

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

COMPUESTOS VOLÁTILES DE BROTES DE LIMÓN PERSA Y LIMÓN MEXICANO ASOCIADOS A SÍNTOMAS DEL HLB (Huanglongbing)

ESTRELLA MENDOZA PEÑA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: **COMPUESTOS VOLÁTILES DE BROTES DE LIMÓN PERSA Y LIMÓN MEXICANO ASOCIADOS A SÍNTOMAS DEL HLB (Huanglongbing)**, realizada por la alumna: **ESTRELLA MENDOZA PEÑA** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JUAN CIBRIÁN TOVAR

ASESOR



DR. J. ISABEL LÓPEZ ARROYO

ASESOR



DR. JOSÉ REFUGIO LOMELÍ FLORES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 2013

DEDICATORIA

A mi hija Mila Victoria que es la luz de mi vida y razón por la cual sigo adelante.

A mis padres por estar conmigo siempre apoyándome, por su amor y compañía.

A mis hermanas por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por haberme asignado una beca para la realización de mis estudios de maestría.

A los Dres. **Juan Cibrián Tovar, José Isabel López Arroyo y José Refugio Lomelí Flores** por aceptar formar parte de mi consejo particular y su asesoría brindada.

Al Dr. **Julio César Velázquez González** por guiarme y por todas las horas brindadas para la conclusión de mi investigación. Además de todo su apoyo y conocimientos transmitidos con paciencia y dedicación.

Al Dr. **Felipe Tafoya** por su apoyo en el análisis de laboratorio.

Al Dr. **Ausencio Azuara Domínguez** por su asesoría y colaboración.

Al Ing. **Pedro Pérez Serrato** por las facilidades brindadas en la toma de muestras de limón mexicano en campo.

Al Dr. **Rafael Gómez** del Campo Experimental- INIFAP Santiago Ixcuintla, Nayarit por las facilidades brindadas en la toma de muestras de limón persa en campo.

A **Carlos Patricio Illescas Riquelme** por su apoyo, ánimo y compañía.

Al proyecto FONSECSAGARPA-CONACYT “MANEJO DE LA ENFERMEDAD HUANGLONGBING (HLB) MEDIANTE EL CONTROL DE POBLACIONES DEL VECTOR *Diaphorina citri* (HEMIPTERA: PSYLLIDAE), EL PSÍLIDO ASIÁTICO DE LOS CÍTRICOS” por el apoyo otorgado.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVO.....	4
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1. Importancia de los cítricos	4
1.2. <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama, vector del HLB.....	5
1.3. Síntomas del HLB en limón persa <i>Citrus latifolia</i> y limón mexicano <i>Citrus aurantifolia</i>	6
1.4. Compuestos Volátiles. Mensajeros intra e interespecíficos.....	8
1.5. Técnica de recolecta de volátiles: SPME (Solid Phase Micro Extraction por sus siglas en ingles).....	9
1.6. Cromatografía y Espectrometría de masas.....	11
CAPITULO II. COMPUESTOS VOLÁTILES DE BROTES DE LIMÓN PERSA Y MEXICANO ASOCIADOS A SÍNTOMAS DEL HLB (Huanglongbing).....	11
2.1. Materiales y métodos.....	11

2.1.1. Muestreo de materia vegetal (brotes).....	11
2.2. Análisis de laboratorio.....	14
2.2.1. Recolecta de volátiles por SPME.....	14
2.2.2. Separación e identificación de compuestos volátiles.	18
2.2.2.1. Calibración del instrumento	19
2.2.2.2. Discriminación cualitativa entre compuestos de los diferentes tratamientos....	19
2.2.3. Semicuantificación de compuestos volátiles.....	20
2.2.4. Análisis estadístico.....	21
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
2.3.1. Identificación de compuestos en brotes de limón persa y mexicano.....	23
2.3.2. Análisis de compuestos con mayor variación cromatográfica en limón persa y Mexicano.....	28
2.4. CONCLUSIONES.....	31
3. LITERATURA CITADA.....	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos usados para la captura de volátiles de brotes con diez repeticiones cada uno.....	16
Cuadro 2. Compuestos identificados y sus respectivas abundancias en BAA y BAS al HLB en limón persa y mexicano.....	24
Cuadro 3. Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos identificados en un gr de brotes vegetativos.....	26
Cuadro 4. Comparación de volátiles entre BAA vs BAS de Limón persa.....	29
Cuadro 5. Comparación de volátiles entre BAA vs BAS de Limón mexicano.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Moteado asimétrico e islas verdes. Síntomas característicos del HLB en hojas de limón persa.....	12
Figura 2. Moteado asimétrico. Síntoma característico del HLB en hojas de limón mexicano.....	13
Figura 3. Marcaje, por SENASICA, de árboles de limón mexicano con síntomas de HLB.....	13
Figura 4. Brotes colocados en viales Agilent® de 10 ml para SPME.....	15
Figura 5. Fibra para SPME de polidimetilsiloxano.....	16
Figura 6. Cromatograma de blanco de columna.....	17
Figura 7. Cromatograma de blanco de columna.....	17
Figura 8. Cromatograma de blanco fibra.....	18
Figura 9. Cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (CG-DSM).....	19
Figura 10. Perfil cromatográfico obtenido de brotes de limón persa asintomáticos (BAA) vs sintomáticos (BAS).....	22
En la figura 11. Perfil cromatográfico obtenido de brotes de limón mexicano asintomáticos (BAA) vs sintomáticos (BAS).....	23
Figura 12. Espectro de masas de B-ocimeno.....	27
Figura 13. Espectro de masas de D-limoneno.....	28
Figura 14. Espectro de masas de cariofileno.....	28

COMPUESTOS VOLÁTILES DE BROTES DE LIMÓN PERSA Y LIMÓN MEXICANO ASOCIADOS A SÍNTOMAS DEL HLB (Huanglongbing)

Estrella Mendoza Peña

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB) es una enfermedad de los cítricos que se caracteriza por causar áreas moteadas en hojas, generar frutos deformes y decolorados, semillas abortivas, causar pérdida paulatina de la producción y provocar que la muerte de los árboles infectados sea inevitable. El agente asociado a esta enfermedad es la bacteria *Candidatus Liberibacter* ssp., y en México es dispersada por el vector *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). En el presente estudio, mediante el método de microextracción en fase sólida (SPME) se recolectaron compuestos volátiles emitidos de brotes vegetativos (menores a 3 cm) sanos, así como de brotes infectados con *Ca. L. asiaticus*, de limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) y limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm). Los compuestos capturados se analizaron por cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas (CG-DSM). Se identificaron 41 compuestos de los cuales 34 estuvieron presentes en *C. latifolia* y 16 de ellos en *C. aurantifolia*. La información analizada mostró que ambas especies de cítricos ácidos presentan estadísticamente similitud en el número de compuestos volátiles emitidos por brotes de árboles asintomáticos y sintomáticos; también se encontró la presencia constante de tres compuestos en todas las muestras, los cuales fueron D-limoneno, β -ocimeno y cariofileno; estos difirieron cuantitativamente entre los recolectados de brotes de árboles asintomáticos y los obtenidos de árboles con síntomas característicos de HLB, encontrándose mayor concentración de D-limoneno y β -ocimeno en brotes de árboles sintomáticos. El análisis también demostró que compuestos como el citronellal,

lavadulol, β -elemeno, α -terpineol para limón persa y elemeno para limón mexicano tienden a disminuir su concentración cuando los árboles presentan síntomas de HLB. Los resultados obtenidos presentan implicaciones que podrían contribuir en el desarrollo del diagnóstico temprano de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Cítricos, SPME, psílido asiático, β -ocimeno, D-limoneno, brotes vegetativos.

ABSTRACT

The Huanglongbing (HLB) is a citrus disease characterized by areas causing mottled leaves, deformed and discolored bear fruit, seed abortion, causing gradual loss of production and cause the death of infected trees is inevitable. The causal agent is *Candidatus Liberibacter* spp. in Mexico is scattered by the vector *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). In this paper, we used the solid phase microextraction (SPME) technique for collecting volatiles from vegetative shoots (less than 3 cm) healthy and infecteds prouts by *Candidatus Liberibacter asiaticus* from Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) and Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Christm). Captured compounds were analyzed by gas chromatography coupled to mass selective detector (GC-DSM). We were able to identify 41compounds, 16were present in *C. aurantifolia* and 34 in *C. latifolia*. The analysis indicated that no significant difference in the number of volatile compounds emitted by shoots of asymptomatic and symptomatic trees in both cultivars. Three compounds occurred in all samples, D-limonene, β -ocimene and caryophyllene and these differed quantitatively between leave buds collected from symptomless trees and leave shoots

collected with characteristic symptoms of HLB, being highest concentration in shoots from symptomatic trees. The analysis also showed that compounds such as citronellal, lavadulol, β -elemene, α -terpineol for Persian lime and Mexican lime elemene tend to decrease their concentration when the trees show symptoms of HLB. The results have implications that could contribute to the development of early diagnosis of the disease.

KEYWORDS: Citrus, SPME, psyllid, β -ocimene, D-limonene, vegetative shoots.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los cítricos representan 22% de la producción mundial de frutas (Alemán *et al.*, 2007) dentro de los principales países productores destacan: China, Brasil, EUA, India y México (FAOSTAT, 2013). Actualmente, estos países han visto afectada su economía citrícola debido a daños por plagas y enfermedades, principalmente, por los psílicos *Trioza erythrae* Del Guercio y *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) (SENASICA, 2010), plagas de importancia económica, debido a que, son vectores del patógeno que causa la enfermedad “Huanglongbing” (Garnier *et al.*, 2000). Esta enfermedad es ocasionada por el agente *Candidatus Liberibacter* spp., una bacteria que habita el floema de las plantas y restringida al género *Citrus* y su relativo cercano limonaria, *Murraya paniculata* Jack, debido al rango estrecho de hospedantes de los psílicos vectores (Halbert, 2004). A la fecha se han identificado tres especies del agente causal: 1) *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), 2) *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y 3) *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (Sagaram *et al.*, 2009).

El HLB (*Candidatus Liberibacter* spp.) es considerada la enfermedad más destructiva para los cítricos en el mundo debido a que provoca la muerte del árbol de forma inevitable en un corto tiempo. Esta bacteria obstruye el floema de las plantas afectadas impidiendo la distribución de la savia, ocasionando la reducción de la calidad de la fruta y de su jugo (Pacheco *et al.*, 2012).

El HLB se reportó por primera vez en México en 2009, en Tizimin, Yucatán, asociada a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Robles *et al.*, 2009). Especie dispersada y transmitida por *Diaphorina citri* (Bové, 2006) la cual representa una seria amenaza para el país, por ser productor y exportador de cítricos a nivel mundial. Desde entonces a la fecha, de los 23 estados citrícolas de México, 13 han sido reportados con la enfermedad: Yucatán, Quintana Roo, Nayarit,

Jalisco, Campeche, Colima, Sinaloa, Michoacán, Chiapas, Hidalgo, Baja California Sur, Tabasco y Guerrero (SCOPE, 2013). Encontrándose mayor severidad de síntomas fisiológicos e histológicos, de esta enfermedad, en limón mexicano y limón persa en comparación con naranja dulce (*Citrus sinensis*) (Flores *et al.* 2010; Esquivel *et al.*, 2010).

La diseminación de la bacteria a través del vector es una realidad en el país, y más por las condiciones meteorológicas, como los huracanes y corrientes de aire (Galindo-Mendoza *et al.*, 2011), que se han presentado desde que se detectó el primer caso en la península de Yucatán (Pacheco, *et al.*, 2012). *Diaphorina citri* fue reportado desde 2002 en México en árboles de cítricos en el estado de Campeche, y actualmente se encuentra presente en todas las zonas citrícolas del país (López-Arroyo *et al.*, 2005). Lo que demuestra que en tan sólo seis años (2002 a 2008) el insecto se desplazó por todo el territorio nacional.

Este psílido oviposita y se desarrolla exclusivamente en brotes vegetativos nuevos, teniendo preferencia por los menores a los 5 cm (Fernández y Miranda, 2005), por lo que su ciclo de vida está estrechamente ligado al patrón de crecimiento de sus plantas hospedantes (Moran y Buchan 1975, Hall y Albrigo 2007, Sétamou *et al.*, 2008). Las hembras depositan los huevos desde que el brote en punta de lanza tiene un tamaño menor de dos milímetros (Fernández y Miranda, 2005). Estudios recientes han demostrado que los compuestos emitidos por brotes pueden desempeñar un papel importante en la detección, localización y evaluación de elección de las plantas hospedantes potenciales para el desarrollo del psílido (Wenninger *et al.*, 2009). Los volátiles emitidos por las plantas es, quizá, el factor que más influye en la selección del hospedante, este reconocimiento por medio de volátiles puede deberse a un solo compuesto o bien a una mezcla específica, que son percibidos por los órganos receptores de los insectos y procesados en el sistema nervioso central (Marín y Céspedes, 2007).

En pruebas de comportamiento Patt y Sétamou (2010) demostraron que el psílido asiático fue estimulado por volátiles emitidos por brotes vegetativos sanos de la planta hospedante y comentan que es posible que responda diferencialmente a los volátiles emitidos por plantas infectadas con Huanglongbing. Mann *et al.*, (2012) señalan que inicialmente las plantas infectadas con HLB son más atractivas para los adultos de *D. citri* que las no infectadas, y después de comer, los psílicos se dispersan hacia las plantas sanas las cuales prefieren como punto de asentamiento. Sugieren que la infección bacteriana de las plantas, altera la liberación de compuestos volátiles específicos sin embargo, se pueden encontrar plantas con HLB que contenga secciones “libres” de la bacteria. Esto podría indicar bajas concentraciones de la bacteria en esas secciones “libres” de HLB en árboles infectados que estén por debajo del umbral de detección por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Gottwald, 2010) y por tanto la probabilidad de obtener falsos negativos mediante el análisis por PCR. Y la baja concentración de bacterias que no logra ser detectada por PCR, no necesariamente es una baja concentración para ser transportada por el floema de la planta, succionada por el psílido y posteriormente ser transmitida a otros árboles por el insecto vector (Gottwald, 2010). En este sentido cabe la posibilidad de que existan más plantas y huertas positivas con HLB sin detectar que las que son detectables a simple vista y mediante la técnica de PCR (Pacheco, *et al.*, 2012).

Por lo que en el presente trabajo se analizaron los compuestos volátiles emitidos, por brotes vegetativos de limón persa y limón mexicano, asociados a síntomas visibles y característicos del HLB.

OBJETIVO

Capturar, separar, identificar y semicuantificar los compuestos volátiles obtenidos de brotes de árboles asintomáticos y con síntomas de HLB *Candidatus Liberibacter asiaticus* recolectados en dos especies de limón.

CAPÍTULO I.

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Importancia de los cítricos

Los cítricos representan el cultivo de mayor valor en términos de comercio internacional. Existen dos mercados claramente distinguibles dentro de este sector; el mercado de frutos frescos y el mercado de jugos. Aunque a partir del procesamiento industrial de los cítricos se obtienen diversos productos y subproductos útiles a la industria farmacéutica, de cosméticos y perfumes (Díaz, 2010).

Para México, la citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional y se destina aproximadamente medio millón de hectáreas para este propósito, las cuales se distribuyen en 23 estados con clima tropical y subtropical de la República, en los que se producen, aproximadamente, 6 millones de toneladas anuales, con un valor superior a los 8 mil millones de pesos. Lo que representa una fuente importante de ingreso en zonas rurales de nuestro país. Se estima que cerca de 67,000 familias dependen de esta actividad quienes, a su vez, generan 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos (SENASICA, 2012).

Los cítricos de mayor importancia económica en nuestro país son la naranja, el limón (limón mexicano, italiano y limón persa) y mandarinas, tangerinas y toronjas (Díaz, 2010). De acuerdo

con información de la Secretaría de Agricultura (2012), los productores mexicanos de limón ocupan el primer lugar en la variedad "mexicano" y segundo lugar en "persa", rubros en los que tienen inversiones en activos por más de 16 mil millones de pesos. La citricultura es una actividad redituable en aspectos económicos para el productor, ecológicos al no utilizar demasiados agroquímicos como en otros cultivos e importante desde el punto de vista social al generar mano de obra durante todo el año.

1.2. *Diaphorina citri* Kuwayama, vector del HLB

El Psílido Asiático de los Cítricos evolucionó en India en asociación con una especie de *Murraya*, y fue descrito por primera vez en Taiwán en 1907, de colectas realizadas en cítricos (Halbert y Manjunath, 2004). Este psílido, además de causar malformaciones en las hojas por las grandes cantidades de savia que sus poblaciones pueden llegar a succionar, es vector de la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) (Halbert y Manjunath, 2004), las fases en que adquiere la bacteria: son el 4to. y 5to. instar ninfal y el adulto.

Actualmente, para México (NOM-011-FITO-1995) y otros países es un insecto plaga con categoría cuarentenaria. Se encuentra ampliamente distribuido en muchas áreas citrícolas del mundo. Afectando los cítricos en regiones tropicales y subtropicales en áreas geográficas como Afganistan, China, Hong Kong, India, Indonesia, Malasya, Bangladesh, Bután, Camboya, Japón, Laos, Mauricio, Myanmar, Nepal, Pakistan, Islas Filipinas, Isla Reunión, Islas Ryukyu, Arabia Saudita, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia, Syria, Vietnam, Yemen, Papua y Nueva Guinea. El psílido asiático también está establecido en América del Norte, Centro América y Sur América. Se ha reportado en Islas Caimán, Bahamas, República Dominicana, Cuba, Puerto Rico, y con intercepciones en Belice, en Isla Guadalupe, Honduras, Argentina, Brasil, Venezuela, Uruguay y

algunos territorios de Estados Unidos y México (Halbert y Manjunath, 2004; Halbert y Núñez 2004).

1.3. Síntomas del HLB en limón persa *Citrus latifolia* y limón mexicano *Citrus aurantifolia*.

Los síntomas descritos para el Huanglongbing de los cítricos son: defoliación de los árboles, amarillamiento, reducción del tamaño de los frutos, amarillamiento o aclaramiento de las nervaduras y moteado del follaje (Khairulmazmi *et al.*, 2008). Pero el síntoma más evidente de la enfermedad es la presencia de una o más ramillas terminales del árbol con apariencia clorótica, que contrasta con el color verde de las hojas de las ramas no afectadas (Fundecitrus, 2009).

Los síntomas se observan mejor en árboles jóvenes que en árboles más desarrollados, lo que indica que los árboles jóvenes, de rápido crecimiento, tienen un período de incubación más corto (Gottwald, 2010) y dicha sintomatología varía dependiendo de la especie de hospedante donde se manifieste (Pacheco *et al.*, 2012). Estudios realizados en la península de Yucatán y la zona del pacífico mexicano, donde se detectó por primera vez la enfermedad, indican que los síntomas son más severos en cítricos agrios como limón mexicano, limón persa, limón volkameriano y naranja agria; en contraste con los cítricos dulces como naranja dulce y mandarina, los cuales expresaron síntomas menos severos y con un periodo de incubación mayor (Esquivel-Chávez *et al.*, 2010 y Flores-Sánchez *et al.*, 2010).

En México la visualización de los síntomas se limita a hojas y frutos; en hojas es posible observar una progresión de síntomas: desde puntos cloróticos, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteados y clorosis difusa hasta que el amarillamiento en la lámina foliar es generalizado y ocurre la defoliación (SENASICA 2012). En frutos, sólo en limón

mexicano se ha observado el fenómeno de maduración irregular iniciando por un color amarillento en la parte basal (Robles-González *et al.*, 2010).

Los síntomas de HLB en hojas son variados y aunque pueden parecerse y confundirse con deficiencias nutricionales o con manifestaciones del daño de plagas u otras enfermedades, presentan algunas características únicas que la distingue (Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007), es decir el clásico moteado asimétrico en ambos lados de la nervadura central de la hoja; con las venas claras o amarillas y algo engrosadas o incluso “acorchadas”; las hojas afectadas son pequeñas, erectas y con un aparente crecimiento vertical, presentan un ángulo cerrado con respecto al tallo (“orejas de conejo”); también pueden tener apariencia coriácea y presentar “islas verdes”. Las hojas nuevas se pueden presentar sin su color normal (Pacheco *et al.*, 2012).

Durante la infección se muestran fuertes floraciones con un pobre cuajado de frutos; se presenta la caída prematura de frutos y los que se mantienen en el árbol son pequeños y asimétricos; también toman la coloración normal sólo en la parte expuesta al sol, mientras que la otra parte toma una coloración verde-olivo intenso (Gottwald *et al.*, 2007)

Por otro lado la bacteria responsable del HLB se encuentra distribuida de manera irregular a lo largo del sistema vascular de árboles infectados (Brlansky y Rogers, 2007). Por lo que se puede encontrar un árbol con HLB que contenga secciones “libres” de la bacteria. Esto podría indicar bajas concentraciones de la bacteria en esas secciones “libres” de HLB en árboles infectados que estén por debajo del umbral de detección por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por sus siglas en inglés (Gottwald, 2010). Teniendo entonces múltiples infecciones asintomáticas por cada árbol sintomático y una distribución no uniforme o zonas libres de la bacteria dentro del árbol infectado (Pacheco *et al.*, 2012).

1.4. Compuestos Volátiles. Mensajeros intra e interespecíficos.

Las células vegetales producen sustancias que quedan más o menos aisladas de los protoplasmas vivos o son eliminadas y/o secretadas enteramente del cuerpo de las plantas (Esau, 1976). Los aceites vegetales volátiles constituyen aproximadamente el 1% de los metabolitos secundarios de las plantas y están representados principalmente por terpenoides, fenilpropanoides / benzenoides, derivados de ácidos grasos y derivados de aminoácidos (Dudareva *et al.*, 2007).

Estas sustancias volátiles de plantas pueden actuar como señales para otros organismos, y aún para la misma planta para su comunicación e interacción con el ambiente circundante; además de que pueden modificar el entorno de las especies que los producen, sus vecinos y sus enemigos (Marín y Céspedes, 2007). Además de que los volátiles químicos sirven a las plantas para: reproducción, al atraer polinizadores o dispersores de semillas; como defensa para repeler insectos o detener la colonización de bacterias y hongos fitopatógenos; para atraer enemigos naturales de herbívoros; en general como mensajeros intra e interespecíficos (Marín y Céspedes, 2007).

Por otro lado, las plantas pueden ser atractivas a los insectos como comida, como lugar de apareamiento, para ovipositar o como refugio. Los insectos aprenden a reconocer el olor emitido por sus plantas hospedantes y este factor es el principal responsable del fenómeno de constancia en las plantas, que conduce a la fidelidad de un insecto para visitar regularmente a un número limitado de especies vegetales (Harborne, 2001). Tal fidelidad es guiada por la morfología de la planta, el olor y el color, de modo que los insectos limitan su atención a unas pocas o únicas especies (Harborne, 2001).

La liberación de volátiles por una planta después de haber sido atacada por herbívoros vectores e infectada por fitopatógenos transmitidos por estos insectos, es un proceso biológico complejo. La complejidad de la evolución de las redes de señalización es todavía relativamente limitada en interacción planta-insecto (Pieterse y Dicke 2007). Por otro lado la capacidad de percibir, interpretar y manipular señales que emiten las plantas, proporcionan probablemente, a los insectos o patógenos, sucesos de adaptación, lo que permite, por ejemplo, la capacidad para ampliar nuevos nichos ecológicos (Schultz y Appel, 2004).

Recientemente se reportó que los volátiles inducidos por patógenos afectan el comportamiento de su anfitrión en cuanto a la preferencia de su hospedero (Mann *et al.*, 2012). En éste estudio se dice que *D. citri* fue más atraída por los volátiles de plantas infectadas con el patógeno que causa HLB que por los de las no infectadas. Sin embargo, después de comer, estos psílidos se dispersan hacia las plantas no infectadas como punto de colonización preferente. Lo que sugiere que el comportamiento del sistema de selección de *D.citri* puede ser modificado por la infección bacteriana de las plantas, que altera la liberación de compuestos volátiles específicos y los contenidos nutricionales de la planta. Además, se muestra en laboratorio que este patógeno aparentemente media por manipulación el comportamiento del vector para facilitar la diseminación del agente patógeno (Mann *et al.*, 2012).

1.5. Técnica de recolecta de volátiles: SPME (Solid Phase Micro Extraction)

Existen varias metodologías para el aislamiento de volátiles. Una de ellas es la llamada técnica de microextracción en fase sólida, SPME por sus siglas en inglés (Solid Phase Microextraction) (Matich *et al.*, 1996), que permite la captura de volátiles de diferentes muestras (agua, aire, suelo)

y su identificación sin emplear solventes (Agelopoulos y Pickett, 1998; Millar y Haynes, 1998; Flamini *et al.*, 2003).

El principio en el que se basa la SPME es la extracción y la partición de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico (Matich *et al.*, 1996). Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra (Lord y Pawliszyn, 2000).

Entre los parámetros que deben optimizarse en el proceso de extracción por SPME se encuentra la agitación de la muestra, que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra o al espacio de cabeza por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio. Sin embargo en el modo de espacio cabeza y con muestras gaseosas esto no es necesario ya que la propia convección del aire es suficiente para llegar al equilibrio de forma rápida (Pawliszyn, 1997). Otros parámetros importantes son el tiempo y la temperatura de extracción, así como la modificación de las condiciones de la muestra (Pawliszyn, 1997).

Para llevar a cabo la desorción de los analitos, la forma más habitual de realizarla es, si la SPME se acopla a la CG, térmicamente en el inyector del cromatógrafo de gases, de forma que al aumentar la temperatura la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas acarreador (Lord y Pawliszyn, 2000). En esta etapa los parámetros a optimizar son la temperatura y el tiempo de desorción. La temperatura se debe fijar al máximo de uso de la fibra y el tiempo debe ser el recomendado por el fabricante

(5 min) para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa y no haya efecto memoria (Pawliszyn, 1997).

1.6. Cromatografía y Espectrometría de masas

La técnica de cromatografía de gases (CG) permite separar los compuestos volátiles presentes en una muestra y determinar los tiempos en los que los volátiles salen de la columna (tiempo de retención) y se pueden acoplar a un espectrómetro de masas (CG-EM) (Dewulf *et al.*, 2002). El acoplamiento de la cromatografía de gases y espectrometría de masas, permite determinar el espectro de masas de un componente determinado, presente en un pico de un cromatograma de gases, determinando su estructura, e identificándolo con mayor certeza (Adams, 1995; Ruther, 2000).

CAPITULO II

COMPUESTOS VOLÁTILES DE BROTES DE LIMÓN PERSA Y MEXICANO ASOCIADOS A SÍNTOMAS DEL HLB (Huanglongbing)

2.1. Materiales y métodos

2.1.1. Muestreo de materia vegetal (brotes)

Las muestras de material vegetal (brotes) se tomaron en el mes de enero, dado que la primer época de brotación va de enero a marzo, donde ocurren de dos a tres flujos de brotación vegetativa (Coelim, 2002), y se obtuvieron de árboles asintomáticos (visualmente sanos) así como de árboles con síntomas de infección por *C. Liberibacter asiaticus*, con un nivel alto de

probabilidad de presencia de HLB en base a sintomatología, según SENASICA (2010). Las muestras de limón persa se tomaron de huertos ubicados en Santiago Ixcuintla, Nayarit, mientras que las de limón mexicano se tomaron de huertos ubicados en Tecomán, Colima.

Para recolectar las muestras (brotes) de árboles sintomáticos, de limón persa y mexicano, se puso atención en aquellos ubicados en las orillas de la plantación ya que según Gottwald e Irej (2008) generalmente ahí inician las infestaciones del vector, pues la plaga está arribando de predios vecinos y muy probablemente estos insectos sean portadores de la bacteria asociada al HLB (Robles, *et al.* 2011). Siguiendo la metodología de muestreo de SENASICA (2010) los brotes se tomaron de las áreas en donde el árbol mostraba los síntomas más visibles en las hojas maduras, tomando en cuenta el característico moteado asimétrico y las islas verdes (Figura 1 y 2), además de que estos árboles se encontraban marcados con una cinta roja por SENASICA indicando su infección con HLB (Figura 3). Para seleccionar los árboles sanos, se eligieron de otro huerto donde aparentemente no estaban infectados los árboles y por lo tanto sin ningún nivel de sintomatología, seleccionando los árboles de la parte media del huerto.



Figura 1. Moteado asimétrico e islas verdes. Síntomas característicos del HLB en hojas de limón persa.



Figura 2. Moteado asimétrico. Síntoma característico del HLB en hojas de limón mexicano.



Figura 3. Marcaje de árboles de limón mexicano con síntomas de HLB.

De estos árboles se tomaron brotes vegetativos tiernos, menores a 3 cm de longitud. Los brotes cortados, al igual que frutos cítricos una vez cosechados, sufren pérdidas de peso por respiración y progresivas deterioraciones, como consecuencia de acciones bacterianas y fúngicas y según las condiciones de temperatura y humedad del ambiente. Tales efectos perjudican el aroma, por lo que una vez cortados los brotes, unos pocos milímetros por debajo del cáliz, se cubrieron del tallo con una capa selladora a base de cera de abeja para prevenir estos cambios y deterioros por la herida, así como para reducir al mínimo la pérdida de agua (Flamini *et al.*, 2007). Las muestras fueron trasladadas inmediatamente en cámara seca, la cual consistió en cubrirlas con toallas de papel y colocadas en bolsas de polietileno con dispositivo de sellado, debidamente etiquetadas y transportadas en hielera con gel refrigerante (SENASICA, 2010). De la misma manera se tomaron muestras de hojas maduras de árboles asintomáticos y sintomáticos (de las mismas ramas donde se tomaron los brotes) para confirmar presencia o ausencia de HLB por medio de PCR.

2.2. Análisis de laboratorio

En el laboratorio de Ecología del Departamento de Biología-Centro Básico de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, los brotes se separaron por tamaño tomando sólo aquellos menores a 3 cm de longitud, y con un pincel fueron retiradas las ninfas o huevos de *D. citri* que podían traer los brotes.

2.2.1. Recolecta de volátiles por SPME

Se retiró la capa de cera del tallo de las muestras (brotes) para no contaminar el análisis con volátiles de la propia cera. Se pesó 1 gr de cada muestra en una balanza analítica (Ohaus Explorer® Pro, Pine Brooke, NJ, USA), y se estabilizaron a temperatura ambiente por 20

segundos, pasado este tiempo se colocaron en viales Agilent® de 10 ml para SPME (Solid Phase Micro Extraction por sus siglas en ingles), los cuales fueron debidamente sellados con un septum para alcanzar la presión de equilibrio (Figura 4).



Figura 4. Brotes colocados en viales Agilent® de 10 ml para SPME.

La recolecta se llevó a cabo usando una fibra de SPME de polidimetilsiloxano (57300-U), recubierta con 100 μm de espesor de película (SUPELCO®, Toluca, Edo. de México), para compuestos con coeficientes de partición bajos y de poco espesor (Figura 5). La fibra fue previamente acondicionada en un puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (CG) por 30 min a 250 °C para asegurar su limpieza. Una vez acondicionada la fibra, solamente fueron necesarios 5 minutos para limpiarla después de cada análisis. Para conocer el tiempo óptimo de adsorción de los volátiles sobre la fibra de SPME, una vez insertada la aguja en el septum y expuesta la fibra, se valoraron diferentes tiempos de captura que fueron a un rango de 0.3, 1, 2 y 5 h. Con el análisis posterior se observó que el tiempo de captura no influye en la resolución y abundancia de los compuestos, por lo que se optó por un tiempo de 1 h de captura para asegurar la extracción de compuestos.



Figura 5. Fibra para SPME de polidimetilsiloxano.

Al terminar el tiempo de extracción, se retiró la fibra del vial, con los compuestos volátiles adsorbidos y se transfirió al puerto de inyección del CG, para ser analizados inmediatamente. Este proceso se realizó con diez repeticiones por tratamiento en las mismas condiciones (Cuadro 1). También se realizó un blanco de método que consistió en el análisis del control (vial sin muestra), de columna y de fibra, empleando el mismo proceso analítico para determinar si existía contaminación indirecta del ambiente del laboratorio o de los viales utilizados y descartar del estudio los volátiles que pudieran ser contaminantes (Figura 6, 7 y 8).

Cuadro 1. Tratamientos usados para la captura de volátiles de brotes con diez repeticiones cada uno.

Limón persa		Limón mexicano		Control
1	2	3	4	5
*BAA	**BAS	BAA	BAS	Vial (vacío)

*BAA=Brotes de árboles asintomáticos

**BAS=Brotes de árboles sintomáticos

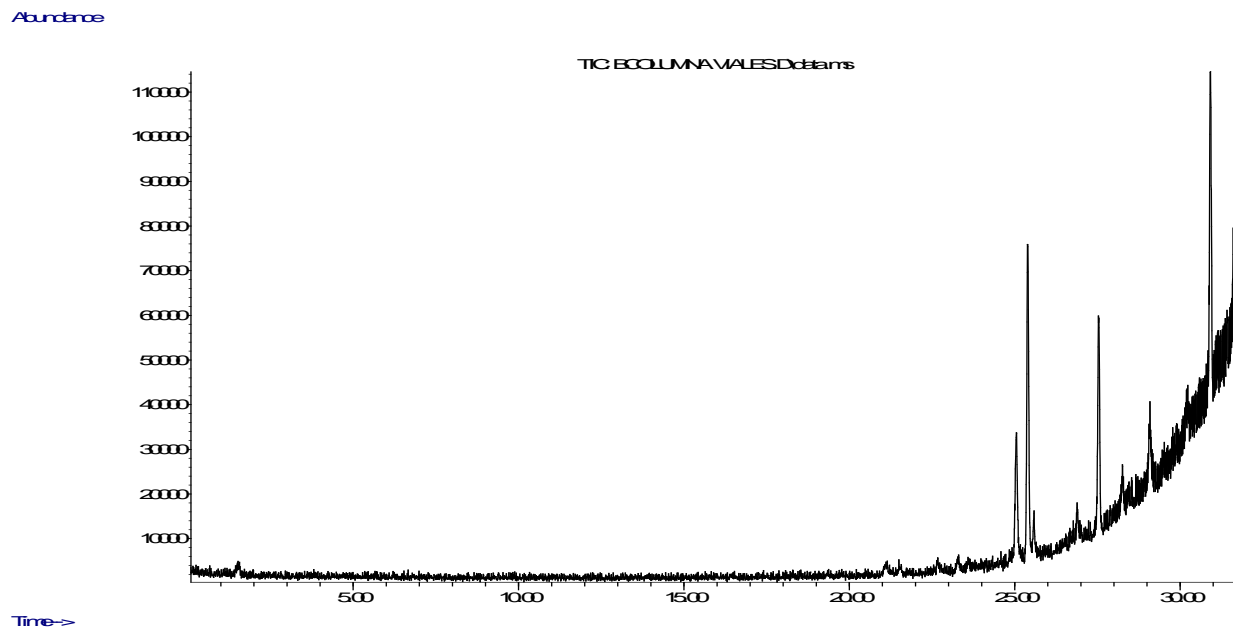


Figura 6. Cromatograma. Blanco de control (vial). TIC: BCOLUMNA.D\data.ms

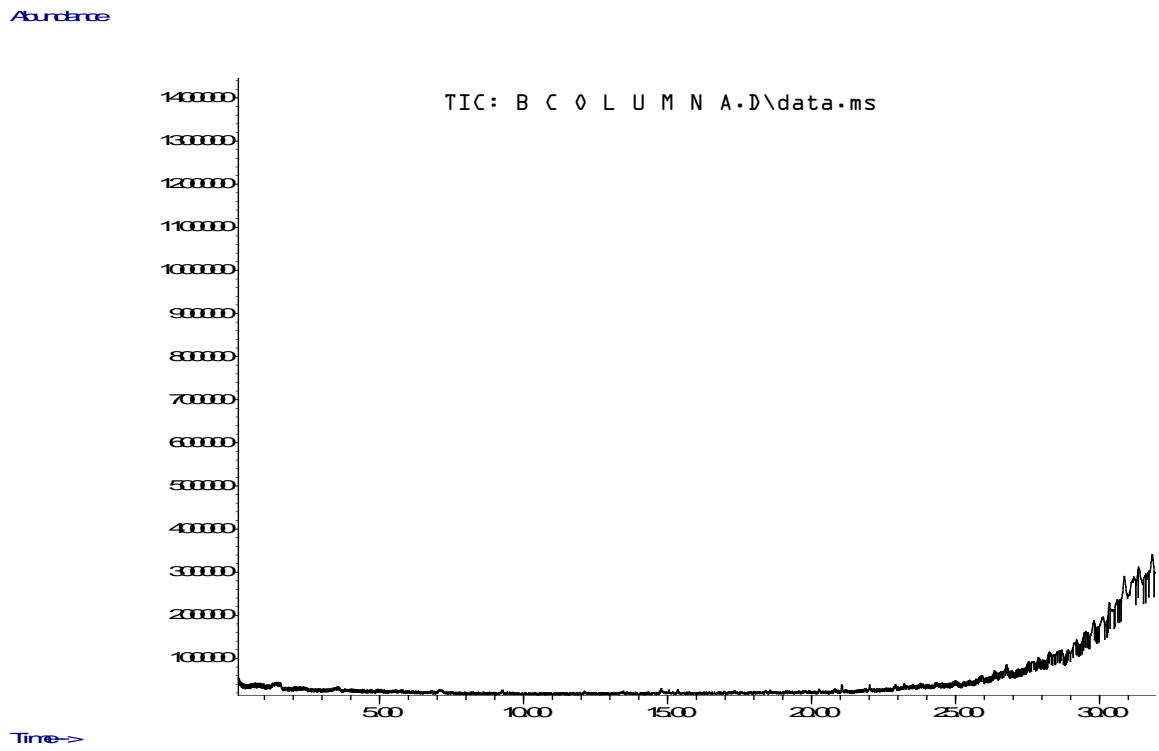


Figura 7. Cromatograma. Blanco de columna.

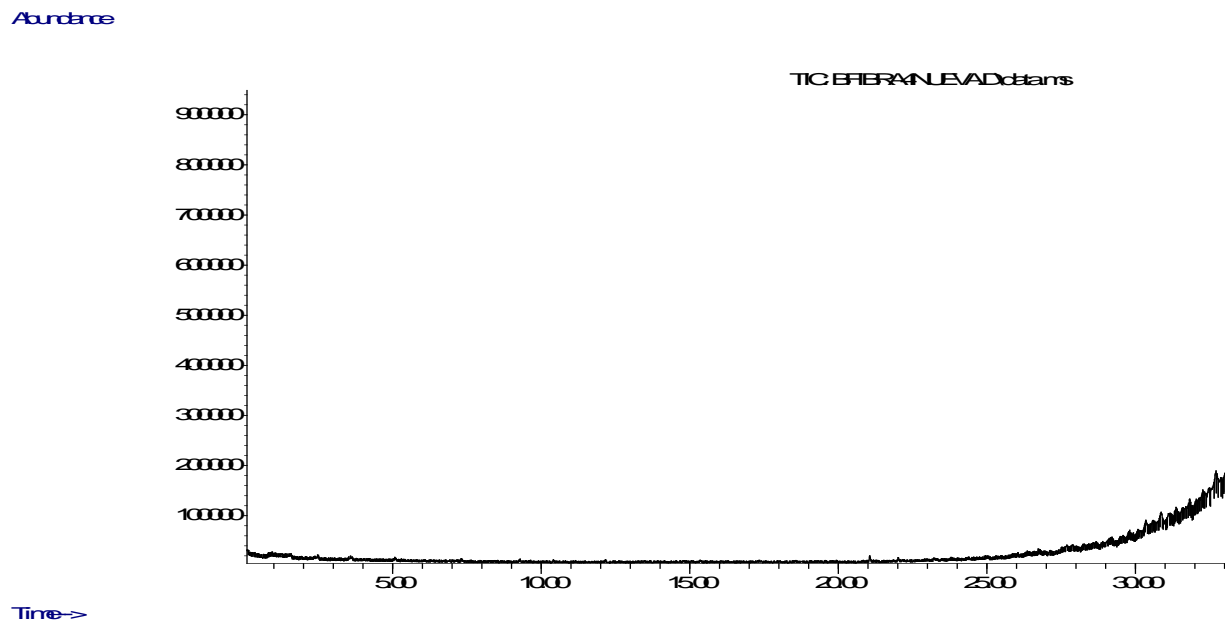


Figura 8. Cromatograma. Blanco de fibra.

2.2.2. Separación e identificación de compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles recolectados de cada uno de los tratamientos mediante SPME, se analizaron en un Cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (CG-DSM modelo 6850 y 5973C; Agilent®, Santa Clara, CA, USA) (Figura 9). Se ajustó el método de instrumentación descrito por Patt y Sétamou (2010), para la separación cromatográfica de la muestra. Se utilizó una columna DB-WAX (Agilent®, Folsom, CA, USA) de methylsilicon (30 m de longitud, 0.320 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de grosor de película), se usó helio como gas acarreador a un flujo de 2 mL/min, las temperaturas usadas fueron: puerto de inyección 250 °C en modo splittles, del auxiliar 280 °C y el programa de temperaturas del horno inicial de 50 °C, con una rampa de 5 °C/min hasta 190 °C. El tiempo de análisis fue de 30 minutos.

La identificación de cada compuesto se realizó comparando los espectros de iones generados de acuerdo a su masa/carga (m/z) con los de la biblioteca NIST V 2002 (National Institute of Standard and Technology).



Figura 9. Cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (CG-DSM).

2.2.2.1. Calibración del instrumento

Para el desarrollo del análisis, se calibró el instrumento (CG/DSM), para esto se realizó una calibración interna usando como referencia el estándar perfluorotrimetil amina (PFTBA), el cual se verificó que cumpliera con las abundancias de las masas 69, 219 y 502, una vez que el instrumento paso con estas pruebas se procedió al análisis de las muestras.

2.2.2.2. Discriminación cualitativa entre compuestos de los diferentes tratamientos.

Para esto, una vez identificados los compuestos, cada uno se comparó entre tratamientos (BAA y BAS) de los dos especies de limón, tomando como referencia las abundancias relativas de cada

pico y los tiempos de retención. La abundancia relativa de cada compuesto se expresó en porcentaje de pico, relativo al total de área del pico (Lin *et al.*, 2010).

2.2.3. Semicuantificación

La semicuantificación se llevó a cabo mediante la correlación del área de cada compuesto volátil identificado en el Cromatograma versus una concentración conocida de un estándar puro (Terpeno) de características químicas similares a los volátiles encontrados para determinar la abundancia y concentración (González-Palomares *et al.*, 2009). Se tomó como referencia el estándar D-Limoneno con 96% de pureza (Sigma-Aldrich® Toluca, Edo De México) a una concentración de 10 µg mL⁻¹, ya que fue el compuesto encontrado de forma más abundante en todas las muestras y compartía las mismas propiedades químicas con los demás compuestos, se inyectó al CG 1µL de esta disolución. Las áreas de los picos cromatográficos de cada uno de los compuestos de las muestras se compararon con el área reportada para el estándar conocido (Mahecha, 2010).

Las concentraciones de cada uno de los compuestos se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$CX = CA * \frac{AX}{AA}$$

Dónde:

CX: Concentración del compuesto de interés x (µg mL⁻¹);

CA: Concentración del estándar conocido, D-limoneno (µg mL⁻¹);

AX: Área del compuesto de interés x (cuentas);

AA: Área del estándar interno, D-limoneno (cuentas).

2.2.4. Análisis estadístico

Se realizó una Prueba de t de student para muestras independientes de dos colas con un $\alpha/2=0.025$ para comprobar la H_0 : las abundancias de compuestos de BAA vs BAS de limón y mexicano son iguales sin importar la presencia del HLB contra la H_a : que las proporciones de ciertos compuestos en brotes de ambos tratamientos de limón persa y mexicano son diferentes. Para esto se eligieron los compuestos que presentaron mayor variación en sus abundancias o áreas bajo la curva entre ambos tratamientos tanto de BAA y AAS de limón persa y mexicano. Los valores de abundancia TIC (corriente total de iones) se transformaron usando $(y+0.5)^{1/2}$ para asumir los supuestos de normalidad.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En estudios diversos se han analizado los compuestos volátiles de brotes de diferentes especies de Rutaceas hospedantes de *D. citri* vector del HLB y la respuesta del vector a cada una de estas mezclas con la finalidad de entender la función de estos volátiles en la selección de suplanta hospedante (Robbins *et al.*, 2012; Patt y Sétamou 2010; Wenninger *et al.*, 2009). En este estudio informamos la presencia de 41 compuestos que fueron detectados, separados e identificados en ambos tratamientos de brotes de limón persa y limón mexicano sintomáticos y asintomáticos al HLB, utilizando la técnica de extracción de SPME estático y el análisis cromatográfico de gases acoplado a un espectrómetro de masas. En la figura 10, se presenta el perfil cromatográfico obtenido de dicho análisis para los tratamientos de limón persa, en este se observa la presencia de ciertos picos que se caracterizan por su abundancia en cada tratamiento, además de observarse diferencias en las abundancias entre brotes sintomáticos y asintomáticos al HLB. Para ambos tratamientos se observó que los compuestos más abundantes eluyeron al minuto 7.22, 8.53 y

19.13, siendo los compuestos de los brotes sintomáticos los que presentaron mayor abundancia y área bajo la curva.

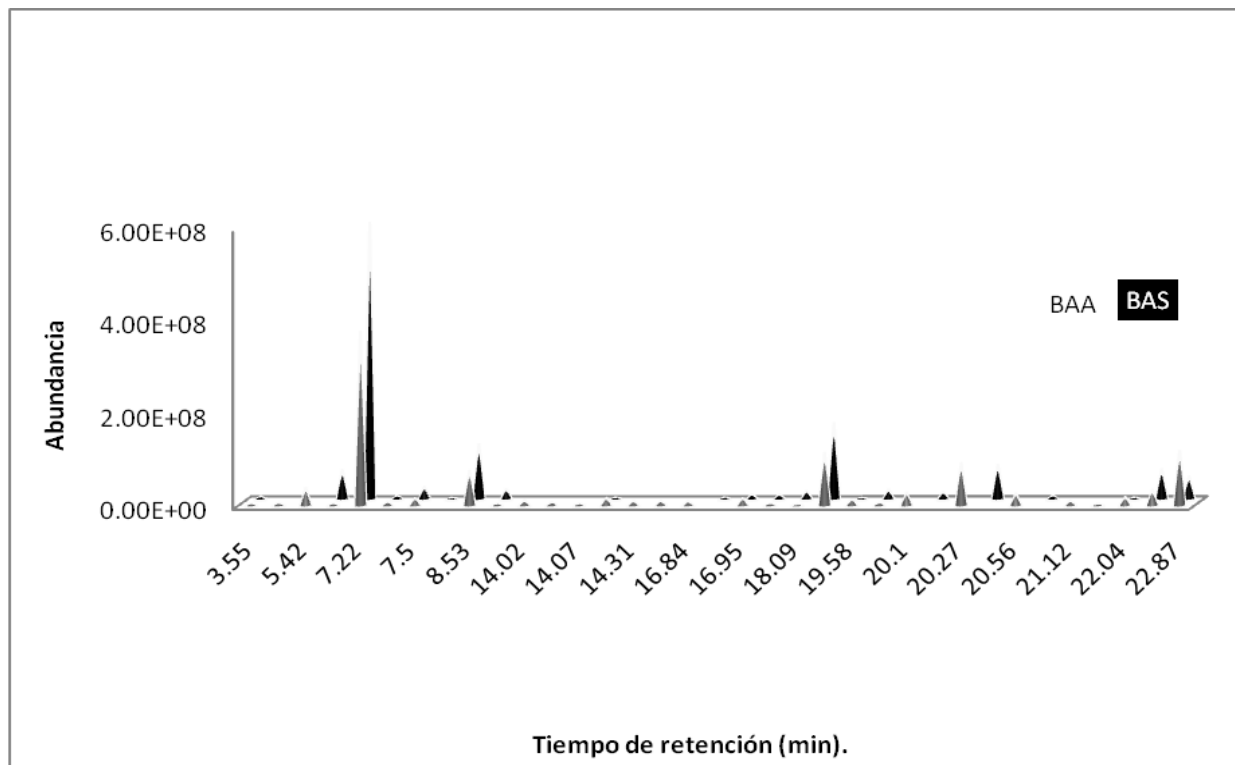
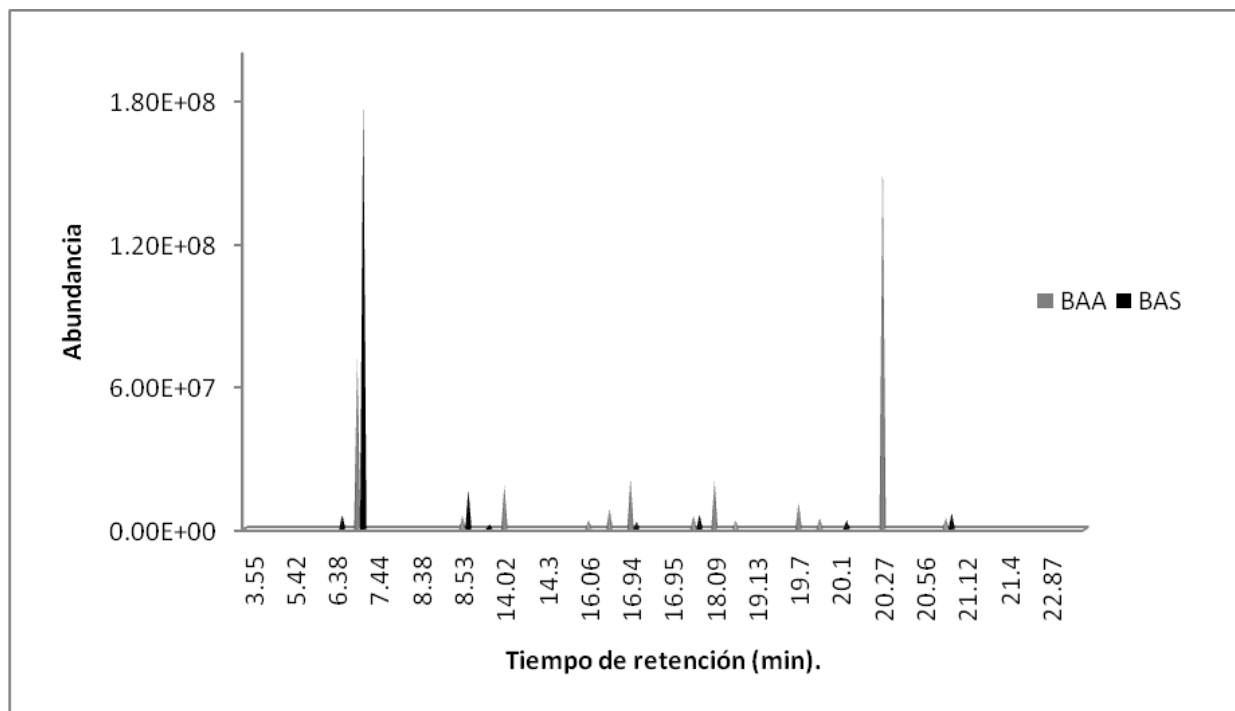


Figura 10. Perfil cromatográfico obtenido de brotes de limón persa, asintomáticos (BAA) vs sintomáticos (BAS).

En la figura 11, se presenta el perfil cromatográfico obtenido para limón mexicano, en estos brotes se observó menor número de compuestos volátiles comparados con limón persa, además de observarse diferencias en la abundancia entre brotes sintomáticos y asintomáticos. Los compuestos con mayor abundancia eluyeron al minuto 7.22 para ambos tratamientos y sólo para el caso de BAA se observó un pico prominente al minuto 20.27.



En la figura 11. Perfil cromatográfico obtenido de brotes de limón mexicano, asintomáticos (BAA) vs sintomáticos (BAS).

2.3.1. Identificación de compuestos en brotes de limón persa y mexicano

En general de los 41 compuestos identificados, 35 se presentaron en limón persa y 16 en limón mexicano (cuadro 2). Los brotes asintomáticos de limón persa presentaron mayor número de compuestos, es decir 30, en comparación con brotes sintomáticos que presentaron 22 compuestos. En brotes de limón mexicano se presentaron menos compuestos en comparación con limón persa, sin embargo se repitió el mismo patrón entre BAA y BAS, ya que BAA presentaron 13 compuestos en comparación con los BAS en los cuales sólo se observaron 8. Los compuestos identificados resultaron ser una mezcla de terpenos. Entre los compuestos volátiles más comunes estuvieron el D-limoneno, cariofileno, β -ocimeno, β -citral, lavandulol y geraniol, los cuales se presentaron tanto en BAA y BAS de ambas variedades de limón, sin embargo la concentración de cada uno de estos fue diferente en cada variedad de limón y en cada tratamiento. Los resultados

obtenidos para BAA de limón persa y mexicano coinciden con los obtenidos por Robbins *et al.*, 2012, él encontró que el (E)- β -ocimeno y D-limoneno fueron los compuestos más abundantes en brotes de seis especies de Rutaceas usando la misma técnica SPME. Sin embargo, la presencia de estos compuestos no se limita a brotes, ya que Mann *et al.*, 2012, reporta que también son los más abundantes en follaje y frutos.

Cuadro 2. Compuestos identificados y sus respectivas abundancias en BAA y BAS al HLB en limón persa y mexicano.

N°	Compuesto	tr (min.)	Abundancia (% área bajo la curva)			
			Limón persa		Limón mexicano	
			*BAA	**BAS	*BAA	**BAS
1	α -pineno	3.55	0.53	0.50		
2	sabineno	5.42	0.59			
3	β -thujeno	5.42	3.44			
4	β -mirceno	6.38	0.52	4.88		
5	β -pineno	6.38				2.62
6	D-limoneno	7.22	33.38	45.73	21.62	80.78
7	β -phellandreno	7.44	0.89	0.63		
8	eucaliptol	7.5	1.58	2.10		
9	γ -terpineno	8.38		0.27		
10	β -ocimeno	8.53	7.25	10.82	1.62	7.30
12	σ -elemeno	14.00				0.81
13	δ -elemeno	14.02	1.09		5.51	
14	careno	14.06	0.78			
15	terpineol	14.07	0.48			
16	citronellal	14.3	1.58	0.34		
17	β -citronellal	14.31	1.01			
18	linalool	16.06	1.03		1.12	
19	α -bergamoteno	16.84	0.96		2.50	
20	elemeno	16.94			6.35	1.32
21	methylgeranato	16.94		0.35		
22	β -elemeno	16.95	1.55	0.85		
23	cariofileno	17.11	0.54	0.86	1.63	2.63
24	γ -elemeno	18.09	0.35	1.40	6.06	
25	α -cariofileno	18.8			1.13	
26	β -citral	19.13	10.18	12.64		
27	α -terpineol	19.58	1.39	0.26		
28	D-germacreno	19.7	0.69	1.63	3.31	
29	α -bisaboleno	20.1			1.40	

N°	Compuesto	tr (min.)	Abundancia (% área bajo la curva)			
30	β-bisaboleno	20.1	2.61			1.64
31	nerol acetato	20.14		1.24		
32	citral	20.27	8.20		46.37	
33	α-citral	20.27		5.74		
34	α-farneseno	20.56	2.45			
35	β-farneseno	20.58			1.38	2.90
36	citronellol	21.12		0.64		
37	β-citronellol	21.12	1.06			
38	perillal	21.4	0.47			
39	isogeraniol	22.04	1.76	0.34		
40	geraniol	22.87	3.11	4.99		
41	lavandulol	22.87	10.53	3.81		
	Total		100.00	100.00	100.00	100.00

*BAA= Brotes de árboles asintomáticos
**BS= Brotes de árboles sintomáticos
tr= tiempo de retención

De forma general se caracterizaron dos grupos de compuestos; el primero formado por compuestos que aumentaron su concentración en BAS y los que disminuyeron su concentración en BAS en comparación con BAA, este patrón se observó en ambas variedades de limón (Cuadro 3). El análisis de volátiles en los cultivares de limón persa y mexicano reveló la constancia de tres compuestos en cada tratamiento de BAA y BAS al HLB, los cuales fueron el (1) D-limoneno, (11) β-ocimeno y (23) cariofileno (Figuras 12, 13 y 14), y estos se presentaron en mayor concentración en BAS, y el citronellal, α-terpineol, β-elemeno y elemeno que disminuyeron en BAS. En el presente estudio el D-limoneno fue el compuesto con mayor concentración siendo de 80.78 % en BAS de limón mexicano. Flamini *et al.*, (2007) mencionan que en hojas jóvenes de *Citrus limón* el principal compuesto volátil es el D-limoneno, con más de 62% de todos los volátiles, y atribuye su alta concentración a la defensa de la hojas jóvenes que son más vulnerable, e indican que este compuesto actúa como repelente contra fitófagos; en el presente

trabajo los niveles de este compuesto fueron de 33.38 y 26.62% en BAA y de 45.73 y 80.78 en BAS en ambos tratamientos respectivamente. El cambio encontrado en la concentración y número de volátiles entre BAA y BAS de ambas variedades podrían ser los responsables del comportamiento del vector, ya que se ha observado que las hembras prefieren alimentarse de brotes con presencia de HLB y ovipositar en brotes aún sin la presencia de este (Mann *et al.*, 2012.), actuando de esta manera como vectores eficientes.

Cuadro 3. Concentración ($\mu\text{g/mL}$) de los compuestos identificados en un gr de brotes vegetativos.

N°	Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)			
		Limón persa		Limón mexicano	
		*BAA	**BAS	*BAA	**BAS
1	α -pineno	0.08		0.08	
2	sabineno	0.08			
3	β -thujeno	0.49			
4	β -mirceneno	0.07		0.81	
5	β -pineno				0.07
6	D-limoneno	4.76	7.55	0.91	2.29
7	β -phellandreno	0.13	0.10		
8	eucaliptol	0.23	0.35		
9	γ -terpineno		0.04		
10	β -ocimeno	0.96	1.51	0.07	0.21
12	σ -elemeno				0.02
13	δ -elemeno	0.16		0.23	
14	careno	0.11			
15	terpineol	0.07			
16	citronellal	0.23	0.06		
17	β -citronellal	0.14			
18	linalool	0.15		0.05	
19	α -bergamoteno	0.14		0.11	
20	elemeno			0.27	0.04
21	methylgeranato		0.06		
22	β -elemeno	0.22	0.14		
23	cariofileno	0.08	0.14	0.07	0.07
24	γ -elemeno	0.05	0.23	0.26	
25	α -cariofileno			0.05	
26	β -citral	1.45	2.09		
27	α -terpineol	0.20	0.04		
28	D-germacreno	0.10	0.27	0.14	

N°	Compuesto	Concentración (µg/mL)			
		Limón persa		Limón mexicano	
		*BAA	**BAS	*BAA	**BAS
29	α-bisaboleno			0.06	
30	β-bisaboleno	0.37			0.05
31	nerol acetato		0.20		
32	citral	1.17		1.96	
33	α-citral		0.95		
34	α-farneseno	0.35			
35	β-farneseno			0.06	0.08
36	citronellol		0.11		
37	β-citronellol	0.15			
38	perillal	0.07			
39	isogeraniol	0.25	0.06		
40	geraniol	0.44	0.82		
41	lavandulol	1.50	0.63		

*BAA= Brotes de árboles asintomáticos
**BS= Brotes de árboles sintomáticos

Espectros de iones de los compuestos constantes en cada muestra.

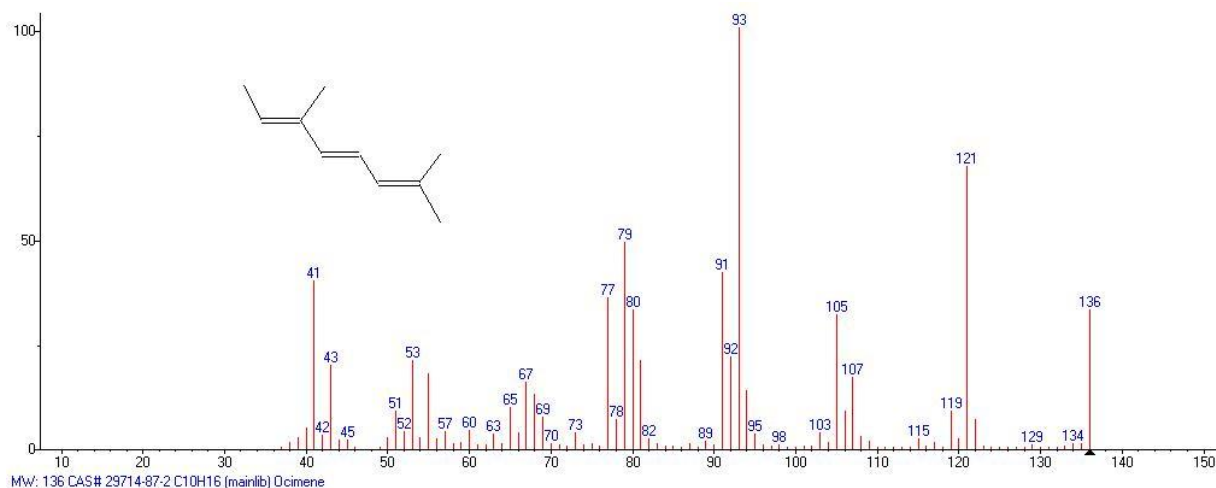


Figura 12. Espectro de masas de B-ocimeno.

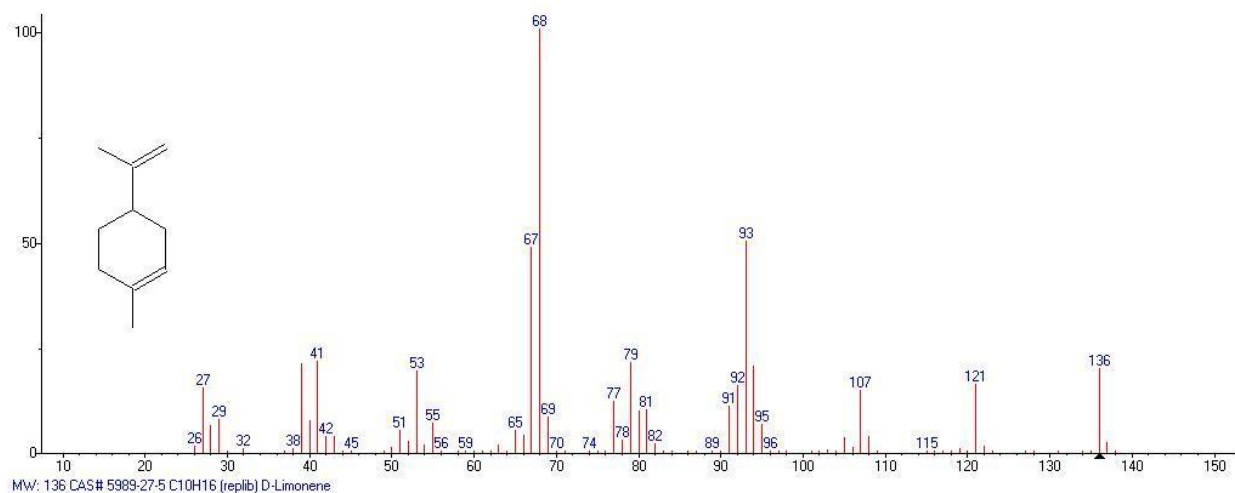


Figura 13. Espectro de masas de D-limoneno.

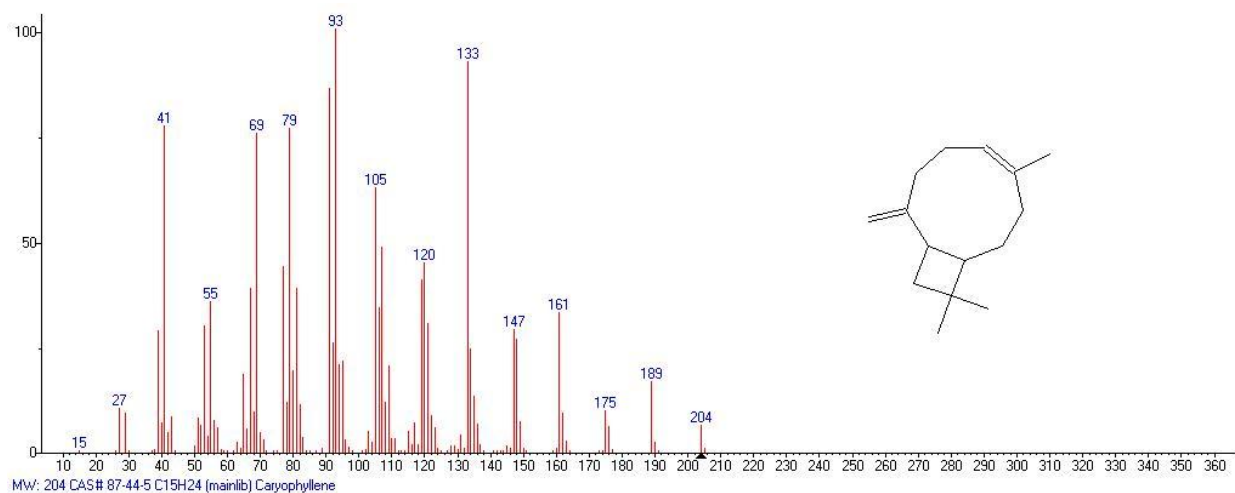


Figura 14. Espectro de masas de cariofileno.

2.3.2. Análisis de compuestos con mayor variación cromatográfica en limón persa y mexicano

En el cuadro 4, se observa la comparación media de las áreas bajo la curva de los compuestos que presentaron mayor variación cromatográfica, observándose diferencia altamente significativas ($\alpha/2=0.025$, $n=6$, $gl=4$) cuando se compararon entre ambos tratamientos. Los compuestos de

limón persa que fueron más susceptibles entre ambos tratamientos fueron el β -ocimeno, citronellal, y α -terpineol, esto se definió con la tasa de cambio y la significancia entre ambos tratamientos.

Cuadro 4. Comparación de volátiles entre BAA vs BAS de Limón persa .

Compuesto	Promedio Abundancia BAA	Promedio Abundancia BAS	Significancia	Proporción de cambio entre BAA/BAS
cariofileno	6 129 372	11285485.7	0.006837384**	1.84
D-limoneno	377 238 398.7	575373641	0.003196226**	1.52
β -ocimeno	5 539 443	22191208	0.000831039**	4
citronellal	17 856 988.5	4 390 486	0.125544146	4.07
α -terpineol	15 749 425	3344690.67	5.53402E-10**	4.71
β -elemeno	17 539 695.5	11062582	0.083243579	1.58

*Área bajo la curva de los picos cromatográficos.

En el cuadro 5, se presentan los resultados obtenidos de las comparaciones medias de la abundancias de tres compuestos en limón mexicano, la tendencia fue similar al observado en limón persa, tres compuestos aumentaron sus áreas bajo la curva en brotes con síntomas de HLB en los cuales se observó que el más sensible fue β -ocimeno, seguido del D-limoneno sin embargo, la abundancia del cariofileno no se diferenció significativamente entre BAA y BAS. El β -ocimeno y el D-limoneno han demostrado ser atrayentes de *D. citri*, y se ha observado una respuesta positiva hasta dosis de 100 μ g (Mann *et al.*, 2012), por lo que el aumento de estos compuestos en BAS pueden estar influyendo en su atracción. Los cambios observados en la concentración y número de compuestos en *Citrus latifolia* y *C. aurantifolia* son causados directamente por el HLB, esto coincide con lo reportado por Mann *et al.*, (2012), quien encontró que *D. citri* responde en mayor proporción a plantas infectadas con ALS versus plantas sanas de *C. aurantium* y *C. sinensis*.

Cuadro 5. Comparación de volátiles entre BAA vs BAS de Limón mexicano.

Compuesto	Promedio Abundancia BAA	Promedio Abundancia BAS	Significancia	Proporción de cambio entre BAA/BAS
Cariofileno	5451881.25	5908868	0.254350875	0.92
D-limoneno	72 321 161.5	181265582	8.34563E-06**	2.5
β-ocimeno	5 413 639	16377058.3	1.09027E-06**	3.02

Con estos resultados se observa que la condición de las plantas asintomáticas y sintomáticas al HLB influyen en la composición y cantidad de volátiles liberados, al respecto Hare (2011), menciona que las plantas liberan estos compuestos volátiles en respuesta al daño sufrido por algún herbívoro y que la composición de la mezclas liberadas pueden ser muy variadas dependiendo del agente que cause el daño. Patt y Sétamou (2010) mencionan que los cambios en la liberación de terpenos volátiles en brotes de Rutáceas pudiera estar relacionada con algunas interacciones entre planta-insecto y planta-patógeno, por lo que los cambios observados en la composición de volátiles se atribuye directamente a los ocasionados por el HLB. Las infecciones ocasionadas por (LAS) inducen la liberación de señales volátiles específicas, haciendo que la planta sea más atractiva para el vector (Mann *et al.*, 2012). En frutos de *Capsicum annuum* L, se han caracterizado los compuestos volátiles de frutos infectados por *Coletotrichum* spp, frutos sanos y con daño mecánico encontrando que el número y cantidad de compuestos son diferentes en cada tratamiento y que este cambio puede ser usado como un índice de calidad (In-Kyung *et al.*, 2007). Por lo tanto la diferencia encontrada en los volátiles de BAA y BAS en limón persa y mexicano representa una significancia biológica, que podría ser usada para tener detecciones tempranas de la enfermedad. Los resultados encontrados en este trabajo difieren de los obtenidos por Mann *et al.*, (2012), ya que nuestros resultados indican un aumento en la concentración de

ciertos compuestos en brotes con síntomas y los resultados de Mann indican lo contrario, estas diferencias podrían deberse principalmente a que Mann *et al* (2012), estudiaron *Citrus aurantium* y *C. sinensis* y en esta investigación *C. latifolia* y *C. aurantifolia* en donde ya ha sido demostrado en otras especies de Rutáceas que el número y la concentración de volátiles puede variar (Robbins *et al.*, 2012).

2.4. CONCLUSIONES

Los brotes de limón persa, tanto de árboles asintomáticos como sintomáticos, producen mayor número de compuestos volátiles en comparación con brotes de limón mexicano. Además se demostró que existe un efecto en la producción de volátiles entre brotes asintomáticos y sintomáticos al HLB en ambos tratamientos. Se determinó que compuestos como el D-limoneno, β -ocimeno y cariofileno son candidatos notables para ser estandarizados y usados como posibles indicadores de la presencia de HLB, ya que estos tres aumentan significativamente su concentración en BAS. Se encontraron compuestos como el citronellal, lavadulol, β -elemeno, α -terpineol para limón persa y elemeno para limón mexicano a diferencia del primer grupo, estos tienden a disminuir su concentración cuando presentan síntomas de HLB. Por lo tanto el análisis por SPME estático y CG/MS, pueden ser una herramienta valiosa y oportuna para el análisis de perfiles de compuestos volátiles en brotes, para tener detecciones tempranas antes de ser detectadas con pruebas moleculares. Por lo que, debería explorarse más afondo como una herramienta de diagnóstico.

3. LITERATURA CITADA

- Adams, R. P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Agelopoulos, N. G. and J. A. Pickett. 1998. Headspace analysis in chemical ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. *J. Chem. Ecol.* 24:1161-1172.
- Alemán, J., H. Baños, y J. Ravelo. 2007. Diaphorina citri y la enfermedad Huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. *Rev. Prot. Veg.* 22: 154-165.
- Aubert, B. 1987. Trioza erythrae Del Guercio and Diaphorina citri Kuwayama (Homoptera: Psyllidae), the two vectors of citrus greening disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 42: 149-162.
- Ayres, J. 2010. Situación actual del HLB en la provincia de San Pablo. 2do Seminario Internacional sobre HLB, Mérida, México.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: A Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. *Journal of Plant Pathology.* 88(1):7-37.
- Brlansky, R. H. and M. E. Rogers. 2007. Citrus Huanglongbing: Understanding the Vector-Pathogen Interaction for Disease Management. Online APS net Features. Consultado en diciembre, 2012. En:<http://www.apsnet.org/online/feature/HLB/>
- Colelim. 2002. Consejo Estatal del Limón Mexicano de Colima. Diagnóstico del sistema producto limón mexicano en Colima.
- Dewulf, J, H. Van Langenhove and G. Wittmann. 2002. Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* 21:637-646.
- Díaz, C. C. 2010. Naranja dulce, limón partido. *Rev. Claridades Agropecuarias.* 197: 32-39.

Dudareva, N., E. Pichersky and J. Gershenzon. 2004. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* 135:1893-1902.

Esquivel-Chávez, F., G. Valdovinos-Ponce, G. Mora-Aguilera, R. Gómez-Jaimes, J. J. Velázquez-Monreal, y J. I. López-Arroyo. 2010. Análisis histológico y epidemiológico del limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del hlb (Huanglongbing). En: memoria del 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. pp: 99-103.

FAOSTAT. 2013. FAO Dirección de Estadística, 2013. Producción de cítricos en 2010. Consultado el 15 de enero de 2013. En: http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#VISUALIZE

Fernández, M. e I. Miranda. 2005. Comportamiento de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Parte III: Relación entre el ciclo de vida y el brote vegetativo foliar. *Rev. Protección Veg.* 20: 161-164.

Flamini, G., P. L. Cioni and I. Morelli. 2003. Use of solid-phase microextraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. *J. Chromatogr. A.* 998:229-233.

Flamini, G., M. Tebano and P. L. Cioni. 2007. Volatiles emission patterns of different plant organs and pollen of *Citrus limón*. *Anal. Chim. Acta.* 589: 120-124.

Flores-Sánchez, J. L., G. Mora-Aguilera, E. Loeza-Kuk, G. Acevedo-Sánchez, G. Díaz-Padilla, N. Ruiz-García, J. I. López-Arrollo, P. Rivas-Valencia, A. Novelo-Cocón, P. López-Sánchez, y F. Sánchez-Rebolledo. 2010. Análisis Estructural de Focos y Gradientes de

Dispersión del Huanglongbing (HLB) de los cítricos, en la Península de Yucatán. En: memoria del 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. pp: 104-118.

Garnier, M. S., E. Jagoueix, R. P. Cronje, F. G. Le Roux, M. J. Bové. 2000. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of ‘*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*.’ *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2119-2125.

González, J. E. and N. D. Keshavan. 2006. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol. and Molec. Biology Rev.* 70:859–875

González-Palomares, S., M. Estarrón-Espinosa, J. F. Gómez-Leyva and I. Andrade-González. 2009. Effect of the temperature on the spray drying of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Plant Foods for Human Nutrition.* 64:62-67.

Gottwald, T. R., J. V. da Graça and R. B. Bassanezi. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online: *Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.

Gottwald, T.R. 2010. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. *An. Rev. Phy.* 48: 119-139.

Grafton-Cardwell, E. E., K. E. Godfrey, M. E. Rogers, C. C. Childers and P. A. Stansly. 2006. Asian Citrus Psyllid. Publication 8205. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Consultado en Dic, 2012. En: <http://anrcatalog.ucdavis.edu/pdf/8205.pdf>

- Halbert, S. E. and C. A. Núñez. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. *Florida Entomologist* 87: 401-402.
- Halbert, S. E. and K. L. Manjunath, 2004. Asian citrus psyllids (Sternorhyncha: Psillidae) and greening disease of citrus a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87: 330-353.
- Hall D. G. and L. G. Albrigo. 2007. Estimating the relative abundance of flush shoots in citrus with implications on monitoring insects associated with flush. *Hort Sc.* 42: 364-368.
- Harborne, J. B. 2001. Secondary metabolites: attracting pollinators. *In: Encyclopedia of Life Sciences* <http://www.els.net/1-5>.
- Hare, J. D. 2011. Ecological role of volatiles produced by plants in response to damage by herbivorous insects. *Ann. Rev. Entomol.* 56:161–80.
- Irey, M. 2010. Experiences of one Florida grower with the management of Huanglongbing – Success Over Time. 2º Taller internacional sobre el Huanglongbing y el psilido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México.
- Liu, Y. H., and J. H. Tsai. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Ann. Applied Biol.* 137: 201-216.

- López-Arroyo, J. I., M. A. Peña, M. A. Rocha Peña, y J. Loera. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae). En: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., Méx. pp. C68
- Lord, H. and J. Pawliszyn. 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chrom.*, 885:153–193.
- Mahecha, M. C. 2010. Actividad antioxidante y antibacteriana de aceites esenciales extraídos de hojas y frutos de *Siparuna sessiliflor*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Bogotá. Tesis de Maestría.
- Mara, H. y M. Peyrou. 2010. La citricultura de Argentina y Uruguay puede escapar a la amenaza del HLB. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Departamento de Biología Molecular. Informe Ejecutivo de Consultoría. Consultado en Dic, 2013. En: www.iibce.edu.uy/DIVULGACION/HLB.pdf
- Mann, R. S., J. G. Ali, J. G. Hermann, S. L. Tiwari, K. S. Pelz-Stelinski, H. T. Alborn and H. T. Stelinski. 2012. Induced release of plant-defense volatiles "Deceptively" attracts insect vector to plants infected with a bacterial pathogen. *Plos Pathogen*. 8:1-13.
- Marín, L. J. C. y C. L. Céspedes. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al Agro. *Fitotecnia Mexicana* 30: 327-351.
- Martínez, Y., R. Llauger, L. Batista, M. Luis, A. Iglesia., C. Collazo, I. Peña, J. C. Casín, J. Cueto, and L. M. Tablada. 2008. First report of Candidatus 'Liberibacter asiaticus' associated with Huanglongbing in Cuba . *New Disease Reports* 18:7

- Matich, A. J., D. D. Rowan and N. H. Banks. 1996. Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles. *Anal. Chem.* 68:4114-4118.
- Matos, L., M. E. Hilf and J. Camejo. 2009. First Report of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Associated with Citrus Huanglongbing in the Dominican Republic. *Plant Disease* 93:668
- Millar, J. G. and K. F. Haynes. 1998. Preparation, cleanup and preliminary fractionation of extracts. *In: Millar J. G and K. F. Haynes (eds.) Methods in Chemical Ecology Volume 1. Chemical Methods.* Kluwer Academic Publishers. USA. pp:8-19.
- Moran, V. C. and P. B. Buchan. 1975. Oviposition by the citrus psylla, *Trioza erytreae* (Homoptera: Psyllidae), in relation to leaf hardness. *Ent. Exp. & Appl.* 18: 96-104.
- NOM-011-FITO-1995. 1996. Norma Oficial Mexicana, Por la que se establece la cuarentena exterior para prevenir la introducción de plagas de los cítricos. SAGARPA.
- Pacheco, C. J. J., R. J. A. Samaniego y P. A. A. Fontes. 2012. Tecnología para el manejo integrado del Psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en cítricos en Sonora. INIFAP. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Campo Experimental Norman E. Borlaug. Cd. Obregón, Sonora, México. Folleto Técnico N. 88- ISBN 978-607-425-817-2.
- Patt, J. M. and M. Sétamou. 2010. Responses of the asian citrus psyllid to volatiles emitted by the Flushing Shoots of Its Rutaceous Host Plants. *Environ. Entomol.* 39:618-624.

- Pawliszyn, J. 1997. Solid phase microextraction, theory and practice. Wiley-VCH, New York, USA. Libro on line <http://www.amazon.com/Solid-Phase-Microextraction-Theory-Practice/dp/0471190349>
- Pieterse, C. M. J. and M. Dicke. 2007. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends in Plant Science*. 12: 564–569.
- Robbins, P. S., T. A. Rocco, L. S. Lukasz and L.S. Stephen LL. 2012. Volatile Profiles of Young Leaves of Rutaceae spp. Varying In Susceptibility to the Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Flo. Entomol.* 95: 774-776.
- Robles, G. P, A. H. Sánchez y V. I. Delgadillo. 2009. Programa Nacional Para la Detección del Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp) en México. Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA-SAGARPA.
- Robles-González, M. M., J. J. Velázquez-Monreal, M. A. Manzanilla-Ramírez, M. Orozco-Santos, R. Flores-Virgen y V. M. Medina-Urrutia. 2011. Síntomas del Huanglongbing en Limón Mexicano. Primeras observaciones. En: Memoria del 1er. Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 141- 149 p.
- Robles-González, M. M., J. J. Velázquez-Monreal, M. A. Manzanilla-Ramírez, M. Orozco-Santos, R. Flores-Virgen y J. I. López-Arroyo 2011a. Control químico de *Diaphorina citri* en limón mexicano. Insecticidas convencionales, productos alternativos y épocas de aplicación. Folleto Técnico Num. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,

Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacifico Centro. Campo Experimental Tecomán. Colima.

Ruther, J. 2000. Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 890:313-319.

Sagaram, U. S., K. M. De Angelis, P. Trivedi, G. L. Andersen and S. E. Lu. 2009. Bacterial diversity analysis of huanglongbing pathogen-infected citrus, using phylochip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing. *Appl. Environ. Microbiol* 75: 1566–1574.

Schultz, J. C. and H. M. Appel. 2004. Cross-kingdom cross-talk: hormones shared by plants and their insect herbivores. *Ecology*, 85, 70–77.

Sétamou, M. D., J. V. Flores, D. G. French and G. Hall. 2008. Dispersion patterns and sampling plans for *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in citrus. *J. Econ. Entomol.* 101: 1478-1487.

SENASICA. 2010. Protocolo de actuación para la detección del Huanglongbing. Dirección General de Sanidad Vegetal. Dirección de Protección Fitosanitaria.

SENASICA. 2012. Ficha técnica HLB. Huanglongbing. Dirección General de Sanidad Vegetal.

Sistema Coordinado para la vigilancia de plagas reglamentadas y su epidemiología (SCOPE),

SENASICA. 2013. Huanglongbing de los cítricos. Consultado el: 23/05/2013. En: www.senasica.gob.mx

- SUPELCO®, 2012. Guía para solucionar problemas de microextracción en fase sólida. Cómo Localizar y Resolver un Problema. SIGMA-ALDRICH. Consultada en noviembre, 2012. En:http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/SigmaAldrich/General_Information/manual_resoluci.Par.0001.File.tmp/manual_resoluci.pdf
- Tatineni, S., U. S. Sagaram, S. Gowda, C. J. Robertson, W. O. Dawson, T. Iwanami and N. Wang. 2008. *In: Plant Distribution of Candidatus Liberibacter asiaticus as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. Phytopathology 98: 592-599.*
- Teixeira, D., J. L. Danet, S. Eveillard, E. C. Martins, W. C. de Jesus, P. T. Yamamoto, S. A. Lopes, R. B. Bassanezi, A. J. Ayres, D. Saillard and J. Bove. 2005. Citrus huanglongbing in Sao Paulo state, Brazil: PCR detection of the “Candidatus” Liberibacter species associated with the disease. *Mol. Cell Probes 19:171-179.*
- Wenninger, E. J., L. L. Stelinski and D. G. Hall. 2009. Role of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to four different host plants. *Environ. Entomol. 38:225-234.*
- Xu, C. F., Y. H. Xia, K. B. Li and C. Ke. 1988. Further study of the transmission of citrus huanglongbing by a psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. *In: Timmer L.W., S.M. Garnsey and L. Navarro (eds.). Proceedings of 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, Riverside, CA, USA: University of California, Riverside. pp. 243–248.*