**</b>
IT														0.3

Coeficientes de correlación de Pearson de 191 huertos:  $0.7 \leq r \leq 1.0$  representa correlación alta y  $0.5 \leq r \leq 0.7$  correlación media entre las variables evaluadas. Nivel de significancia ( $p$ -value) de la matriz de correlación de Pearson: \* $\alpha = 0.05$  y \*\* $\alpha = 0.001$ .

**Cuadro 4. Modelos de regresión múltiple de la cronicidad del HLB con las variables significativas del sistema epidemiológico, en 191 huertos de 17 municipios de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche.**

Estado/ Municipio	Modelo	<sup>a</sup> R <sup>2</sup>	<sup>b</sup> Pr>F	<sup>c</sup> VIF	<sup>d</sup> Cp
<b>Región Pacífico</b>					
<b>Colima</b>					
Tecomán	$y = 41.2 + 2.5_{CLasPlanta} + 0.1_{Vigor}$	0.94	0.01	1.3	12.8
Armería	$y = 72.1 + 1.4_{CLasPlanta} + 0.8_{CLasVector} - 0.1_{Edad}$	0.96	0.02	3.3	3.8
<b>Michoacán</b>					
Tepalcatepec	$y = -28.2 + 3.8_{CLasPlanta} + 0.94_{CLasVector} + 1.1_{Brotos}$	0.95	<0.05	4.7	4.9
Buenavista	$y = 2.6 + 2.5_{CLasPlanta} + 1.5_{CLasVector} + 0.1_{Vigor}$	0.97	<0.05	11.4	1.1
Aguililla	$y = 6.3 + 5.6_{CLasPlanta}$	0.89	0.01	1.0	12.8
Parácuaro	$y = 1.8 + 4.3_{CLasPlanta}$	0.96	<0.001	1.1	2.8
G. Zamora	$y = -0.7 + 4.06_{CLasPlanta}$	0.97	0.0002	1.0	1.1
Apatzingán	$y = -2.8 + 3.4_{CLasPlanta} + 0.1_{Vigor} + 1.3_{CLasVector}$	0.88	<0.05	3.1	1.3
Múgica	$y = 17.6 + 3.1_{CLasPlanta} - 0.1_{Edad}$	0.89	<0.001	1.14	8.3
La Huacana	$y = 0.6 + 13.2_{CLasPlanta}$	0.84	<0.001	1.0	-1.5
<b>Región Península de Yucatán</b>					
<b>Yucatán</b>					
Tizimín	$y = -1.73 + 9.16_{CLasPlanta}$	0.96	0.05	1.0	4.3
<b>Q. Roo</b>					
O. P. Blanco	$y = 3.1 + 0.03_{CLasPlanta}$	0.99	<0.0001	1.5	1.2
<b>Campeche</b>					
Campeche	$y = 0.05 + 25_{CLasVector}$	0.86	0.002	3.7	1.3

<sup>a</sup>r<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación. <sup>b</sup>Pr>F: Significancia del modelo. <sup>c</sup>VIF: Factor de inflación de la varianza.

<sup>d</sup>Cp: Cp de Mallow.

en vector, brotación y vigor; adicionalmente, se correlacionó negativamente con la edad (Cuadro 4). Estas variables del hospedante indican que la cronicidad del HLB depende de la disponibilidad de tejido; sin embargo, varían por región citrícola. Esto sugiere que la visión parcelaria y análisis univariado dificulta explicar el proceso epidémico del HLB en su forma integral, por lo que se requiere complementar con un enfoque regional multivariado (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a).

#### **Análisis temporal del comportamiento del HLB.**

En cuanto al comportamiento temporal del HLB, considerando el municipio como la unidad espacial de incidencia regional, se encontró que en PCO, el HLB tuvo una dispersión más rápida y con mayor

intensidad debido a que los parámetros de tasa de infección aparente ( $1/b=0.07$ ), forma de la curva ( $c=1.26$ ), incidencia final ( $Y_f=100$ ) y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABC-PE=31.05) fueron mayores a los encontrados en la región PEN ( $1/b=0.02$ ;  $c=1.45$ ;  $Y_f=52.3$ ; ABC-PE=14.4) (Cuadro 5, Figura 1). Previamente, se demostró la aplicabilidad del modelo Weibull, por su flexibilidad para describir una epidemia temporal integrada a nivel regional (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). Adicionalmente, estos resultados corroboran la factibilidad de estimar un modelo temporal cuando el proceso de contagio y dispersión tiene fuerte influencia de inóculo primario, condición válida para un patógeno en fase de incursión y establecimiento regional. Previamente, se mostró

**Cuadro 5. Parámetros del comportamiento temporal de la incidencia del HLB ajustados con el modelo Weibull ( $1 - \exp(-t/b)^c$ ).**

Región/ Estado	Parámetros temporales						
	1/b	c	r <sup>2</sup>	Pr>F	Y <sub>0</sub>	Y <sub>f</sub>	ABCPE
<b>Región Pacífico</b>							
Colima	0.09	1.41	0.99	<0.0001	10	100	35.3
Michoacán	0.05	1.11	0.92	<0.0001	20	100	26.8
Promedio	0.07	1.26	0.95	<0.0001	15	100	31.05
<b>Península de Yucatán</b>							
Yucatán	0.02	1.35	0.94	<0.0001	3.5	48.8	11.5
Q. Roo	0.02	0.20	0.84	<0.0001	37.5	62.5	24.6
Campeche	0.02	2.80	0.88	<0.0001	9.1	45.5	7.2
Promedio	0.02	1.45	0.88	<0.0001	16.6	52.3	14.4

1/b: Parámetro de tasa de infección aparente en forma inversa; c: Parámetro de forma de la curva; r<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación; Pr>F: Significancia del modelo; Y<sub>0</sub> y Y<sub>f</sub>: Incidencia inicial y final de municipios con HLB por estado; ABCPE: Parámetro de Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad.

también que la forma epidémica a nivel regional (estatal) es de tipo monomolecular (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). Las curvas epidémicas del HLB en México, confirman esta tendencia en particular en donde la epidemia progresa principalmente a nivel parcelario en comparación con traspatios (Figura 2E), en los cuales se observan asíntotas, posiblemente por contagio limitado por la ocurrencia de cítricos mezclados con otras especies frutícolas y arbóreas como fue el caso de Yucatán, Campeche y Quintana Roo.

**Efecto multifactorial del sistema epidemiológico sobre la intensidad epidémica del HLB.** A partir del análisis de componentes principales (CPA) se seleccionaron cuatro componentes que explican el 90% de la varianza acumulada (36, 20, 17 y 16 %). Las variables asociadas a estos componentes fueron: edad de plantas, nivel de manejo agronómico de los huertos, concentración de CLas en planta, NGP y número de brotes, con distinto peso según el componente. El índice multivariado (IM) se generó a partir de tres factores, los cuales explicaron el 90% de la varianza total. El IM fue significati-

vamente mayor en la región PCO, en Colima fue IM=0.01 (Figura 2A) y en Michoacán IM=0.005 (Figura 2B), en comparación con PEN, en la cual Campeche y Yucatán (Figura 2C) tuvieron el menor con IM=0.0004 y Q. Roo IM=0.0007 ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 6).

A nivel de municipio, se clasificaron tres grupos con base en la intensidad epidémica representada por el IM promedio (Cuadro 6): 1) Tecomán y Armería, Colima; Aguililla, Tepalcatepec, Buenavista y Apatzingán, Michoacán (IM =0.008) (Figura 2A y 2B); 2) Parácuaro, Múgica y Gabriel Zamora, Michoacán; Tizimín, Dzan y Oxkutzcab, Yucatán (IM =0.001) (Figura 2B y 2C); 3) O. P. Blanco, Q. Roo; La Huacana, Michoacán; Campeche, Carmen, Candelaria y Escárcega, Campeche; Espita, Muna, Ticul y Kinchil, Yucatán (IM =0.0004) ( $p < 0.05$ ) (Figura 2B y 2C).

El enfoque regional consiste en maximizar la variabilidad de los subsistemas del sistema epidemiológico con el propósito de entender la inductividad epidémica bajo la premisa que existe una heterogeneidad inductiva a nivel regional que puede ser entendida a través del análisis del sistema epi-

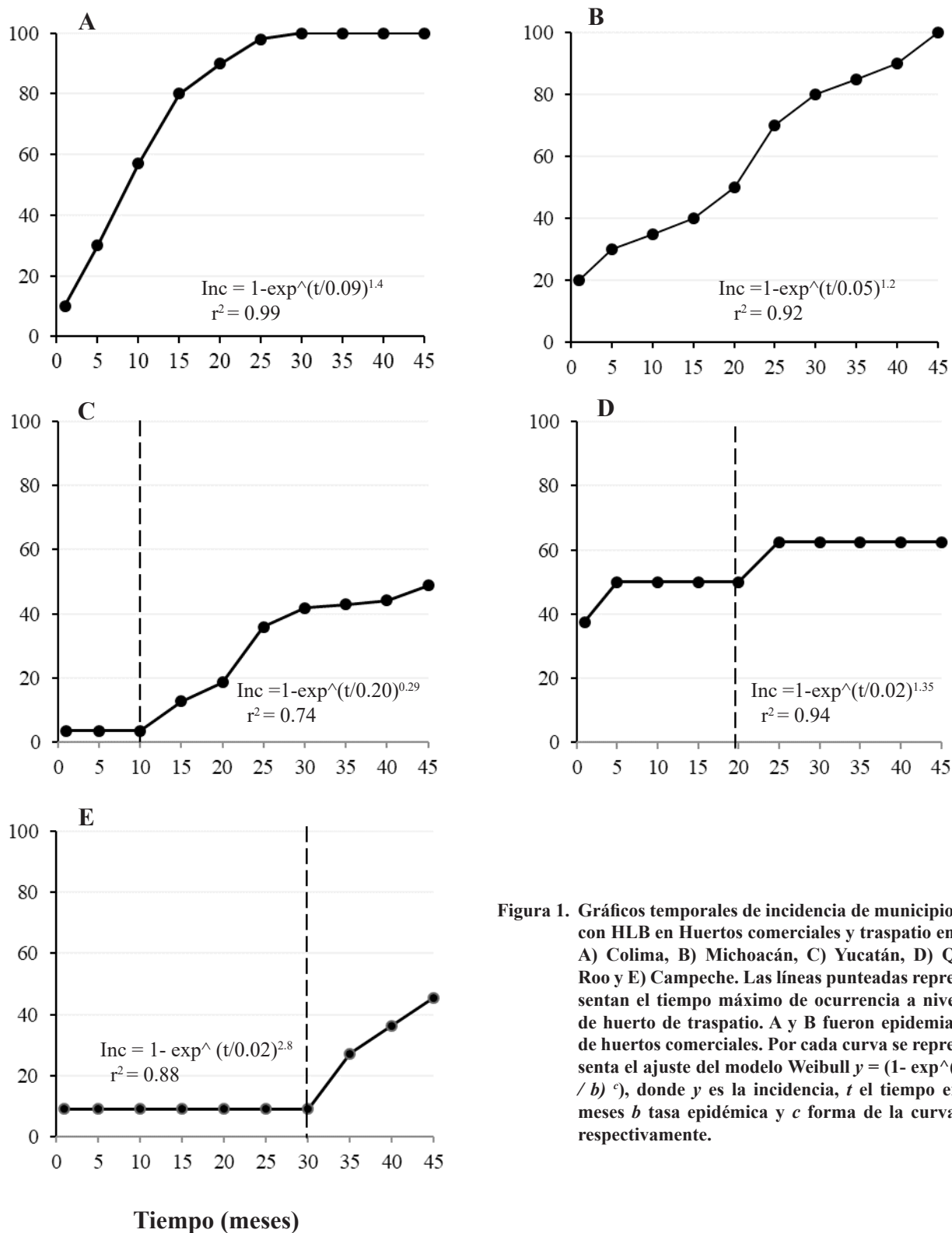
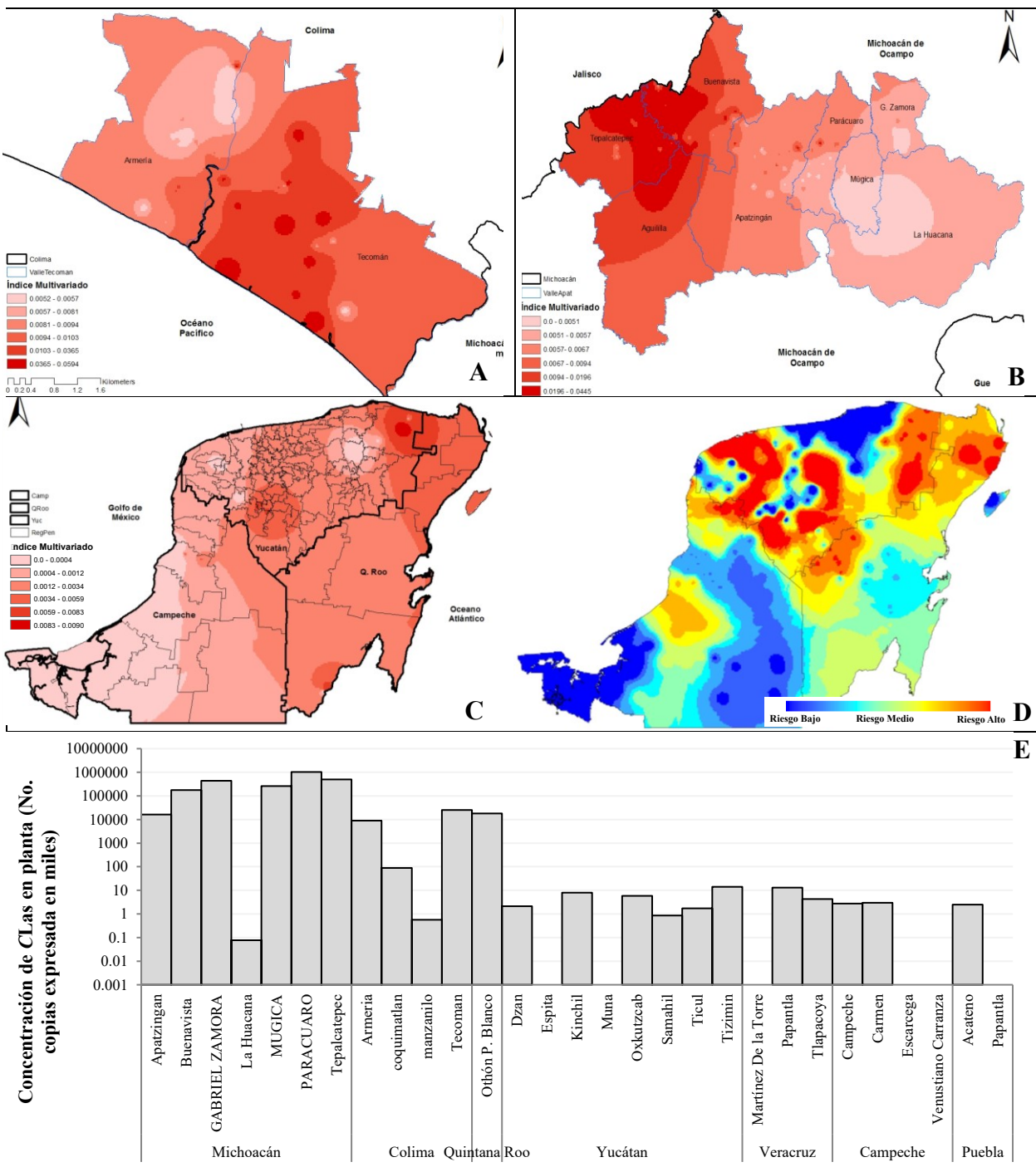


Figura 1. Gráficos temporales de incidencia de municipios con HLB en Huertos comerciales y traspatio en: A) Colima, B) Michoacán, C) Yucatán, D) Q. Roo y E) Campeche. Las líneas punteadas representan el tiempo máximo de ocurrencia a nivel de huerto de traspatio. A y B fueron epidemias de huertos comerciales. Por cada curva se representa el ajuste del modelo Weibull  $y = (1 - \exp^{-(t/b)^c})$ , donde  $y$  es la incidencia,  $t$  el tiempo en meses  $b$  tasa epidémica y  $c$  forma de la curva, respectivamente.





**Figura 2.** Regionalización de la intensidad epidémica del HLB mediante el índice multivariado (IM) obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables del hospedante, patógeno, vector y manejo. La escala denota el valor de IM y color rojo intenso indica mayor inductividad e intensidad epidémica. A) IM de 35 huertos de Tecomán y Armería, Colima. B) IM de 133 huertos de los municipios de mayor importancia citrícola en Michoacán. C) IM de 30 huertos de los municipios de mayor importancia citrícola de la Península de Yucatán. D) Cálculo de índice de traspatio [E.5] para región Península de Yucatán. E) Concentración de CLAs en planta en municipios del Pacífico y Península de Yucatán. Se incluyen Veracruz y Puebla de región Centro-Golfo con fines comparativos.

**Cuadro 6. Índice multivariado obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables del hospedante, patógeno, vector y manejo evaluadas en 191 huertos de los 17 municipios de mayor importancia citrícola de los estados de Colima, Michoacán, Yucatán, Q. Roo y Campeche.**

Estado	Municipio	Huertos <sup>a</sup>	Árboles <sup>b</sup>	IM <sup>c</sup>
Colima	Tecomán	17	340	0.01 a
	Armería	18	360	0.009 ab
Michoacán	Aguililla	5	100	0.012 a
	Tepalcatepec	20	400	0.005 b
	Buenavista	27	540	0.004 b
	Apatzingán	30	600	0.01 a
	Parácuaro	13	260	0.003 bc
	Múgica	19	380	0.003 bc
	G. Zamora	6	120	0.001 c
	La Huacana	12	240	0.005 b
Yucatán	Tizimín	3	60	0.0003 d
	Dzan	3	60	0.0003 d
	Oxkutzcab	3	60	0.0008 e
	Ticul	3	60	0.0002 d
	Kinchil	3	60	0.0003 d
Q. Roo	O. P. Blanco	2	40	0.0007 e
Campeche	Campeche	7	140	0.0004 d
	Escárcega	2	40	0.0004 d
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>193</b>	<b>3860</b>	<b>1.14</b>

<sup>a,b</sup>Huertos-Árboles= Número de huertos y árboles evaluados por municipio citrícola; <sup>c</sup>Índice Multivariado promedio por municipio, obtenido a partir de tres factores principales asociados a cinco variables. Los municipios faltantes no se consideraron en este análisis por tener un solo huerto evaluado. Valores con al menos una letra diferente indican diferencias significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ).

demiológico. En el entendimiento de la intensidad regional del HLB se incluyó: especies citrícolas, edad promedio de plantas, nivel de tecnificación de los huertos, densidad de plantación, entre otros; mientras que el enfoque parcelario mantiene los factores controlados, y solo permite que se exprese la variable de interés con el propósito de evidenciar su efecto de manera individual. Este último enfoque es restrictivo y a menudo los autores señalan que los resultados solo se aplican bajo las condiciones de estudio (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). En HLB, existen algunos estudios como el desarrollado por

Bassanezi *et al.* (2013a) quienes demostraron que el control regional de *Diaphorina citri* (DC), permite reducir la incidencia de esta enfermedad hasta el 75%, requiere programas menos intensivos de control local del vector, y reduce los costos de manejo del HLB, porque las aplicaciones son menos intensivas y más eficientes. Esta propuesta considera al insecto como plaga y vector, y se basa en que a mayor área bajo control mayor será el efecto de reducción en la población de insectos (Hendrichs *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2013a; Rogers *et al.*, 2011). No obstante, en estudios epidemio-

lógicos para HLB como enfermedad de ocurrencia regional, donde el objetivo debe ser la población de plantas, se requiere considerar otros factores asociados al hospedante, patógeno, insecto-vector y manejo agronómico para definir riesgos con una visión preventiva e integral (Mora-Aguilera *et al.*, 2013, 2014a, 2014b).

El enfoque multivariado de este trabajo permitió establecer que las diferencias entre la región del PCO y PEN se asocian principalmente al subsistema hospedante con las variables: especie citrícola, edad de plantas e IAC; al subsistema manejo con: tipo de riego y manejo agronómico; y al subsistema patógeno con: cronicidad del HLB, concentración de CLas en planta y vector. Las variables del hospedante tienen en común la disponibilidad de tejido para la colonización de DC y para potencializar la infección y dispersión de CLas. Estudios previos han mostrado la importancia del efecto del hospedante (Hall *et al.*, 2013; Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Liu and Tsai, 2000; Pluke *et al.*, 2008). En este estudio se encontró que la disponibilidad de tejido y el NGP fue mayor en la región PCO (Cuadro 2), lo que coincide con lo reportado previamente en estudios del potencial de distribución de DC en México (Díaz-Padilla *et al.*, 2014; Torres-Pacheco *et al.*, 2013).

Diversos autores señalan que la brotación es el factor más importante para la abundancia de este vector con preferencia a frecuencia y calidad del brote (brotes pequeños u hojas tiernas recién expandidas) (Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Liu and Tsai, 2000; Pluke *et al.*, 2008; Medina *et al.*, 2007). En la región PCO el IAC fue mayor al de PEN, con presencia de las especies citrícolas limón mexicano y limón persa; las cuales, además por sus características fenológicas presentan brotes vegetativos durante todo el año, lo que garantiza la disponibilidad de alimento y sitios de oviposición de DC. La combinación de un índice de abundancia citrícola y

fenología apta para la colonización puede explicar las mayores poblaciones de DC (Tsai *et al.*, 2002; Liu and Tsai, 2000) y por lo tanto de NGP más altos. Por lo que las poblaciones son mayores (Robles-González *et al.*, 2014; Miranda-Salcedo y López-Arrollo, 2011; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). En la región PEN la especie de mayor abundancia es naranja dulce, la cual tiene dos ventanas de brotación vegetativa de enero a marzo y julio a octubre (Torres-Pacheco *et al.*, 2013; Lozano-Contreras y Jasso-Argumedo, 2012; Domínguez-Monge, 2011; Flores-Sánchez, 2011), por lo que la disponibilidad de tejido para DC es menor. Adicionalmente, el IAC es en promedio 50% menor en PEN, lo cual reduce procesos de colonización. Otros factores que tienen efecto sobre la densidad poblacional de DC, se relacionan con el manejo de la poda y edad de las plantaciones; la poda promueve la brotación (Robles-González *et al.*, 2014; Stuchi and Girardi, 2010; Davis and Albrigo, 1994) y favorece la abundancia del vector (Hall *et al.*, 2013; Ortega-Arenas *et al.*, 2013; Torres-Pacheco *et al.*, 2013; Lozano-Contreras y Jasso-Argumedo, 2012; Miranda-Salcedo y López-Arrollo, 2011; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). Estos factores se consideraron en esta investigación mediante las variables del subsistema manejo, al considerar que el nivel de manejo agronómico alto y riego por microaspersión inducen mayor crecimiento y brotación vegetativa en las plantas.

Respecto al subsistema patógeno las variables relacionadas fueron cronicidad del HLB y concentración de CLas en planta y vector, las cuales fueron mayores en la región PCO y en las especies ácidas limón mexicano y limón persa en comparación con naranja dulce (Figura 2E). Esta información coincide con el reporte que señala que CLas induce síntomas foliares e histológicos de mayor intensidad en las especies ácidas (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Aparentemente, la baja carga de inóculo de

CLas en la región PEN podría asociarse a la reducción de inóculo primario o erradicación de plantas enfermas, principalmente en huertos de traspatio (SENASICA, 2010) y a la amplia distancia entre las zonas cítricas (SIAP, 2015) (Figura 2E), que en combinación con un IAC bajo puede afectar los procesos de reinfección y el potencial de dispersión de DC en comparación con la región PCO (Figura 2E). En esta región la erradicación de plantas no fue posible debido a que el umbral económico se superó rápidamente (Belasque *et al.*, 2009; Robles-González *et al.*, 2013). Lo anterior se comprobó mediante el análisis del comportamiento temporal de esta enfermedad entre las regiones de estudio, en el cual se encontró que, en PEN, CLas se dispersó con menor velocidad e intensidad, con una incidencia promedio actual de estados con presencia de CLas del 52%, en comparación con PCO, en donde esta enfermedad se dispersó con mayor velocidad e intensidad y en donde la incidencia promedio actual de estados es del 100% (Cuadro 5).

Bassanezi *et al.* (2013b) reportaron que para las condiciones de San Pablo, Brasil, la erradicación de plantas con HLB fue ineficiente en el progreso de la enfermedad a nivel parcelario, y explicaron que infecciones primarias tienen mayor impacto que infecciones secundarias, en parcelas experimentales con tamaño pequeño (0.8 a 2.9 ha) y forma estrecha, por la alta capacidad de dispersión del vector entre huertos; y a fuertes programas de control del vector en las parcelas. Sin embargo, bajo las condiciones de la región PEN, en donde prevalece un proceso epidémico del HLB con menor intensidad debido a la baja carga de inóculo de CLas en planta y vector; a la baja disponibilidad de tejidos de colonización principalmente en naranja dulce, y menor NGP (Cuadro 2), es necesario mantener la eliminación de plantas enfermas por debajo de un umbral de endemicidad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). El gobierno de México, inició desde 2009 un Protocolo

de Actuación operado por los organismos auxiliares de sanidad vegetal (Salcedo-Baca *et al.*, 2012). Las acciones de erradicación continúan al presente, así como la liberación del parasitoide *Tamarixia radiata*. Adicionalmente, se ha demostrado la presencia natural de entomopatógenos (Cortez-Madrugal *et al.*, 2014). Todo esto puede explicar que a pesar de ser el punto de ingreso de CLas a México, la región no ha sido vulnerada productivamente. Mientras que en la región del PCO, la condición de endemicidad y cronicidad actual y con base en los estudios complementarios a este, se considera que la erradicación es una opción inviable, y que con acciones de manejo integrado del cultivo existe la posibilidad de mantener la sustentabilidad y rentabilidad de la actividad cítrica. Actualmente, la opción de manejo son las Áreas Regionales de Control de DC (ARCOs), la cual es una estrategia del gobierno Mexicano que se basa en que el control regional de DC con base en los estudios de manejo regional vs control local de San Pablo, Brasil (Bassanezi *et al.*, 2013) y en las CHMAs de Florida (Rogers *et al.*, 2011). Las ARCOs en México se desarrollaron bajo fundamentos epidemiológicos de riesgo y potencial de dispersión (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b) y consisten en el manejo del HLB mediante el control regional de DC mediante ingredientes químicos y agentes de control biológico (SENASICA, 2012).

## CONCLUSIONES

La presente investigación constituye el primer reporte sobre la aplicación del enfoque regional para determinar los factores involucrados en la caracterización de la intensidad epidémica del HLB, enfermedad inducida por CLas. El presente estudio comparó y parametrizó las dos regiones cítricas donde el HLB muestra una condición epidémica activa. La incidencia de la enfermedad fue en 176

huertos del total, en Colima 35, con cronicidad promedio del 66% ( $\pm 16.7$ ); en Michoacán 131, con cronicidad promedio del 33.8% ( $\pm 30.7$ ); en Yucatán 6, con cronicidad promedio del 6.5% ( $\pm 18.4$ ); en Campeche 3, con cronicidad promedio del 1% ( $\pm 2.3$ ); y en Q. Roo 2, con cronicidad promedio del 25% ( $\pm 10.6$ ). Lo cual demuestra que la región del Pacífico (PCO) es la más vulnerable. La cronicidad de infecciones de CLas se relacionó con la concentración de CLas en planta y vector, especie citrícola, brotación, vigor, edad, superficie de huertos, los cuales varían por región citrícola. La integración mediante un enfoque de análisis estadístico multivariado permitió una mejor caracterización regional.

#### AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por becas otorgadas; A SENASICA-DGSV por el financiamiento. Al CESAVECOL y CESVY por el apoyo logístico en campo. Al equipo CP-LANREF por el soporte logístico y operativo. A Pedro Robles García del SENASICA por su apoyo decidido a la investigación en HLB.

#### LITERATURA CITADA

- Allen JC. 1976. A modified sine wave method for calculating degree days. *Environmental Entomology* 5: 388-396. <https://academic.oup.com/ee/article-abstract/5/3/388/2395585>
- Aubert B, Sabine A, Geslin P and Picardi L. 1984. Epidemiology of the greening disease in Reunion Island before and after the biological control of the African and Asian citrus psyllas. *Proc. International Society Citriculture* 1: 440-442. <https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/00000389.pdf>
- Bassanezi RB, Belasque Jr J, Montesino LH. 2013b. Frequency of symptomatic trees removal in small citrus blocks on citrus huanglongbing epidemics. *Crop Protection* 52: 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.012>
- Bassanezi RB, Bergamin-Filho A, Amorim Land Gottwald TR. 2006. Epidemiology of huanglongbing in Sao Paulo. *Proc. Huanglongbing Green. Int. Workshop* p. 37. Ribeirao Preto Braz. Araraquara Braz. Fundecitrus 8.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Gimenes-Fernandes N, Yamamoto PT, Gottwald TR, Amorim L, Bergamin Filho A. 2013a. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0314-RE>
- Belasque JJ, Filho BA, Bassanezi BR, Barbosa JC, Fernandes GN, Yamamoto TP, Lopes AS, Machado MA, Pereira Leite JR, Ayres J, A and Massari CA. 2009. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB Greening) visando o controle efetivo da doença. *Tropical Plant Pathology* 34(3): 137-145. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762009000300001>
- Bové JM. 2012. Huanglongbing and the future of citrus in Sao Paulo State, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 94 (3): 465-467. <https://www.jstor.org/stable/45156274>
- Bové MJ. 2006. Huanglongbing: a destructive newly-emerging century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*: 88: 7-37. <https://www.jstor.org/stable/41998278>
- Cabrera-Hidalgo A, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Rebollar-Alviter A y Marbán-Mendoza N. 2014. Ocurrencia de *Nacobus aberrans* en Cultivos Hortícolas del Noroeste de Michoacán, México. *Nematropica* 44: 107-117.
- Campbell CL and Madden LV. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. New York, USA. John Wiley & Sons Inc. 532 pp.
- Comisión Nacional del Agua-Servicio Meteorológico Nacional (CONAGUA-SMN). 2015. Normales climatológicas por estación. [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=42&Itemid=75](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75)
- Coria-Contreras JJ, Mora-Aguilera G, Yañez-Morales MJ, Acevedo-Sánchez G, Santana-Peñaloza B, Mendoza-Ramos C, Jiménez-González L, Martínez-Bustamante VI, García-Martínez DC and Rubio-Cortés R. 2019. Applied regional epidemiology to inductive characterization and forecasting of blue agave gray spot (*Cercospora agavicola*) in Jalisco, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(1): 71-94. <http://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1809-4>
- Cortez-Madriral H, Sánchez-Saavedra JM, Díaz-Godínez G and Mora-Aguilera G. 2014. Enzymatic Activity and Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi from Central and Southeastern Mexico to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Southwestern Entomologist* 39(3): 491-502. <http://dx.doi.org/10.3958/059.039.0310>
- Da Graca JV. 1991. Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology* 29: 109-136. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.29.090191.000545>
- Davies FS and Albrigo LG. 1994. Citrus. Wallingford: CAB International. 254p. [https://www.scrip.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgict55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1950736](https://www.scrip.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgict55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1950736)
- Díaz-Padilla G, López-Arroyo JI, Sánchez-Cohen I, Guajardo-Panes RA, Mora-Aguilera G y Quijano-Carranza JA. 2014. Áreas de abundancia potencial en México del vector de CLas *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(7): 1137-1153. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263131533001>
- Domínguez-Monge S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Texcoco Edo. de México. 63 p. <http://hdl.handle.net/10521/527>

- Doyle JJ. and Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15. [https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350\\_Readings/Doyle\\_plantDNAextractCTAB\\_1987.pdf](https://webpages.charlotte.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf)
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzani-lla-Ramírez MA, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8):769-782. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952012000800003&script=sci\\_abstract](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952012000800003&script=sci_abstract)
- ESRI 2003. ArcGIS 9: Using ArcGIS Geostatistical Analyst. ESRI Press Redlands CA. [http://downloads2.esri.com/support/documentation/ao\\_/Using\\_ArcGIS\\_Geostatistical\\_Analyst.pdf](http://downloads2.esri.com/support/documentation/ao_/Using_ArcGIS_Geostatistical_Analyst.pdf)
- Flores-Sánchez J, Mora-Aguilera G, Velázquez-Monreal JJ, López-Arroyo JI, Loeza-Kuk E, Hernández R, Domínguez-Monge S y Acevedo-Sánchez G. 2012. Caracterización epidemiológica del HLB en Colima con énfasis en el subsistema manejo. *In* Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. p: 61-62. 9-11 Diciembre. Veracruz México.
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G, López-Arroyo JI y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>
- Flores-Sánchez JL. 2011. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing de los cítricos (HLB) en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco Edo. de México. 68 p. <http://hdl.handle.net/10521/599>
- Freud RJ and Lettel RC. 2000. SAS System for regression. Third edition. SAS. Institute Cary NC. 245 p.
- Gottwald T, Luo W, Riley T and Parnell S. 2014a. Commercial risk-based survey for HLB and implications for efficacy of Citrus Health Management Areas (CHMAs). *Journal of Citrus Pathology* 1: 110-111. <https://doi.org/10.5070/C411024819>
- Gottwald T, Luo W, Riley T and Parnell S. 2014b. Edge effect and Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology* 1: 126-127. <https://doi.org/10.5070/C411024824>
- Gottwald TR, Aubert B and Zhao XY. 1989. Preliminary analysis of citrus greening (Huanglongbing) epidemics in the People's Republic of China and French Reunion Island. *Phytopathology* 79: 687-93. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1989Articles/Phyto79n06\\_687.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1989Articles/Phyto79n06_687.PDF)
- Gottwald TR, Bergamin-Filho A, Bassanezi RB, Amorim L and Irey M. 2006. Concepts in Huanglongbing epidemiology. *Proc. Intl. Workshop Prev. Citrus Green. Dis. Sev. Infect. Areas* pp. 1-10. Tokyo: Int. Res. Div, Agric. For. Fish. Res. Coun. Sec, Minist. Agric, For. Fish.
- Gottwald TR. 2010. Current epidemiological understanding of Citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48:119-139. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-073009-114418>
- Hall DG, Richardson ML, Ammar E-D and Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* vector of citrus Huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 146: 207-223. <https://doi.org/10.1111/eea.12025>
- Hawkins DM and Fatti LP. 1984. Exploring multivariate data using the minor principal components. *Statistician* 33: 325-338. <https://www.jstor.org/stable/2987737>
- Hendrichs J, Kenmore P, Robinson AS and Vreysen MJB. 2007. Area-wide integrate pest management (AW-IPM): Principles Practice and Prospects. Pp: 3-33 *In* Vreysen MJB, Robinson AS and Hendrichs J. (eds.). Area-wide control of insects pest. Springer. Vienna Austria. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5_1)
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative Real-Time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Liu YH and Tsai JH. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Annals of Applied Biology* 137:201-206. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2000.tb00060.x>
- López-Bautista V, Mora-Aguilera G, Gutiérrez-Espinosa MA, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, Coria-Contreras JJ, Acevedo-Sánchez G and Santana-Peñaloza B. 2020. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated to the regional occurrence of wilt and dry bud rot in *Agave tequilana*. *Mexican Journal of Phytopathology* 38(1): 79-106. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1911-4>
- Lozano-Contreras MG y Jasso-Argumedo J. 2012. Identificación de enemigos naturales de *Diaphorina citri* KUWYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) en el estado de Yucatán México. *Fitosanidad* 16: 5-11. <https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/00002975.pdf>
- Madden LV. 1983. Measuring and modelling crop losses at the field level. *Phytopathology* 73: 1591-1596. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n11\\_1591.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1983Articles/Phyto73n11_1591.PDF)
- Medina UM, Zapiain EG, Robles GMM, Pérez ZO, Orozco SM, Williams T and Becerra SR. 2007. Fenología eficiencia productiva y calidad de fruta de cultivares de naranjo en el trópico seco de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30:133-143. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/30-2/4r.pdf>
- Mendoza-Ramos C, Mora-Aguilera G, Coria-Contreras JJ, Santana-Peñaloza B, Acevedo-Sánchez G, Martínez-Bustamante V, Gutiérrez-Espinosa MA and Rubio-Cortés R. 2021. *Fusarium* spp. and inoculum load estimation asso-

- ciated to commercial *Agave tequilana* offsets at different regional epidemic inductivity levels. Mexican Journal of Phytopathology 39(1): 94-121. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2006-8>
- Miranda-Salcedo MA y López-Arroyo JI. 2011. Avances de investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos *Diaphorina citri* KUWAYAMA en Michoacán México. Pp: 149-155 *In* Memorias del 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. 9-11 Diciembre. Texcoco Edo. de México.
- Mora-Aguilera G and Campbell CL. 1997. Multivariate techniques for selection of epidemiological variables. Pp 51-58 *In* L. Franci and D. A. Neher (eds.) Exercises in Plant Disease Epidemiology. St. Paul MN: American Phytopathological Society.
- Mora-Aguilera G, Acevedo G, Flores J, Domínguez S, Coria J, Hernandez A, González R, López A, Sánchez H, Feria J, Trujillo J, López E, Méndez A, Matuz J and Martínez M. 2014c. Epidemiological Surveillance System for Coffee Rust Disease (*Hemileia vastatrix*) in Mexico: a Regional Approach. Pp: 42-47 *In*: The 25<sup>th</sup> International Conference on Coffee Science. September 8-14. Armenia Colombia. [https://www.researchgate.net/publication/301204067\\_Epidemiological\\_Surveillance\\_System\\_for\\_Coffee\\_Rust\\_Disease\\_Hemileia\\_vastatrix\\_in\\_Mexico\\_A\\_Regional\\_Approach](https://www.researchgate.net/publication/301204067_Epidemiological_Surveillance_System_for_Coffee_Rust_Disease_Hemileia_vastatrix_in_Mexico_A_Regional_Approach)
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Sánchez J, González-Gomez R. and Robles-García P. 2013. Applied epidemiology to plant disease risk analyses. Pp: 27-29 *In* Proceedings IV Brazilian Workshop of Plant Disease Epidemiology. Curitiba. Brasil. Dec. 2-4.
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Flores-Sánchez J, Hernández R, González-Gómez R and Robles-García P. 2014a. Regional Epidemiology: A new frontier and challenge in plant pathology. Pp: 6 *In*: 47° Congreso Brasileiro de Fitopatología. Del 17 al 22 de Agosto. Londrina Paraná. Brasil. [https://www.researchgate.net/publication/301204091\\_Regional\\_Epidemiology\\_A\\_new\\_frontier\\_and\\_challenge\\_in\\_plant\\_pathology](https://www.researchgate.net/publication/301204091_Regional_Epidemiology_A_new_frontier_and_challenge_in_plant_pathology)
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado O, Coria-Contreras J, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante V, López-Buenfil A, González-Gómez R y Javier-López M. 2021. Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease. Mexican Journal Phytopathology 39(3): 452-492. <http://dx.doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-6>
- Mora-Aguilera G, Nieto-Angel D, Cambell CL, Téliz D and García E. 1996. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. Phytopathology 86: 70-78. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01\\_70.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01_70.PDF)
- Mora-Aguilera G, Nieto-Angel D, Téliz-Ortíz D and Campbell CL. 1993. Development of a prediction model for Papaya Ringspot in Veracruz Mexico. Plant Disease 77: 1205-1211. [https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1993Articles/PlantDisease77n12\\_1205.PDF](https://www.apsnet.org/publications/plantdisease/backissues/Documents/1993Articles/PlantDisease77n12_1205.PDF)
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo J. I, Velázquez Monreal J, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S y González-Gómez R. 2014b. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 108-119. [https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2\\_03.pdf](https://www.smf.org.mx/rmf/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf)
- Nava DE, Torres MLG, Rodrigues MDL, Bento JMS y Parrá JRP. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem, Psyllidae) on different hosts and at different temperatures. Journal of Applied Entomology 131: 709-715. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2007.01230.x>
- Ortega-Arenas LD, Villegas-Monter A, Ramírez-Reyes AJ y Mendoza-García E. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazones Veracruz México. Acta Zoológica Mexicana 29(2): 317-333. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0065-17372013000200005&script=sci\\_abstracthttp://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57527864005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0065-17372013000200005&script=sci_abstracthttp://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57527864005)
- Parnell S, Gottwald TR, Gilks WR and den Bosch FV. 2012. Estimating the incidence of an epidemic when it is first discovered and the design of early detection monitoring. Journal of Theoretical Biology 305: 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.03.009>
- Pennypacker SP, Knoble H D, Antle CE and Madden LV. 1980. A flexible model for studying plant disease progression. Phytopathology 70: 232-235. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n03\\_232.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n03_232.PDF)
- Pluke RWH, Qureshi JA and Stansly PA. 2008. Citrus flushing patterns *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) populations and parasitism by *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae) in Puerto Rico. Florida Entomologist 91: 36-42. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2008\)091\[0036:CFPDCH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2008)091[0036:CFPDCH]2.0.CO;2)
- Robles GP. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>.
- Robles-González MM, Medina-Urrutia VM y Manzanilla-Ramírez MA. 2014. Fenología y Poda. Pp: 135-154 *In*: El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). Orozco-Santos M, Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA y Bermúdez-Guzmán M. (eds.). SAGARPA INIFAP CIRPAC. Colima México.
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI y Flores-Virgen R. 2013. Síntomas del huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1): 15-31. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60926253002>
- Rogers ME, Stansly PA and Stelinski LL. 2011. Citrus Health Management Areas (CHMA's): Developing a Psyllid Management Plan. University of Florida IFAS Extension Gai-

- nesville FL. 2 p. [https://crec.ifas.ufl.edu/media/crecifasufledu/faculty/rogers/IRCS-1\\_20\\_11\\_Rogers.pdf](https://crec.ifas.ufl.edu/media/crecifasufledu/faculty/rogers/IRCS-1_20_11_Rogers.pdf)
- Salcedo-Baca D, Gonxález-Hernández H, Rodríguez-Leyva E, Vera-Villagrán E, Múzquíz-Fragoso C y Hurtado-Arellano A. 2012. Evaluación del impacto de la campaña contra el Huanglongbing (HLB) en 2008 2009 y 2010. IICA SAGARPA SENASICA. 126 p. <https://repositorio.iica.int/bitstream/11324/6083/1/BVE17109295e.pdf>
- SAS Institute 2008. Guía de procedimientos SAS Versión 9. SAS Institute Cary NC USA.
- SENASICA. 2010. Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing. 2ª Edición. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) México D. F. 38 p. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>
- SENASICA. 2012. Protocolo para establecer Áreas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) México D. F. 60 p. <http://senasica.gob.mx/?doc=9364>
- SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe octubre 2015. México D. F. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2015. Cierre de la producción agrícola por estados. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Shaner G and Finney RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67: 1051-1056. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Abstracts/Phyto67\\_1051.htm](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1977Abstracts/Phyto67_1051.htm)
- Stuchi ES and Girardi EA. 2010. Use of horticultural practices in citriculture to survive Huanglongbing. *Documentos 189/Embrapa Cassava & Fruits* ISSN 1809-4996. 67 p. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.4159.8802>
- Torres-Pacheco I, López-Arroyo JI, Aguirre-Gómez JA, Guevera-González RG, Yanez-López R, Hernández-Zul MI y Quijano-Carranza JA. 2013. Potential Distribution in Mexico of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector of CLas pathogen. *Florida Entomologist* 96: 36-47. <http://dx.doi.org/10.1653/024.096.0105>
- Tsai HT, Wang JJ, and Liu YH. 2002. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in southern Florida. *Florida Entomologist* 85: 446-451. [http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040\(2002\)085\[0446:SAOTAC\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040(2002)085[0446:SAOTAC]2.0.CO;2)
- Van der Plank JE. 1963. *Plant Diseases. Epidemics and Control*. Academic Press New York. 349 p.
- Velázquez-Monreal JJ, Robles-González MR, Manzanilla-Ramírez MA, Orosco-Santos M, Carrillo-Medrano SH y López-Arroyo JI. 2012. Dinámica poblacional de *Diaphorina citri* KUWAYAMA (HEMIPTERA: PSYLLIDAE) en cítricos ácidos en el estado de Colima. Pp: 116-125 *In* Memorias del 3º Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing. 9-11 Diciembre. Veracruz México.
- Zadoks JC, and Schein RD. 1979. *Epidemiology and Plant Disease Management*. Oxford University Press New York. 427 p.



# Physiological and nutrimental effect of HLB chronicity in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*)

## Efecto fisiológico y nutrimental de la cronicidad HLB en Limón mexicano (*Citrus aurantifolia*)

Gustavo Mora-Aguilera\*, Gerardo Acevedo-Sánchez, <sup>1</sup>Colegio de Posgraduados - Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF). Texcoco, Estado de México. CP 56230; <sup>1</sup>Edwin Catarino Hernández-Chan; Emiliano Loeza-Kuk, INIFAP Campo Experimental Mocochoá, Yucatán, México. C.P. 67413; J. Joaquín Velázquez-Monreal, INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima, México. CP 28100; <sup>1</sup>Raquel Cano-Medrano, Fruticultura; J. Isabel López-Arroyo, INIFAP Campo Experimental General Terán, Nuevo León CP 67413.

\*Autor de correspondencia: morag@colpos.mx

Received: July 30, 2022.

Accepted: October 30, 2022.

Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Hernández-Chan EC, Loeza-Kuk E, Velázquez-Monreal JJ, Cano-Medrano R and López-Arroyo JI. 2022. Physiological and nutrimental effect of HLB chronicity in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*). Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 244-253.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-19>

**Resumen.** Este trabajo tuvo como propósito evaluar macronutrientes y concentración de clorofila en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) en condición endémica e infección crónica de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) en Colima, México. La premisa fundamental fue que el análisis del efecto fisiológico causado por CLas permitirá comprender el impacto productivo citrícola y coadyuvar a definir estrategias efectivas de manejo. Se seleccionaron un total de 11 huertos en Tecomán y 13 en Armería en categorías de alta (AT), moderada

(MT) y baja tecnología (BT) de manejo de huerto (MH). En cada huerto se seleccionaron 25 árboles, cinco por clase de severidad-dosel de HLB (0, 25, 50, 75 y 100%) como estimadores de infección crónica. In situ, en 5 hojas sintomáticas (HS) y 5 hojas asintomáticas (HA)/árbol se evaluó concentración de clorofila mediante un medidor SPAD502 y de nutrientes con ionómetros de nitratos (NO<sub>3</sub>), potasio (K) y calcio (Ca). Se contabilizó y pesó la totalidad de frutos en 20 árboles/9 huertos. Por clase de severidad, se comparó el efecto MH y condición asintomática-sintomática mediante ANOVA parcelas-divididas y Tukey (p = 0.05) (SAS ver9.4). En todas las clases de severidad, NO<sub>3</sub> tuvo un efecto significativo (p < 0.0001) con respecto a nivel tecnológico, siendo más alta en predios con AT (113 – 126 ppm) respecto a MT (81 – 89 ppm) y BT (50 – 55 ppm). K y Ca no difirieron estadísticamente entre categorías MH. La condición asintomática versus sintomática no hubo efecto significativo en

concentración de  $\text{NO}_3$ , K y Ca ( $p > 0.05$ ). La severidad-dosel comparativa entre 25% versus 100% afectó en unidades clorofila con 24.9% reducción en HS y de 1.3% en HA. Los resultados muestran reducción de 2, 11, 58 y 79% de producción (kg) para 25, 50, 75, 100% de severidad respectivamente, sugiriendo la importancia de  $\text{NO}_3$  en el manejo productivo de limón mexicano afectado por CLas. La integración de  $\text{NO}_3$  a un programa de manejo integrado regional es una opción viable para el manejo rentable de huertos en condiciones endémicas y de alta infección crónica de CLas.

**Palabras clave:** Hunglongbing, Nutrición, Severidad, Manejo, Nitratos.

El manejo sistémico y racional de enfermedades se fundamenta en la comprensión biológica de la interacción hospedante y patógeno en un contexto epidemiológico regional (Mora-Aguilera et al., 2021). En la interacción de los subsistemas planta-patógeno, la nutrición del hospedero tiene una relación directa con severidad de un amplio número de enfermedades (Tripathi et al., 2022; Huber and Watson, 1974). Es ampliamente estudiado que el manejo de un cultivo a través de la nutrición permite un umbral de tolerancia a plagas y enfermedades, es decir, tienen mayor capacidad para generar mecanismos de respuesta ante potenciales procesos infecciosos y expresión de genes para resistir a los existentes. En general, el manejo de enfermedades no sistémicas se sustenta en el paradigma de la supresión del agente causal mediante control químico, biológico y/o cultural. Sin embargo, otros problemas sistémicos como virus y bacterias requieren en estrategias integradas que incorporen la nutrición, variedades resistentes, transgénica, inductores de resistencia, entre otras. Los nutrientes pueden, además, incrementar o disminuir

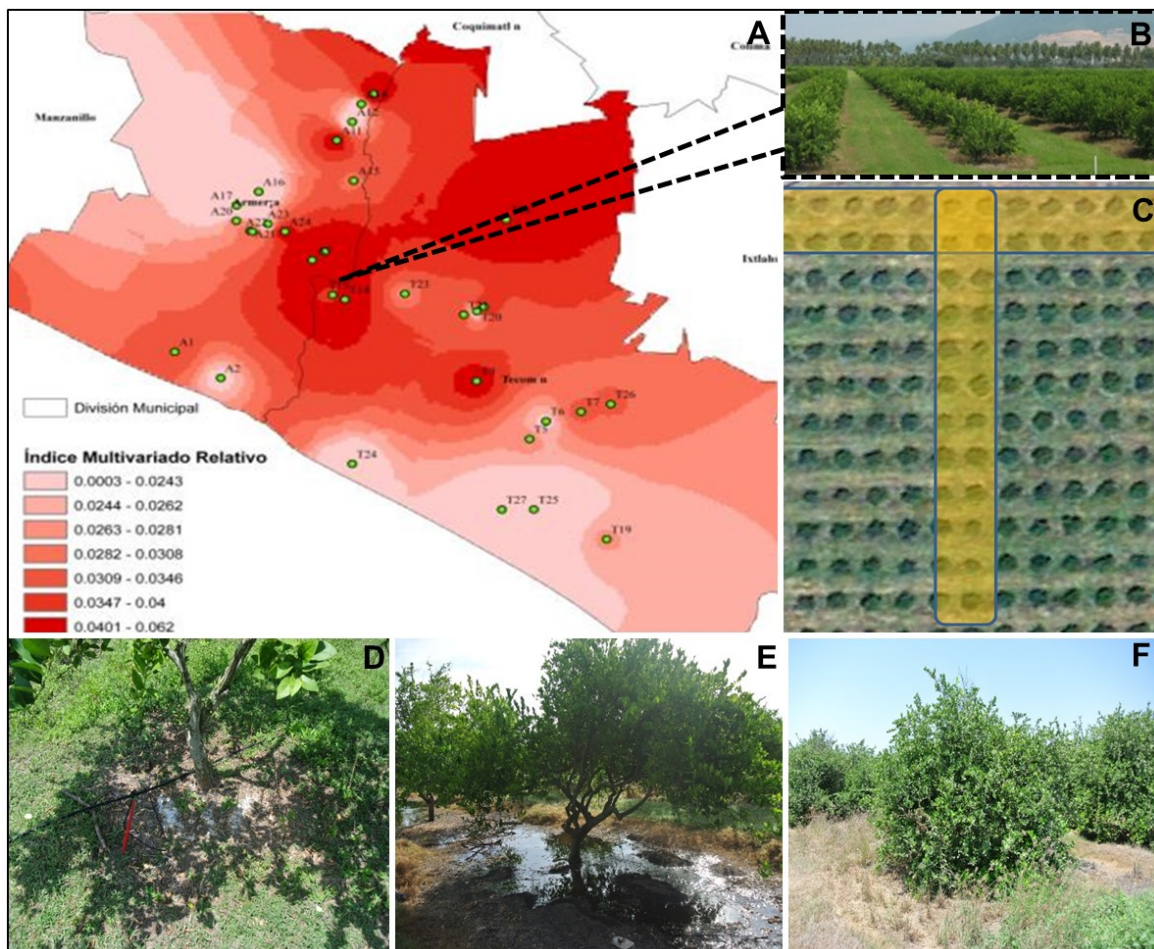
la resistencia o tolerancia de los cultivos a los patógenos (Tripathi et al., 2022). Se ha demostrado que la óptima fisiología y nutrición de cítricos puede compensar productivamente una condición de infección de CLas y otros patógenos Bassanezi et al., 2014; Gottwald et al., 2012; Spann et al., 2011; Xia et al., 2011; Ahmad et al., 2011). Sin embargo, se requieren estudios regionales específicos asociados con prácticas tecnológicas y uso de recursos productivos para la integración de la nutrición en el diseño de programas de manejo integrado cítrico (Uthman et al., 2022). A partir del ingreso de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en la región del Pacífico y su rápida condición endémica con altos niveles de infección crónica (Mora-Aguilera et al., 2014a), se propuso el manejo del HLB mediante programas nutrimentales, altas densidades de siembra, genotipos con mayor tolerancia, y control de *D. citri* con ingredientes químicos y biológicos (Manzanilla-Ramírez et al., 2019; 2012), como una alternativa obligada a la implementación oficial de Áreas Regionales de Control de *D. citri* (ARCOs), exitosa en regiones sub-endémicas del país (Mora-Aguilera et al., 2014b; SENASICA, 2012). No obstante, un programa integrado debe sustentarse en evidencias experimentales en condiciones de producción comercial y en ambientes específicos. Este trabajo tuvo como propósito analizar el efecto crónico de la infección de CLas en la producción de fruta en relación con niveles  $\text{NO}_3$ , K y Ca en planta, y con la concentración de clorofila en el limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) en la condición endémica de CLas en el estado de Colima con el fin de sustentar el componente nutrimental en la gestión regional del HLB.

En Colima, se seleccionaron 11 huertos comerciales de limón Mexicano en la región cítrica de Tecomán y 13 en Armería. La distribución espacial de huertos de evaluación se realizó con base en criterios diferenciales de inductividad epidémica, en-

demicidad y cronicidad regional de CLas mediante un mapa regional del Índice Multivariado Relativo que integra 15 variables de planta-patógeno-vector-manejo (Figura 1A y 1B). En cada huerto se seleccionaron y evaluaron 25 árboles mediante un sistema de muestreo en “T”, el cual considera la exploración del efecto de borde y centro del huerto (Figura 1C). Por cada sitio se determinó el nivel manejo de huerto (MH) considerando una escala cualitativa de alta (AT), moderada (MT) y baja tec-

nología (BT). El MH se generó a partir de parametrización de variables como condición general de huerto, actividades de nutrición, vigor de planta, control de maleza y plagas, y riego (Figura 1D-1F).

En cada árbol se evaluó la severidad de HLB a nivel de dosel de planta, empleando una escala de cinco clases de 0, 25, 50, 75 y 100% como indicador del nivel de infección crónica (Flores-Sánchez et al., 2015) (Figura 2). Por árbol, se seleccionaron cinco hojas sintomáticas (HS) (Figura 3A) y



**Figura 1.** A. Distribución regional 11 huertos en Tecomán y 13 en Armería asociados a diferentes niveles de cronicidad de HLB en planta medido a través del índice multivariado sugeridos por Flores-Sánchez *et al.* (2016). B. Ejemplo de un huerto de Limón mexicano con manejo de alta tecnificación (AT). C. Representación del muestreo de 25 plantas en “T”. D. Característica de riego por goteo-aspersión asociada a predio de alta tecnificación. E. Riesgo por inundación considerada una característica de predios de moderada tecnificación. E. Predios con maleza como característica asociativa a predios de baja tecnificación.

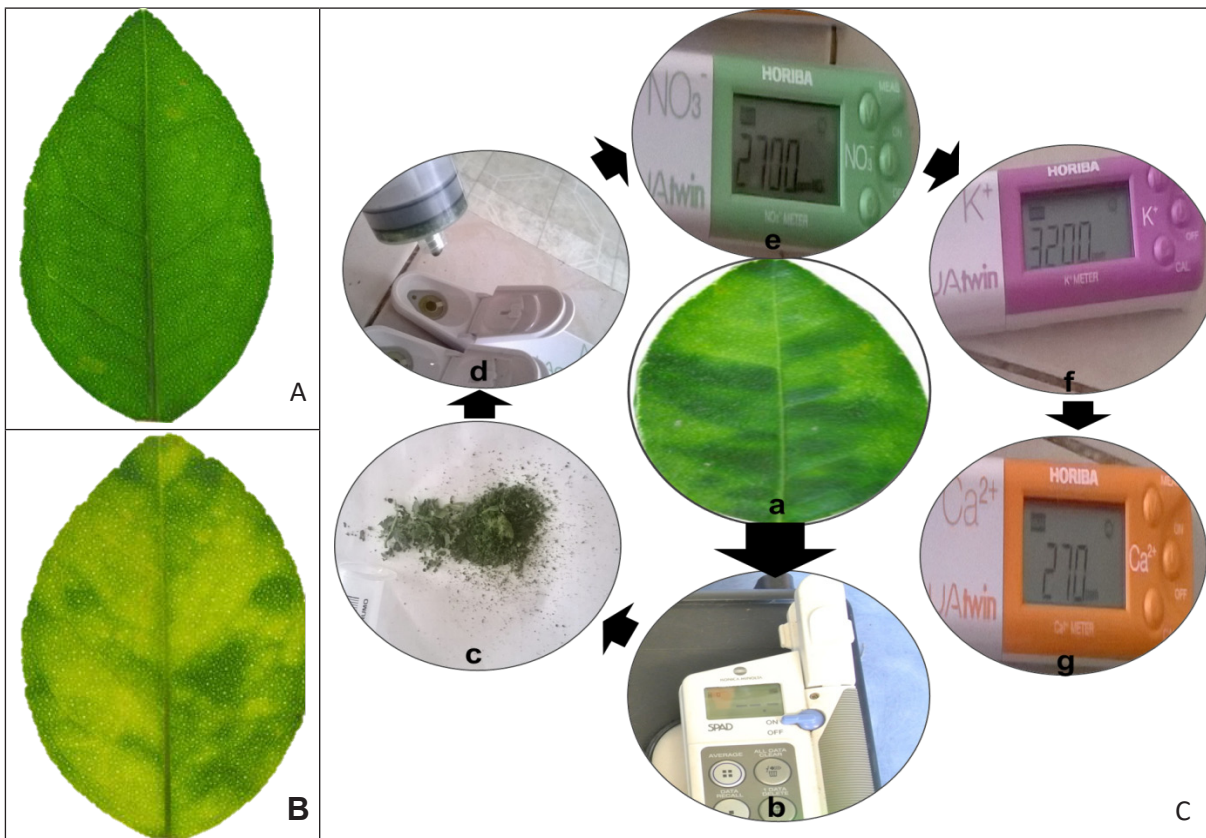


**Figura 2.** Escala diagramática-cualitativa de cinco clases para medición de severidad de HLB en el dosel de la planta. A. Muestra al menos 25% del dosel de la planta con síntomas o porcentaje de severidad. B. 50% severidad. C. 75% de severidad. D. 100% severidad.

cinco hojas asintomáticas (Figura 3B) para evaluar la concentración de clorofila con un medidor SPAD502 y cantidad de nutrientes con ionómetros portátiles HORIBA® específicos para  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  (Figura 3C), los cuales realizan una medición de micro volúmenes con un rango de 39 a 3900 partes por millón (ppm). Las hojas colectadas se maceraron y se dividió en tres muestras con agua destilada para lectura de cada nutriente. Adicionalmente, se contabilizó y pesó la totalidad de frutos en 20 árboles de nueve huertos en fase de producción con método no destructivo (conteo) y de validación (cosecha). Por clase de severidad, se comparó el efecto de MH y condición asintomática versus sintomática mediante análisis de varianza

(ANOVA) en un diseño de parcelas-divididas. Los análisis estadísticos se realizaron con SAS v9.4 usando la prueba de separación de medias Tukey con significancia  $p = 0.05$  ( $\alpha = 0.05$ ).

En general, los resultados experimentales mostraron que el decremento de los nutrientes evaluados ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}$  y  $\text{Ca}$ ) estuvo determinado principal y significativamente por el manejo tecnológico de los huertos (MG) (Dong et al., 2021) con efectos máximos de 60, 47.5 y 34.1%, respectivamente. Por el contrario, la severidad de HLB en el dosel de la planta no mostró una implicación directa en la concentración de los nutrientes (Figura 4). Considerando la máxima reducción de concentración entre clases de severidad para  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}$  y  $\text{Ca}$  fue de



**Figura 3.** A. Ejemplo de hojas asintomáticas seleccionadas durante el muestreo por huerto/árbol. B. Hoja con síntomas de HLB seleccionadas para medición de nutrientes. C. Muestra el proceso de medición de variables de nutrición. El proceso comienza con la selección de una hoja asintomática y sintomática (a), medición de unidades clorofila con equipo SPAD (b), corte y macerado de tejido colectado (c), extracción de muestra con apoyo de jeringa y depósito (d) en ionómetros de  $\text{NO}_3$  (e), Potasio (f) y Calcio (g).

9, 28 y 25%, respectivamente. La concentración de  $\text{NO}_3$  tuvo un efecto considerable con respecto a nivel tecnológico de los huertos, siendo significativamente ( $p < 0.0001$ ) más alta en AT (113 – 126 ppm) respecto a MT (81 – 89 ppm) y BT (50 – 55 ppm) en las cuatro clases de la escala de severidad (Figura 4). Aunque los nutrientes K y Ca no fueron estadísticamente diferentes entre categorías de MH ( $p > 0.05$ ), si mostraron tendencia decreciente con respecto al nivel tecnológico, con mayor evidencia en arboles con severidad menor al 50%.

Por clase de severidad, en huertos con daño menor a 25% la concentración de  $\text{NO}_3$  redujo significativamente 58% comparativamente entre predios con AT (123 ppm) y BT (66 ppm) (Figura 4A). Los nutrientes K y Ca tuvieron tendencia diferencial entre MH, siendo mayor en AT y similares entre MT y BT. En general, la concentración de ambos nutrientes fue 51 – 90 ppm, evidenciando una reducción de 20 y 27%, respectivamente. K en predios de AT y Ca en BT, tuvieron las concentraciones más bajas comparativamente entre clases de severidad. En huertos con severidad 50%, la tendencia

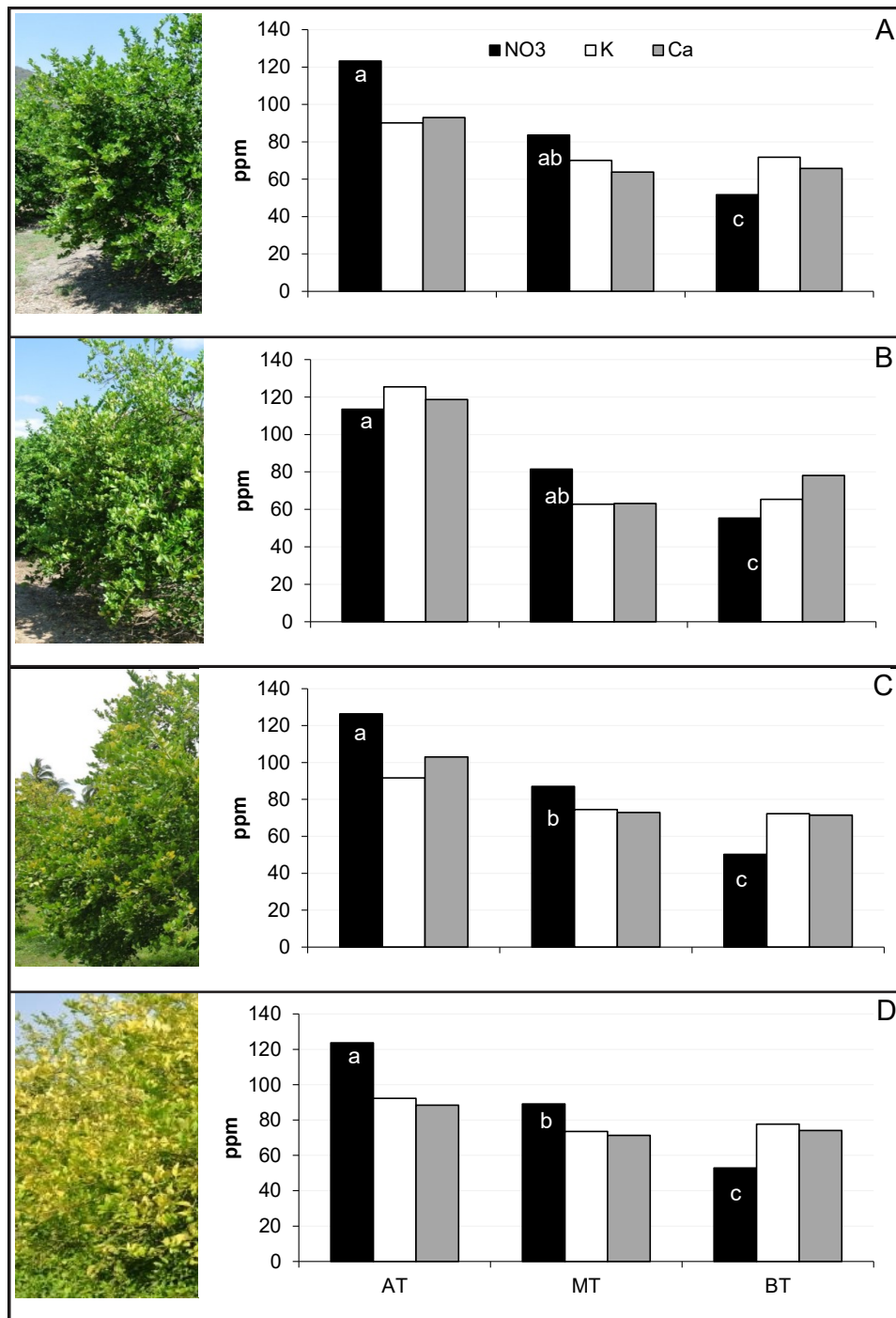


Figura 4. Efecto de NO<sub>3</sub>, K y Ca expresada en partes por millón (ppm) para predios de alta (AT), moderada (MT) y baja tecnificación (BT) por clase de severidad: A. 25%, B. 50%, C. 75%, y D. 100% de severidad. Barras con letras diferentes muestran diferencias con Tukey  $p = 0.05$ . Barras sin letra no mostraron diferencias significativas.

fue similar. Solo nitratos ( $\text{NO}_3$ ) fue estadísticamente diferentes ( $p < 0.001$ ) entre categorías de MH. La condición tecnológica AT mostró la concentración más baja de  $\text{NO}_3$  con 113 ppm y una reducción de 51% con respecto a predios BT (55 ppm). Los huertos AT y tuvieron las concentraciones más altas de K y Ca entre clases con 125 y 118 ppm ( $p > 0.05$ ), respectivamente, mientras que en BT las concentraciones 65 y 78 ppm representaron una disminución de 47 y 34%, las más considerables de la evaluación. Comparativamente MT y BT fueron similares en estos nutrientes (Figura 4B). Los huertos con severidad de 75% tuvieron las concentraciones más altas ( $p = 0.001$ ) de  $\text{NO}_3$  en AT y MT con 126 y 87 ppm, respectivamente.

Con respecto a predios de alta tecnología, BT redujo hasta 60% en este nutriente. K y Ca tuvieron las concentraciones más altas entre niveles de severidad con 74 y 72 ppm, respectivamente, las cuales no fueron diferentes ( $p > 0.05$ ) con respecto a predios en condición BT, pero fueron menores hasta en 50% comparativamente con predios de AT (Figura 4C). Por su parte, predios de 100% severidad en dosel mantuvieron tendencias análogas a clases de menor daño a pesar de la notable condición de daño en dosel. Las concentraciones de  $\text{NO}_3$  tuvieron una reducción altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) de 57% en predios de BT (52 ppm) con respecto los de alta tecnología (123 ppm). Mientras que el comportamiento de la concentración de K y Ca fue con la disminución más baja entre categorías de MH, alcanzando niveles de 15 y 16%, respectivamente (Figura 4D).

Respecto a la comparación en la condición asintomática versus sintomática, no tuvo efecto significativo en cuanto a concentración de  $\text{NO}_3$ , K y Ca ( $p > 0.05$ ). Por el contrario, la severidad en el dosel de la planta comparativa entre clases de 25% versus 100% afectó principalmente en la variable unidades clorofila (UC) con 24.9% reducción en

hojas sintomáticas y de 1.3% en asintomáticas, con resultados análogos de UC evaluados por niveles de severidad en limón mexicano de Colima (Figura 5A) (Manzanilla-Ramírez et al., 2019). Relativo a la variable de producción, se encontraron resultados que muestran reducción de 2, 11, 58 y 79% de productividad (kg) para las clases de severidad 25, 50, 75, 100% respectivamente, principalmente asociados en huertos de condición de BT y MT. En general la pérdida productiva mostró un efecto más significativo a partir del 75% de severidad (Figura 5B).

Un modelo clásico de regresión lineal para estimación de pérdidas con precisión  $r^2 = 0.76$ , donde producción ( $y$ ) =  $-0.88(\text{sev}) + 131.9$ , mostró efecto reductor de la producción de hasta 88% atribuible a una condición severa de severidad de HLB impactando en la producción L. mexicano. En niveles de severidad de 25%, la producción osciló entre 88 – 130 kg/árbol, los cuales comparativamente con predios de severidad al 100% (25 – 46 kg) representó hasta 81% de reducción en la producción (Figura 5C), similar a datos reportados en L. mexicano (Robles-García et al., 2017) y L. persa (Flores-Sánchez et al., 2015). Esto sugiere la importancia de considerar al  $\text{NO}_3$  y otros nutrientes en el manejo productivo de *C. aurantifolia* afectado por CLAs.

La cronicidad de HLB, expresada a través de la severidad en dosel muestra un efecto significativo en la concentración de nutrientes principalmente  $\text{NO}_3$ , lo cual implica que la coloración de las hojas decrece considerablemente afectando la capacidad fotosintética de la planta y por tanto una reducción considerable en la producción. Ca y K no mostraron un efecto estadístico asociado con la severidad de HLB. La medición de unidades clorofila disminuyó entre 14.85 y 17.54 ppm en la condición sintomático versus asintomático. Lo anterior sugiere que los nitratos es un nutriente altamente

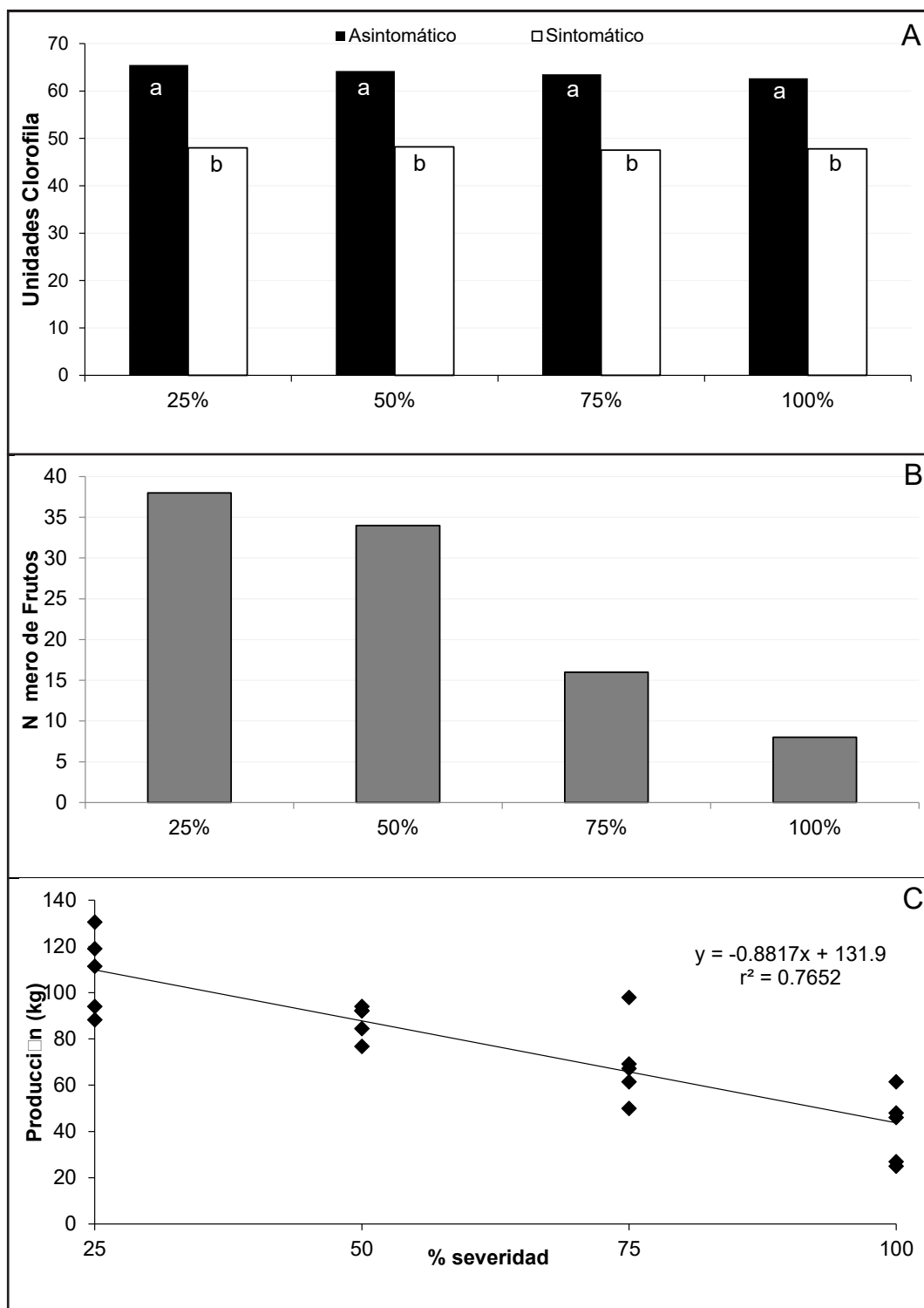


Figura 5. A. Comparativo de unidades clorofila (ppm) entre hojas sintomáticas y asintomáticas por clase de severidad-dosel de HLB (25, 50, 75 y 100%). B. Comparativo de número de frutos por clase de severidad-dosel de HLB. C. Modelo de correlación y regresión lineal de producción (kg) por clase de severidad-dosel de HLB.



sensible en el manejo del limón mexicano afectado por Clas. Sin embargo, el efecto independiente de nutrición desarticulado al manejo hídrico, uso de altas densidades de plantación, programas de renovación frecuente de plantas, y el control regional del vector *Diaphorina citri*, es limitado. Sin embargo, su integración a un programa de manejo integrado regional es una opción viable para el manejo rentable de huertos en condiciones endémicas y de alta infección crónica de CLas.

#### AGRADECIMIENTOS

A SENASICA-DGSV por el financiamiento al CP-LAN-REF. Al CONACYT por el financiamiento INIFAP 2009-01-108591; Al equipo CP-LANREF por el soporte logístico y operativo. Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Colima por el apoyo logístico.

#### LITERATURA CITADA

- Ahmad K, Sijam K, Hashim H, Rosli Z and Abdu A. 2011. Field assessment of calcium, copper and zinc ions on plant recovery and disease severity following infection of Huanglongbing (HLB) disease. *African Journal of Microbiology Research* 5(28): 4967-4979. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.236>
- Bassanezi RB, Montesino LH, Matos D, Quaggio JA, Boaretto RM and Bové JM. 2014. Three years of nutritional management on Huanglongbing epidemics and crop loss in sweet orange grove. In: 47° Congreso Brasileiro de Fitopatología. 494\_1. Del 17 al 22 de Agosto de 2014. Londrina, Paraná. Brasil.
- Dong ZH, Srivastava AK, Liu XD, Riaz M, Gao Y, Liang XM, Tan QL, Sun XC, Wu SW and Hu CX, 2021. Interactions between nutrient and Huanglongbing pathogen in citrus: An overview and implications. *Scientia Horticulturae* 290:110511. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110511>.
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30225072002>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G, López-Arroyo JI y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.01.004>
- Hernández-Sánchez E, Mora-Aguilera G, Tlapal Bolaños B, Rodríguez-Leyva E y Alvarado-Rosales D. 2014. Efecto de intensidad inicial de enfermedad en la caracterización temporal y espacial de la Mancha Negra del nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Revista Mexicana Fitopatología* 32(2): 132-146. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092014000200132&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200132&lng=es).
- Huber DM and Watson RD. 1974. Nitrogen form and plant disease. *Annual Review Phytopathology* 12: 139-165. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.12.090174.001035>
- Manzanilla-Ramírez MA, Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Orozco-Santos M y Carrillo-Medrano SH. 2012. Experiencias y perspectivas del Huanglongbing en Limón Mexicano. Pp: 406-414 In *Memorias del 3° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing*. 9-11, Diciembre. Veracruz, México.
- Manzanilla-Ramírez MA, Villegas-Monter Á, Velázquez-Monreal JJ, Zavaleta-Mancera HA, Sandoval-Villa M and Muñoz-Orozco Ab. 2019. Cambios fisiológicos en árboles de limón mexicano en producción infectados con HLB. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10: 1603-1614. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1957>.
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado OE, Coria-Contreras JJ, Mendoza-Ramos C, Martínez-Bustamante VI, López-Buenfil A, González-Gómez R and Javier-López MA. 2021. Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(3): 452-492. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-6>.
- Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez F, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Oropeza-Salinas C, Flores-Olivas A, González-Gómez R and Robles-García P. 2014a. Epidemiological surveillance and current status of coconut Lethal Yellowing, potato Purple Top and citrus Huanglongbing (HLB) in Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2): 120-131.
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JL, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge D and González-Gómez R. 2014b. Current situation and perspectives in management of citrus HLB. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2): 108-119.
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ y Carrillo-Medrano SH. 2017. Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón mexicano en Colima, México. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 8(5): 1101-1111. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.111>

- SENASICA. 2012. Protocolo para establecer áreas regionales de control del Huanglongbing y el psilido asiático de los cítricos (ARCO's). [www.senasica.gob.mx/?doc=9364](http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364)
- Spann TM, Schumann AW, Rouse B and Ebel B. 2011. Foliar nutrition for HLB. Citrus Industry. (June): 6-10. [https://crec.ifas.ufl.edu/media/crecifasufledu/extension/extension-publications/2011/2011\\_June\\_foliar\\_hlb.pdf](https://crec.ifas.ufl.edu/media/crecifasufledu/extension/extension-publications/2011/2011_June_foliar_hlb.pdf).
- Tripathi R, Tewari R, Singh KP, Keswani C, Minkina T, Srivastava AK, De Corato U and Sansinenea E. 2022. Plant mineral nutrition and disease resistance: A significant linkage for sustainable crop protection. *Frontiers in Plant Science* 13:883970. doi: 10.3389/fpls.2022.883970
- Uthman QO, Atta AA, Kadyampakeni DM, Qureshi JA, Morgan KT and Nkedi-Kizza P. 2022. Integrated water, nutrient, and pesticide management of Huanglongbing-affected sweet oranges on Florida sandy soils. *A Review. Plants* 2022: 11, 1850. <https://doi.org/10.3390/plants11141850>
- Xia Y, Ouyang G, Sequeira RA, Takeuchi Y, Baez I and Chen J. 2011. A review of Huanglongbing (Citrus Greening) management in citrus using nutritional approaches in China. *Plant Health Progress* <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-1003-01-RV>.