

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN BACTERIANA DE
Candidatus Liberibacter asiaticus Y SU EFECTO EN LA
EXPRESIÓN SINTOMÁTICA E HISTOLÓGICA EN CÍTRICOS
AGRIOS Y DULCES E IMPLICACIONES EN EL POTENCIAL DE
INÓCULO**

FABIOLA ESQUIVEL CHÁVEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN BACTERIANA DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN SINTOMÁTICA E HISTOLÓGICA EN CÍTRICOS AGRIOS Y DULCES E IMPLICACIONES EN EL POTENCIAL DE INÓCULO**, realizada por el alumno: **Fabiola Esquivel Chávez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y es aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO




Dr. Gustavo Mora Aguilera

ASESOR



Dr. José Joaquín Velázquez Monreal

ASESOR



Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

ASESOR



Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa

ASESOR



Dr. Emiliano Loeza Kuk

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril 2016

DÍNAMICA DE LA CONCENTRACIÓN BACTERIANA DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN SINTOMÁTICA E HISTOLÓGICA EN CÍTRICOS AGRIOS Y DULCES E IMPLICACIONES EN EL POTENCIAL DE INÓCULO

Fabiola Esquivel Chávez, Dra.
Colegio de Posgraduados, 2016.

Resumen

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLas), bacteria causante del Huanglongbing (HLB), afecta diferencialmente a todas las especies de cítricos. En México, esta enfermedad se presenta en dos vertientes geográficas del país, siendo más prevalente en el Pacífico infectando limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). La expresión de síntomas y las alteraciones histológicas inducidas por CLas son dependientes de la especie citrícola; sin embargo, existe un conocimiento limitado del efecto que tiene la bacteria en la expresión de síntomas en plantas de limón mexicano (Lm), persa (*C. latifolia*) (Lp) y naranja dulce (*C. sinensis*) (Nd) en función de la combinación injerto-portainjerto, por lo que el objetivo fue evaluar tres tipos de combinaciones injerto-portainjerto en la expresión de síntomas, la concentración bacteriana y su efecto a nivel histológico en plantas de cítricos agrios y dulces injertadas en tres patrones. Este trabajo se llevó a cabo en laboratorio e invernadero (INIFAP-C.E. Tecoman) y consistió de tres etapas.

Etapa 1. Se comparó el efecto de la vareta procedente de la fuente de inóculo y la copa de cítricos agrios y dulces bajo el supuesto de un comportamiento diferencial de las combinaciones injerto-portainjerto en detrimento de los cítricos agrios. Tallos de 0.5cm de diámetro de limón mexicano infectado naturalmente y procedente de huertos comerciales de Colima se usaron como fuente de inóculo. La inoculación se realizó por injerto de aproximación en plantas de 1 año previamente establecidas en las combinaciones: Lm/*C. macrophylla* (Cm) 6 plantas, Lm/*C. volkameriana* (Cv) 6 plantas, Lp/Cm 6 plantas, Lp/Cv 6 plantas y Nd/Cv 6 plantas. Por planta se realizó la colecta de dos hojas, una de la sección proximal al punto de inoculación y de la sección distal, cada 30 días por 9 meses a partir de los 24 meses después de la inoculación (mdi). El análisis foliar se realizó de forma independiente. En cada fecha se registraron los síntomas visuales y se evaluó la severidad en el dosel mediante una escala de severidad de 5 clases (1=sano (0%), 2=síntomas leves (25%), 3=síntomas moderados (50%), 4=síntomas fuertes (75%) y 5=síntomas severos (100%)). Un total de 495 muestras se analizaron molecularmente mediante q-PCR 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 HLBs (FAM-AGACGG GTGAGT AAC GCG/3BQH1). Histológicamente se analizaron 4,375 cortes basales de la nervadura central foliar. La concentración de CLas y anchura de floema se analizaron bajo un diseño de parcelas divididas (SAS[®] ver 9.4). Los tres cítricos presentaron variaciones en la expresión visual de los síntomas. Lm/Cm presentó fuerte clorosis y otros síntomas como punteado clorótico, moteado asimétrico, clorosis, aclaramiento de nervaduras. Fue la única combinación donde ocurrió muerte de ramas en tres de cinco plantas. Lm/Cv mostró exclusivamente una moderada clorosis. Los síntomas en Lp/Cm fueron análogos a Lm/Cm sin presentar muerte de ramas. Las plantas de Lp/Cv desarrollaron síntomas de punteado clorótico, aclaramiento de nervaduras y moteados

asimétricos. En Nd/Cv los síntomas fueron de leves a moderados, y se presentó principalmente acorchado en hojas. A nivel de severidad en dosel, Lm/Cm fue el más afectado con un promedio del 75% a los 32 mdi. En los tres cítricos evaluados se presentó una tendencia similar en cuanto al incremento y decremento de la concentración de CLAs en el tiempo, observándose dos picos importantes de máxima concentración; el primero a los 25 y 26 mdi y el segundo entre los 29 y 30 mdi. Las combinaciones de Lm/Cm y Lm/Cv presentaron las más altas concentraciones siendo estadísticamente diferentes ($P=0.001$) con respecto a los otros cítricos. Nd/Cv tuvo consistentemente la concentración más baja en un promedio del 57% y 28% con respecto a Lm/Cm y Lp/Cm, respectivamente. Histológicamente, en Lm/Cm la anchura de floema presentó el mayor incremento ($93.5\pm 2\mu\text{m}$) respecto a la combinación de Nd/Cv ($82.5\pm 2\mu\text{m}$) a los 32 mdi, aunque no hubo diferencia estadística.

En la Etapa 2 se seleccionó únicamente a Lm por presentar la mayor vulnerabilidad y se compararon los portainjertos Cm y Cv con naranjo agrio *C. aurantium* (Ca), bajo la hipótesis de su tolerancia a la infección de CLAs y la restricción histológica para movilidad del inóculo a nivel de rama. El tipo y manejo del inóculo fue análogo a la Etapa 1. Las combinaciones probadas fueron: Lm/Cm 8 plantas, Lm/Cv 8 plantas y Lm/Ca 8 plantas, adicionalmente se comparó el efecto de sección basal y distal al sitio de inoculación seleccionando de cada planta tres ramas con dos secciones cada una. Se realizaron colectas a partir de los 12 mdi cada 30 días, por 9 meses. En cada fecha se registraron los síntomas visuales y se evaluó la severidad con la escala indicada previamente. Las muestras se analizaron molecularmente también mediante q-PCR (1161 muestras totales) e histológicamente (7,875 cortes analizados), bajo un diseño de parcelas divididas (SAS[®] ver 9.4). Los tipos de síntomas expresados en las distintas combinaciones fueron contrastantes y consistieron predominantemente en punteado clorótico, moteado asimétrico y clorosis leve en Lm/Cv; moteado albino (3/7 plantas) y aclaramiento de nervaduras en Lm/Ca; muerte de ramas (7/7) y muerte de plantas (5/7) en Lm/Cm. A nivel dosel, la mayor severidad se observó en Lm/Cm (60-100% dosel sintomático). En promedio la mayor concentración fue 1.1×10^6 copias CLAs/ μl en la combinación de Lm/Ca en cinco fechas ($P=0.001$). En general se detectó una tendencia inversamente proporcional a la expresión sintomática. Esta tendencia sobresalió en Lm/Cm. A mayor severidad (100%) menor concentración de CLAs (Lm/Cm 4.2×10^5 , 18 mdi) y a menor severidad (50%) mayores títulos bacterianos (Lm/Cm 2.0×10^4 , 12 mdi). La combinación Lm/Ca se asoció con cierta tolerancia a CLAs debido a que tuvo los títulos más altos de la bacteria ($P=0.001$) en cinco de nueve fechas pero una menor expresión de síntomas severos. A nivel histológico la anchura promedio del floema fue menor en Lm/Ca ($74\pm 2\mu\text{m}$) con respecto a Lm/Cv $80\pm 2\mu\text{m}$ y Lm/Cm $84\pm 2\mu\text{m}$, aunque no hubo diferencias estadísticas. En Lm/Ca el promedio de hiperplasia fue similar en las regiones proximal y distal de las ramas ($76\pm 2\mu\text{m}$), en contraste con las otras combinaciones de Lm/Cv y Lm/Cm donde el incremento de la hiperplasia fue mayor en la sección proximal ($82\pm 2\mu\text{m}$), lo que sugiere un efecto histológico restrictivo de movilidad del inóculo.

Etapa 3. Se seleccionó naranja dulce por la detección de una condición asintomática en el centro de México y se evaluó Cv uno de los portainjertos menos vulnerable según etapas previas en comparación con el naranjo agrio (Ca), el portainjerto regional, incluyendo además la comparación del inóculo putativo asintomático (CLAs-P) con dos sintomáticos procedentes de Jalisco (CLAs-J) y Quintana Roo (CLAs-Q). Este experimento consistió de 10 plantas por fuente de inóculo, los cuales se injertaron como la etapa 2, con las combinaciones Nd/Cv y Nd/Ca. A partir de los tres mdi se colectaron muestras cada 30 días

por 5 meses. Secuencialmente, se seleccionaron hojas ascendentemente a partir de la base de una rama seleccionada por planta. En cada fecha se registraron los síntomas visuales y se evaluó la severidad en dosel. Las muestras se analizaron molecularmente mediante q-PCR (430 muestras totales) e histológicamente (1,350 cortes foliares analizados), bajo un diseño de parcelas divididas (SAS[®] ver 9.4). Los tipos de síntomas expresados en las distintas combinaciones fueron contrastantes y consistieron en aclaramiento de nervaduras y clorosis ligera en Nd/Ca, moteado difusos, moteado albino y clorosis en Nd/Cv. La expresión de síntomas inició entre los 101 y 135 ddi. La combinación Nd/Ca con CLas-P mantuvo su condición asintomática. La concentración bacteriana presentó fluctuaciones en las diferentes fechas de muestreo en un rango de 3.1×10^4 a 6.6×10^6 . No se presentaron diferencias entre patrones con respecto al inóculo, pero sí entre fuentes de inóculo, siendo mayor y estadísticamente diferente en CLas-J. Con este inóculo, la máxima concentración se detectó en Nd/Cv a los 122 ddi con 6.6×10^6 . Se observó un efecto diferencial en la anchura del floema inducida por CLas según la fuente de inóculo con respecto al testigo sano. El efecto promedio fue de 38%, 28% y 27% para CLas-J, CLas-Q y CLas-P, respectivamente. La mayor alteración se observó en CLas-J ($42 \pm 2 \mu\text{m}$), lo que coincide con la alta concentración de CLas. La combinación Nd/Ca se asoció con cierta tolerancia a CLas debido a títulos altos de la bacteria (1.1×10^6 copias CLas/ μl a los 4 mdi) con nula expresión de síntomas (CLas-P) o baja expresión de síntomas en CLas-J y CLas-Q (<25%).

En general, las evidencias experimentales de este trabajo demuestran que existe un efecto del portainjerto en la expresión de síntomas, pero además una agresividad de CLas en términos histológicos y multiplicativos dependiendo de la fuente de inóculo, siendo CLas-J el más agresivo. La secuenciación molecular de muestras iniciales y finales del experimento 2 confirmó la invariabilidad de la fuente de inóculo provenientes de Colima (Número de accesión registrada en GenBank: KU159087 publicada el 10 mayo 2016).

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

DYNAMICS OF BACTERIAL CONCENTRATION OF *Candidatus Liberibacter asiaticus* AND ITS EFFECT ON THE SYMPTOMATIC AND HISTOLOGICAL EXPRESSION IN SOUR AND SWEETS CITRUS FRUITS AND IMPLICATIONS IN THE INOCULUM POTENTIAL

Fabiola Esquivel Chávez, Dra.
Colegio de Posgraduados, 2016.

Abstract

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLAs), causing bacteria of Huanglongbing (HLB), differentially affects all citrus species. In Mexico, this disease occurs in two principle geographical regions, being more prevalent on the Pacific in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*). The expression of symptoms and histological alterations induced by CLAs depends on the citrus species; however, there is limited knowledge of the effect that the bacteria has in symptom expression in plants of Mexican lime (*Lm*), Persian (*C. latifolia*) (*Lp*) and sweet orange (*C. sinensis*) (*Nd*) based on graft-rootstock combination. In this sense, the aim of this research was to evaluate three types of graft-rootstock combinations about the expression of symptoms, bacterial concentration and its histological effect in grafted plants of sour and sweet orange in three patterns. This investigation was carried out in laboratory and greenhouse and consisted of three stages.

Stage 1. The effect of varena from the source of inoculum and the cup of sour citrus and sweet under the assumption of a differential behavior of graft-rootstock combinations detriment of sour citrus were compared. Stems of 0.5 cm diameter and naturally infected Mexican lime from commercial orchards of Colima were used as a source of inoculum. Inoculation was by approximation grafting 1 year old plants previously established in the combinations: *Lm/C. macrophylla* (*Cm*) 6 plants, *Lm/C. volkameriana* (*Cv*) 6 plants, *Lp/Cm* 6 plants, *Lp/Cv* 6 plants, *Nd/Cv* 6 plants. Two leaves were collected by plant from, one of the proximal section at the inoculation site and the second from the distal section. It was accomplished every 30 days for 9 months from 24 months after inoculation (mdi). Foliar analysis was performed independently. On each date, visual symptoms were recorded and severity in the canopy was assessed using a severity scale of 5 classes (1=healthy (0%), 2=mild symptoms (25%), 3=moderate symptoms (50%), 4=strong symptoms (75%) and 5=severe symptoms (100%)). A total of 495 samples were analyzed molecularly by q-PCR with primers that amplify for the 16S ribosomal DNA: HLB_{as} (TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG) and HLB_p (GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG), together with probe HLB_r (FAM-AGACGG GTGAGT AAC GCG/3BQH1). 4,375 histologically basal cuts of the leaf midrib were analyzed. CLAs concentration and phloem width were examined under a split plot design (SAS® see 9.4). The three citrus showed variations in the visual expression of symptoms. *Lm/Cm* presented strong chlorosis and other symptoms such as chlorotic stippling, asymmetric mottled, chlorosis, clearance ribs. This was the only combination where death of branches occurred in three of five plants. *Lm/Cv* showed only mild chlorosis. Symptoms in *Lp/Cm* were similar to *Lm/Cm* without presenting death of branches. Plants *Lp/Cv* developed symptoms of chlorotic stippling, ribs and asymmetrical clearance mottling. *Nd/Cv* symptoms were mild to moderate and befell mainly corked in leaves. A dorsal severity level, *Lm/Cm* was the most affected with an average of 75% to 32 mdi. The three citrus species evaluated showed a similar trend related to the increase and decrease of CLAs

concentration during time, observing two major peaks of maximum concentration; the first at 25 and 26 mdi and the second between 29 and 30 mdi. Combinations of Lm/Cm and Lm/Cv had the highest concentrations being statistically different ($P=0.001$) compared to other citrus fruits. Nd/Cv consistently had the lowest concentration by an average of 57% and 28% compare to Lm/Cm and Lp/Cm, respectively. Histologically, in Lm/Cm phloem width showed the highest increase ($93.5\pm 2\mu\text{m}$) regarding the combination of Nd/Cv ($82.5\pm 2\mu\text{m}$) to the 32mdi, although there was no statistical difference.

In Stage 2, only Lm was selected for showing greater vulnerability. Cm and Cv rootstocks were compared with sour orange *C. aurantium* (Ca), under the hypothesis of tolerance to the infection of CLAs and histological restriction for inoculum mobility at the branch level. The type and management of the inoculum was analogous to Stage 1. The combinations tested were: Lm/Cm 8 plants Lm/Cv 8 plants, Lm/Ca 8 plants, additionally the effect of basal and distal section compared to the site of inoculation selecting three branches of each plant with two sections each. Collections from 12 mdi every 30 days for 9 months were performed. On each date, visual symptoms were recorded and severity was assessed with the scale previously indicated. The samples were analyzed molecularly also by q-PCR (1161 total samples) and histologically (7,875 cuts analyzed), under a split plot design (SAS® see 9.4). The types of symptoms expressed in different combinations were contrasting and consisted predominantly in chlorotic stippling, asymmetric slight mottling and chlorosis in Lm/Cv; spotted albino (3/7 plants) and clearance ribs Lm/Ca; death of branches (7/7) and death of plants (5/7) in Lm/Cm. At dossal level, the greater severity was observed in Lm/Cm (60-100% symptomatic dossal). On average the highest concentration was 1.1×10^6 CLAs copies/ μl in the combination of Lm/Ca in five dates ($P=0.001$). In general, an inversely proportional tendency to the symptomatic expression was detected, stood at specially in Lm/Cm. As greater severity (100%) lower concentration CLAs (Lm/Cm 4.2×10^5 , 18 mdi) and as less severity (50%) higher bacterial titers (Lm/Cm 2.0×10^4 12 mdi). Lm/Ca combination was associated with a certain tolerance to CLAs because it had the highest titers of bacteria ($P=0.001$) in five of nine dates but lower expression of severe symptoms. Histologically the average width of the phloem was lower in Lm/Ca ($74\pm 2\mu\text{m}$) with respect to Lm/Cv $80\pm 2\mu\text{m}$ and Lm/Cm $84\pm 2\mu\text{m}$, although there was no statistical difference. In Lm/Ca average hyperplasia was similar in the proximal and distal regions of the branches ($76\pm 2\mu\text{m}$), in contrast to other combinations of Lm/Cv and Lm/Cm where increased hyperplasia was higher in the proximal section ($82\pm 2\mu\text{m}$), suggesting a restrictive histological effect of the inoculum mobility.

Stage 3. Sweet orange was selected because of the detection of an asymptomatic condition in central Mexico and Cv was evaluated as one of the least vulnerable rootstocks according to previous stages compared with the sour orange (Ca), the regional rootstock, including as well the comparison of asymptomatic putative inoculum (CLAs-P) with two symptomatic from Jalisco (CLAs-J) and Quintana Roo (CLAs-Q). This experiment consisted of 10 plants per source of inoculum, which were grafted as in stage 2, with the combinations: Nd/Cv and Nd/Ca. From the three mdi samples they were collected every 30 days for 5 months. Sequentially, ascending leaves were selected from a selected the base branch per plant. On each date, visual symptoms were recorded and dossal severity was assessed. Samples were analyzed molecularly by q-PCR (430 total samples) and histologically (1,350 cuts analyzed), under a split plot design (SAS® see 9.4). The types of symptoms expressed in different

combinations were contrasting and consisted in clearance ribs and slight chlorosis in Nd/Ca and diffuse mottled, mottled albino and chlorosis Nd/Cv. The expression of symptoms started between 101 and 135 ddi. The Nd/Ca combination with CLas-P maintained its asymptomatic condition. The bacterial concentration showed fluctuations at different sampling dates in a range of 3.1×10^4 to 6.6×10^6 . No differences between patterns with respect to inoculum were presented, but between sources of inoculum, being higher and statistically different CLas-J. With this inoculums, maximum concentration was detected in Nd/Cv to 122ddi with 6.6×10^6 . A differential effect on CLas width phloem induced by the inoculum source was observed, with respect to the healthy control. The average effect was 38%, 28% and 27% for CLas-J, CLas-Q and CLas-P, respectively. The major alteration was perceived in CLas-J ($42 \pm 2 \mu\text{m}$), which coincides with the high concentration of CLas. The Nd/Ca combination was associated with a certain tolerance CLas due to high titers of bacteria (1.1×10^6 copies CLas/ul at 4 mdi) with no expression of symptoms (CLas-P) or low expression of symptoms in CLas-J and CLas-Q (<25%).

In general, the experimental evidence of this study evidence that there is an effect of the rootstock in the expression of symptoms, but also aggressiveness CLas in histological and multiplicative terms depending on the source of inoculum being CLas-J more aggressive. The molecular sequencing of initial and final samples of experiment 2 confirmed the invariance of the inoculum source from Colima (Accession number registered in GenBank: KU159087 published on May 10, 2016).

Keywords: Huanglongbing, *Citrus aurantium*, *C. volkameriana* and *C. macrophylla*.

Dedicatoria

A mis padres: Gracias por la confianza depositada en mí, por las enseñanzas, por tanto amor, por los consejos, porque a pesar de las situaciones difíciles siempre han tenido una sonrisa, llena de paz y tranquilidad.

A mi hijo: Gracias por soportar tantas ausencias y por ser un motor para seguir adelante. Te amo.

A mi esposo: Gracias por el apoyo incondicional en cada etapa de este proyecto. Te amo.

A mis hermanas: por su cariño y apoyo incondicional.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados (CP) por haberme dado la oportunidad de continuar con mi formación profesional con sus profesores.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Tecomán, Colima, particularmente al Dr. Joaquín Velázquez quién hizo posible la ejecución de la fase de invernadero.

Al SENASICA por el financiamiento otorgado al proyecto de cítricos, por brindarme el apoyo económico indirectamente para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Dr. Gustavo Mora por creer en mí, por su apoyo incondicional durante el desarrollo de esta investigación y valiosos consejos, muchas gracias.

Al Dr. Joaquín Velázquez por su paciencia, conocimientos transmitidos, sus valiosas observaciones y comentarios para esta investigación.

A la Dra. Guadalupe Valdovinos por su valiosa asesoría, consejos y observaciones a lo largo de esta investigación. Agradezco el que me haya regalado un poco de su tiempo para escucharme.

A la Dra. Alejandra Gutiérrez por sus valiosos comentarios y apoyo brindado a lo largo de esta investigación.

Al Dr. Emiliano loeza por sus valiosas observaciones y consejos para mejorar el trabajo.

Al equipo LANREF por el apoyo brindado en cada etapa de la realización de este proyecto.

A los amigos, Dalia, Mayra, Yun, Ale, Ediht, Lalo, Mag, Gera y Vero Gracias por su apoyo.

A todas las personas que me apoyaron, que me brindaron su amistad y me animaron en diferentes etapas de mi vida les doy las gracias.

Contenido

	Página
Resumen	iii
Abstract	vi
Lista de Cuadros	xiv
Lista de Figuras	xvi
1. Revisión de literatura	1
1.1. Los cítricos en México.....	1
1.1.1. Naranja dulce.....	2
1.1.2. Limón mexicano.....	3
1.1.3. Limón persa.....	3
1.2. Portainjertos	4
1.2.1. Características de los portainjertos más utilizados en México	5
1.3. Enfermedades de los cítricos	6
1.3.1. El Huanglongbing.....	7
1.3.2. Síntomas foliares	10
1.3.3. Síntomas anatómicos	12
1.3.4. Variedades de cítricos y su relación con CLas	13
1.3.5. Concentración y distribución de CLas.....	18
1.4. Literatura Citada	23
Capítulo 2	
Implication of rootstock type on the quantitative distribution of <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> in Mexican lime tissue	30
2.1. Resumen.....	30
2.2. Introducción.....	32
2.3. Materiales y métodos	34
2.3.1. Portainjertos.....	34
2.3.2. Inoculación	34
2.3.3. Evaluación de la expresión de síntomas	35
2.3.4. Desarrollo de la enfermedad, concentración y distribución de CLas	35
2.3.5. Análisis estadístico	37
2.4. Resultados.....	37
2.4.1. Síntomas	37
2.4.2. Concentración y distribución de CLas.....	41
2.5. Discusión.....	47
2.6. Literatura Citada	50

Capítulo 3

Efecto de la interacción <i>Citrus aurantifolia</i> y tipo de patrón en la expresión histológica foliar en respuesta a la Infección de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	56
3.1. Resumen.....	56
3.2. Introducción	58
3.3. Materiales y métodos	60
3.3.1. Material vegetal	60
3.3.2. Inoculación	60
3.3.3. Establecimiento de experimento.....	61
3.3.4. Variables evaluadas	61
3.3.5. Análisis estadístico	63
3.4. Resultados	63
3.4.1. Síntomas	63
3.4.2. Alteraciones histológicas.....	66
3.5. Discusión	72
3.6. Literatura Citada	74

Capítulo 4

Reacción de tres especies de cítricos a <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> mediante inoculación y su relación con portainjertos	77
4.1. Resumen.....	77
4.2. Introducción.....	79
4.3. Materiales y métodos	83
4.3.1. Portainjertos.....	83
4.3.2. Inoculación	84
4.3.3. Evaluación de la expresión de síntomas	85
4.3.4. Desarrollo de la enfermedad, concentración y distribución de CLas	86
4.3.5. Análisis Histológico	88
4.4. Resultados.....	90
4.4.1. Síntomas	90
4.4.2. Concentración y distribución de CLas.....	94
4.4.3. Análisis histológico	98
4.5. Discusión	101
4.6. Conclusiones.....	103
4.7. Literatura Citada	104

Capítulo 5

¿Es la fuente de inóculo o tipo de patrón responsable en una condición asintomática del naranjo dulce (<i>Citrus sinensis</i>)?	108
5.1. Resumen.....	108
5.2. Introducción.....	110
5.3. Materiales y métodos.....	111
5.3.1. Experimento en Invernadero.....	111
5.3.2. Selección de material vegetal para fuente de inóculo.....	112
5.3.3. Recolección de tejido vegetal y evaluación de expresión de síntomas.....	113
5.3.4. Cuantificación de CLas qPCR.....	114
5.3.5. Análisis molecular de proteínas asociadas a mecanismos de resistencia.....	115
5.3.6. Análisis histológico.....	116
5.3.7. Análisis de resultados.....	118
5.4. Resultados.....	119
5.4.1. Detección y cuantificación de CLas en tres fuentes de inóculo.....	119
5.4.2. Expresión de síntomas y cuantificación de CLas en tres fuentes de inóculo.....	120
5.4.3. Detección de PP2.....	127
5.4.4. Análisis histológico.....	127
5.5. Discusión.....	133
5.6. Conclusiones.....	136
5.7. Literatura Citada.....	137
6. Conclusiones Generales	139

Anexos

Anexo 1

Protocolo de PCR Tiempo Real tipo Cuantitativo (CLas)

Tejido vegetal..... 141

Anexo 2

Protocolo análisis histológico..... 145

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1.1. Producción de cítricos en México SIAP 2015.	2
Cuadro 1.2. Principales portainjertos y su relación con enfermedades de los cítricos.	6
Cuadro 1.3. Ocurrencia de <i>Candidatus liberibacter</i> en el mundo.	8
Cuadro 1.4. Variación de la expresión sintomática en cítricos infectados por CLas en México.	11
Cuadro 1.5. Respuesta de diferentes genotipos de cítricos a la infección <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	15
Capítulo 2	
Cuadro 2.1. Respuesta sintomática del limón mexicano y su combinación injerto-portainjerto a la infección por CLas.	40
Cuadro 2.2. Promedio concentración y distribución de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en tejido foliar limón mexicano injertado en los portainjertos <i>C. aurantium</i> , <i>C. volkameriana</i> y <i>C. macrophylla</i> bajo condiciones de invernadero.	42
Cuadro 2.3. Número de copias del gen 16S rDNA de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en plantas de limón mexicano sobre tres portainjertos.	46
Capítulo 3	
Cuadro 3.1. Fluctuación del índice de hiperplasia en limón mexicano sobre tres patrones durante 5 fechas (relación sano/enfermo).	69
Cuadro 3.2. Análisis del área absoluta bajo la curva ABCPE de la variable AF en limón mexicano sobre tres patrones durante 5 fechas.	69
Cuadro 3.3. Análisis de regresión para cada combinación injerto/portainjerto y por sección de la rama.	70
Capítulo 4	
Cuadro 4.1. Unidades de muestras obtenidas de los tratamientos evaluados y sus testigos en el periodo abril –diciembre, 2014.	86
Cuadro 4.2. Muestras procesadas para su análisis histológico.	89
Cuadro 4.3. Expresión de síntomas en cítricos y su relación en la combinación injerto/portainjerto inducidos por CLas.	93
Cuadro 4.4.1. Análisis de cuantificación de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> , número de copias del gen 16S rDNA, en cítricos sobre dos portainjertos (copa del árbol).	94
Cuadro 4.4.2. Análisis de cuantificación de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> , número de copias del gen 16S rDNA, en cítricos sobre dos portainjertos (inóculo).	95
Capítulo 5	
Cuadro 5.1. Descripción de la fuente de inóculo, injerto, portainjerto y número de repeticiones establecidas en el diseño del experimento.	112

Cuadro 5.2. Cronograma de colectas de material vegetal por fuente de inóculo y patrón, en el periodo julio a octubre, 2014.	114
Cuadro 5.3. Condiciones de PCR con el set de primers PP2F/PP2R.....	115
Cuadro 5.4. Número de muestras seleccionadas por fuente de inóculo y tipo de patrón, para análisis histológico. Período julio–octubre, 2014.....	117
Cuadro 5.5. Numero de muestras laminillas, imágenes y mediciones realizadas para determinar la hiperplasia del floema en material vegetal proveniente de la combinación <i>Cs/Ca</i> y <i>Cs/Cv</i>	118
Cuadro 5.6. Concentración de CLas y CT's de nueve ramas asintomáticas positivas empleadas para la elección de varetas fuente de Inóculo, Puebla.	119
Cuadro 5.7. Síntomas de HLB en plantas de naranja dulce injertados sobre <i>C. volcameriana</i> y <i>C. aurantium</i> infectadas con tres fuentes de inóculo de CLas.....	122
Cuadro 5.8. Número de copias del gen 16S rDNA de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en plantas de naranja dulce sobre dos portainjertos.....	125

Lista de Figuras

	Página
Figura 1.1. Estatus de la distribución del HLB y su vector en México. Créditos: SENASICA 2016. http://sinavef.senasica.gob.mx/SIIVEF/HLB.aspx	10
Figura 1.2. Severidad de síntomas de HLB en Naranja dulce y su combinación con naranjo agrio (na), limón volkameriano (vol) y el híbrido US-802. Daños en dosel a partir de la clasificación del 1 (copa del árbol completo y poca muerte regresiva) al 5 (muerte regresiva / defoliación en más del 60% de la copa de los árboles y/o retraso en el crecimiento severo del árbol). Elaborada con datos de: Albrecht <i>et al.</i> , 2012.....	18
Figura 1.3. Distribución del CLam en subramas proveniente de un árbol positivo. A) Triángulos muestras positivas con síntomas de moteado; B) círculos rojos muestras positivas sin síntomas; C) círculos azules muestras negativas a PCR convencional y positivas RT-PCR con deficiencia de zinc; D) círculos blancos negativos; E) círculos verdes negativos PCR-convencional y positivos RT-PCR; y F) elipses verdes frutos afectados (Teixeira <i>et al.</i> , 2008).	20
Figura 1.4. Efecto putativo del bloqueo a nivel del floema induciendo una obstrucción temporal en la distribución de CLas en dirección al siguiente flujo de crecimiento en ramas de limón mexicano. Foto créditos: Fabiola Esquivel, 2012.....	21
 Capítulo 2	
Figura 2.1. 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.....	39
Figura 2.2. Concentración y distribución de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> detectadas por análisis de q-PCR. En secciones proximal y distal al punto de injerto en ramas de limón mexicano sobre 3 patrones 12 meses después de la inoculación.	42
Figura 2.3. Cuantificación temporal de CLas, a partir de los 12 meses después de la inoculación, vía injerto, en limón mexicano injertado en los portainjertos <i>C. aurantium</i> (Lm/Ca), <i>C. volkameriana</i> (Lm/Cv) y <i>C. macrophylla</i> (Lm/Cm). Se omitieron los testigos por ser ceros.....	44
Figura 2.4. Cuantificación temporal de CLas, a partir de los 12 meses después de la inoculación, vía injerto, en limón mexicano injertado en los portainjertos <i>C. aurantium</i> (Lm/Ca), <i>C. volkameriana</i> (Lm/Cv) y <i>C. macrophylla</i> (Lm/Cm). A) Promedio de ramas distales. B) Promedio de ramas proximales. ABCC (Área bajo la curva de concentración). Se omitieron los testigos por ser ceros.....	45

Capítulo 3

- Figura 3.1.** Esquema de plantas de limón mexicano y tipos de injertos realizados en tratamientos y plantas testigo. Injerto de yema YsLm= yema sana de limón mexicano; Injerto tipo púa vareta de limón mexicano positiva a CLAs= LmCLAs, vareta de limón mexicano sana= LmS. 61
- Figura 3.2.** Síntomas en limón mexicano sobre tres patrones inducidos por CLAs. Combinación de Lm/Ca: A) Punteado clorótico, B) Moteado leve, C) Moteado albino, D) Moteado difuso, E) Aclaramiento de nervaduras; Lm/Cv: F) Moteado leve, G) Aclaramiento de nervaduras, H) Moteado albino, I) Moteado difuso J) Clorosis; Lm/Cm: K) Punteado clorótico, L) Moteado leve,, M) Aclaramiento de nervaduras, N) Moteado difuso y O) Clorosis total. 65
- Figura 3.3.** Fluctuacion del anchura del floema en cortes transversales de hojas de limón mexicano/*C. aurantium*, hojas de limón mexicano/*C. macrophylla* y hojas de limón mexicano/*C. volkameriana* con hiperplasia y tejido sano. 66
- Figura 3.4.** Síntomas foliares visuales y secciones transversales de la nervadura central correspondientes a los síntomas inducidos por CLAs a los 12 mdi y a los 20 mdi en tejido de limon mexicano (Lm) injertado en *Citrus aurantium*(A-D), *Citrus volkameriana* (E-H) y *Citrus macrophylla* (I-L). Barras=100 µm. H=hiperplasia, AN=aclaramiento de nervaduras, PC=punteado clorotico y C=clorosis. 67
- Figura 3.5.** Representación gráfica de mediciones de anchura del floema en cortes transversales de hojas de limón mexicano/*C. aurantium*, hojas de limón mexicano/*C. macrophylla* y hojas de limón mexicano/*C. volkameriana* con hiperplasia y tejido sano. 68
- Figura 3.6.** Promedio de la anchura del floema en comparación con la fluctuación de la concentración de CLAs (datos de Esquivel *et al.*, 2016 *en prensa*) en limón mexicano en combinación con tres patrones. A-B) Limón mexicano/*C. aurantium*, sección distal (A) proximal (B); C-D) Limón mexicano/*C. Volkameriana*, distal (C) proximal (D); y E-F) Limón mexicano/*C. macrophylla*, distal (E) proximal (F). 71

Capítulo 4

- Figura 4.1.** Procedimiento de inoculación de CLAs por injerto en plantas de limón mexicano, limón persa y naranja dulce. A) Insertado de varetas de limón mexicano CLAs⁺; B y C) Sellado de vareta; D) Destape 15 días después de la inoculación; E y F) Inóculo y copa, respectivamente. 85
- Figura 4.2.** Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de cítricos sobre dos patrones, a los 24 meses después de la inoculación. Análisis de PCR cuantitativo en tiempo real. 91
- Figura 4.3.** Síntomas inducidos por CLAs 12 meses después de la inoculación en limón mexicano (A, D, F y H), limón persa (E y G) y naranja dulce (B y C). A) Punteado clorótico; B y C) Aclaramiento de nervaduras; D) Moteado asimétrico; E) Moteado leve; F y G) Moteado blancuzco; y H) Clorosis. 92
- Figura 4.4.** Cuantificación temporal de CLAs mediante análisis de PCR cuantitativo en tiempo real de los 24 hasta los 32 meses después de la inoculación en limón persa (Lp), limón mexicano (Lm) y naranja dulce (Nd) sobre dos portainjertos diferentes Volkameriana (Cv) y Macrofila (Cm). Copa=Variedad; Ino=Inóculo. 95

Figura 4.5. Dinámica de la concentración de CLAs en el tiempo a partir de los 24 hasta los 32 meses después de la inoculación en cítricos y su relación injerto/portainjerto. Detección por análisis de PCR cuantitativo en tiempo real.	97
Figura 4.6. Micrografías de cortes transversales en hojas de limón de plantas de mexicano (Lm), limón persa (Lp) y naranja dulce (Nd) sobre los patrones <i>Citrus macrophylla</i> (Cm) y <i>C. volkameriana</i> (Cv) infectadas por <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> a los 24 meses después de la inoculación. Lm: A, B, C y D; Lp: E, F, G y H; Nd: I y J; sobre Cm: A, B, E, F y K; Sobre Cv: C, D, G, H, I, J y L; Copa: A, C, E, G e I; injerto: B, D, F, H Y J; y Testigos: K y L.	99
Figura 4.7. Fluctuación temporal de la anchura del floema en tres cítricos.	100
Figura 4.8. Micrografías de cortes transversales en hojas de limón mexicano sobre <i>C. macrophylla</i> infectadas por <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> a los 24 meses después de la inoculación (mdi): A) copa, B) inóculo; y a los 32 mdi: C) copa, D) inóculo.	101

Capítulo 5

Figura 5.1. Diagrama del proceso de preparación del tejido foliar para realizar un análisis histológico. Fuente: López <i>et al.</i> , 2005.	116
Figura 5.2. Relación naranja dulce/portainjerto, fecha de expresión de síntomas, tipo de síntomas y concentración bacteriana de CLAs por fuente de inóculo.	121
Figura 5.3. Cuantificación de CLAs en plantas de naranja dulce con inóculo proveniente de Jalisco. 8 plantas de <i>Cs/Cv</i> (V) sintomáticas, 4 <i>Cs/Ca</i> (NA) sintomáticas.	123
Figura 5.4. Cuantificación de CLAs por qPCR en plantas sintomáticas y asintomáticas, relación injerto portainjerto con inóculo proveniente de Quintana Roo.	124
Figura 5.5. Cuantificación de CLAs por qPCR en plantas sintomáticas y asintomáticas, relación injerto portainjerto con inóculo proveniente de Puebla.	124
Figura 5.6. Cuantificación temporal de CLAs, 81 días después de la inoculación en naranja dulce y su relación injerto/portainjerto de tres fuentes de inóculo. Jal/Cv=Jalisco/ <i>C. volkameriana</i> , Jal/Ca=Jalisco/ <i>C. aurantium</i> ; Pue/Cm= Puebla/ <i>C. macrophylla</i> , Pue/Ca= Puebla/ <i>C. aurantium</i> ; QR/Cm= Quintana Roo/ <i>C. macrophylla</i> , QR/Ca= Quintana Roo/ <i>C. aurantium</i>	126
Figura 5.7. Fluctuación temporal de la concentración de CLAs, de los tres meses hasta los 6 meses después de la inoculación en naranja dulce y su relación injerto/portainjerto de tres fuentes de inóculo. Jal/Cv=Jalisco/ <i>C. volkameriana</i> , Jal/Ca=Jalisco/ <i>C. aurantium</i> ; Pue/Cm= Puebla/ <i>C. macrophylla</i> , Pue/Ca= Puebla/ <i>C. aurantium</i> ; QR/Cm= Quintana Roo/ <i>C. macrophylla</i> , QR/Ca= Quintana Roo/ <i>C. aurantium</i>	126
Figura 5.8. Gel de agarosa al 1.5% mostrando fragmentos amplificados de 300 pb aproximadamente de muestras provenientes de Colima con diferentes síntomas. Marcador de peso molecular (MPM), control negativo (-), muestras provenientes de Puebla (P1, P2, P3 y P4), muestras de Colima (C1, C2, C3 y C4).	127
Figura 5.9. Micrografía de cortes transversales en la base de la nervadura principal de hojas de naranja dulce injertado sobre naranja agrio (A, C, E y G) y Volkameriano (B, D, F y H), respectivamente. A y B) Inóculo Quintana Roo; C y D) Inóculo Jalisco; E y F) Inóculo Puebla; G y H) testigos sanos.	128

Figura 5.10. Desarrollo en el tiempo del efecto de la anchura del floema (hiperplasia) de la base de la nervadura central de hojas de naranja dulce en relación a tres fuentes de inóculo de CLas.....	129
Figura 5.11. Síntomas macro y micro inducidos por <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en naranja dulce. Sobre naranjo agrio(A, C, E, F, I y J) y Volkameriano (C, D, G, H, K y L) y Volkameriano, respectivamente. A, B, C y D) Inóculo Quintana Roo; E, F, G y H) Inóculo Jalisco; I, J, K y L) Inóculo Puebla. Las flechas indican síntomas: M=moteado, AN=aclaramiento de nervaduras, PC=punteado clorótico y H=hiperplasia.	130
Figura 5.12. Efecto de la hiperplasia en floema de la nervadura central de hojas de naranja dulce inducida por la infección de CLas en relación a la fuente de inóculo proveniente de plantas positivas asintomáticos de Acateno, Puebla.	131
Figura 5.13. Efecto de la hiperplasia en floema de la nervadura central de hojas de naranja dulce inducida por la infección de CLas en relación a la fuente de inóculo proveniente de plantas positivas asintomáticos de, Quintana Roo.	132
Figura 5.14. Efecto de la hiperplasia en floema de la nervadura central de hojas de naranja dulce inducida por la infección de CLas en relación a la fuente de inóculo proveniente de plantas positivas asintomáticos de, Jalisco.	133

Capítulo 1

1. Revisión de literatura

1.1 Los cítricos en México

La citricultura en México es una actividad de gran importancia económica y social dentro de la fruticultura nacional. Esta actividad se realiza en poco más de medio millón de hectáreas (560,604.13 ha) en regiones tropicales y sub-tropicales en 23 entidades federativas. Se estima una producción de 7,656,535.65 t de fruta con un valor de 17,189,712.87 millones de pesos anuales. Esta producción a mantenido a México en quinto lugar de cítricos a nivel mundial (SIAP, 2016) (Cuadro 1.1). De esa superficie, aproximadamente 80% se destina a los denominados cítricos dulces, cuya producción es de 4.5 millones de toneladas anuales, principalmente de naranja (68% del total). Del resto de la superficie establecida, el 20.5 % corresponde a limón mexicano, 8% a toronja, 5.2% a limón persa, 5% a mandarina y 4% a tangerina. El cultivo de cítricos dulces representa una fuente importante de ingresos en las zonas rurales. Los estados de mayor importancia en la producción son Veracruz (55% del total nacional), San Luis Potosí y Tamaulipas, que en conjunto representan 22% de la superficie sembrada y cosechada, así como Puebla y Nuevo León (Trujillo-Arriaga *et al.*, 2008).

Cuadro 1.1. Producción de cítricos en México SIAP 2015.

Cultivo	Nombre científico	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	Valor de la producción (Miles de Pesos)
Lima	<i>Citrus micrantha</i>	1,672.1	1,625.9	17,821.3	10.9	43,277.1
Limón	<i>Citrus aurantifolia</i>	171,608.8	154,803.2	2,187,257.2	14.1	8,989,668.5
Mandarina	<i>Citrus reticulata</i>	21,550.4	21,227.5	297,326.4	14.0	421,496.2
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	334,849.1	321,683.3	4,533,427.8	14.1	6,727,474.1
Tangelo	<i>Citrus x tangelo</i>	5,060.0	4,565.0	97,222.0	21.3	122,005.7
Tangerina	<i>Citrus x tangerina</i>	12,692.50	12,428.50	194,712.19	15.7	362,547.3
Toronja	<i>Citrus paradise</i>	18,050.9	16,201.1	424,678.1	26.2	642,847.5
Cítricos	<i>Citrus</i>	180.14	169.06	1,312.5	7.76	2,401.76
Total		565,664.1	532,703.8	7,753,757.6	124.1	17,311,718.2

1.1.1 Naranja dulce

La naranja Valencia, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, es una especie que pertenece a la familia *Rutaceae* subfamilia *Aurantoideae*, género *Citrus*, el cual se divide en los subgéneros *Citrus* y *Papeda*, con la diferencia que este último presenta gotas agrias de aceite en las vesículas de la pulpa. La mayoría de las especies conocidas pertenecen al subgénero *Citrus*, además de *C. hystrix* y *C. macroptera* pertenecientes a *Papeda* (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 2009).

Las variedades cultivadas en México son la Valencia, la Navelate y la Navelina. La naranja Valencia o Valenciana entra en producción en mayo, es jugosa y dulce y por ello muy orientada a la producción de jugo. La navelate se produce a partir de febrero y es una fruta destinada a la mesa del consumidor que suma a sus atributos un grado de acidez que estimula al paladar. Por su parte, la navelina sirve tanto para la mesa como para la producción de jugos. Es altamente valorada porque tiene una producción muy alta que inicia

en diciembre (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 2009). Veracruz es líder en producción, con más de la mitad del total nacional (2.1 millones de toneladas). Sonora es donde se da el mejor rendimiento nacional, con 25 toneladas por hectárea (SIAP, 2016).

1.1.2 Limón mexicano

El limón mexicano pertenecen al grupo de las limas acidas. Su adaptación a regiones tropicales las hace sensibles a bajas temperaturas. El limón mexicano *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle, puede ser propagado por semilla o vegetativamente. Los árboles son vigorosos, con muchas espinas. Las hojas son pequeñas y redondas. Las flores son blancas con pétalos curvados hacia el eje de la flor; florece todo el año (Agustí, 2003; Orozco-Santos *et al.*, 2014).

En 2015 se reportaron aproximadamente 81,221 ha con limón mexicano. Los principales estados productores son: Michoacán con 42,931 ha, Colima 18,996 ha, Oaxaca 8,498 ha y Guerrero 6,856 ha (SIAP, 2016). La producción anual de fruta de limón mexicano supera el millón de toneladas con un valor superior a los 3 mil millones de pesos. Esta agroindustria genera una gran cantidad de empleos en los diversos eslabones que integran el sistema producto, como son actividades en campo, en las empacadoras, industria, transporte y comercialización de fruta o de subproductos (Manzanilla *et al.*, 2015; Robles *et al.*, 2011).

1.1.3 Limón persa

El limón persa, *Citrus latifolia* L., se agrupa también dentro de las limas acidas. Son árboles vigorosos y frondosos, de desarrollo arbustivo con ramas inclinadas y pequeñas espinas. Las hojas son largas, elípticas y muy aserradas en proximidad del ápice. Las flores

son de tamaño medio y color blanco; florecen todo el año con dos a tres flujos de floración masiva (Amorós, 2003; Agustí, 2003; Orozco-Santos *et al.*, 2014).

En México, el limón persa con una superficie de 78.5 mil hectáreas y una producción de 920 mil toneladas, ocupa el tercer lugar y el valor de la producción se estima en 2.2 mil millones de pesos (SIAP, 2016). Se cultiva en estados del Pacífico y Golfo del país y Veracruz es el principal productor.

1.2 Portainjertos

Los portainjertos o patrones son las plantas de soporte, en las que se injerta una yema o vareta proveniente de otra planta que se desea propagar como variedad. El portainjerto dará origen al sistema radical y parte del tronco, es el que da soporte al árbol, anclándolo al suelo, y es el responsable de la absorción y nutrientes del suelo; mientras que la variedad formará la estructura aérea y dará la producción. Los patrones de los cítricos aportan tres características importantes a las variedades: 1. Reducen el periodo de juvenil de los árboles, 2. Mejoran la adaptación al ambiente, 3. Comportamiento agronómico (Amorós, 2003; Agustí, 2003; Orozco-Santos *et al.*, 2014).

El portainjerto cítrico es un componente importante debido a que confiere resistencia o tolerancia a diferentes condiciones bióticas y abióticas (Castle, 2010). El uso del injerto, permite usar un árbol resistente a enfermedades y plagas pero con baja calidad de fruta como el patrón o sostén de otro árbol con fruta de alta calidad, que se injerta sobre el primero (Agustí, 2003).

La selección del patrón representa, en la actualidad, un aspecto fundamental en la citricultura. Los portainjertos de los cítricos influyen en la absorción de nutrimentos,

resistencia o tolerancia a plagas y fitopatógenos, así como tolerancia a sequía. El portainjerto puede hacer la diferencia entre una huerta productiva y una no productiva. Actualmente, son numerosas las especies empleadas como portainjertos entre ellos: *Poncirus trifoliata*, *Citrus macophylla*, citrange “carrizo”, mandarina Cleopatra, *Citrus volkameriana* y naranjo agrio (Amorós, 2003; Agustí, 2003; Orozco-Santos *et al.*, 2014).

1.2.1 Características de los portainjertos más utilizados en México

La aparición de enfermedades graves de los cítricos, fue el principal motivo que ha llevado a la búsqueda de patrones que hicieran posible la continuidad del cultivo. El comportamiento de los cítricos frente a las enfermedades está condicionado, por el portainjerto (Cuadro 1.2). Un ejemplo de ello es el naranjo agrio el cual es muy conocido por sus excelentes atributos agronómicos junto con su principal factor limitante, la susceptibilidad al virus de la tristeza de los cítricos. Ese virus fue responsable de la eliminación de industrias de cítricos en lugares como Australia, Argentina, Brasil, Estados Unidos, la región mediterránea y África del Sur (Castle, 2010). En México, donde la epidemia del virus no se presentó a un nivel perjudicial, el naranjo agrio sigue siendo el portainjerto predominante sobre todo en huertos viejos (Rivas *et al.*, 2010). Actualmente ya no es muy utilizado en viveros (Orozco-Santos *et al.*, 2014).

Cuadro 1.2. Principales portainjertos y su relación con enfermedades de los cítricos.

Patrón	Comportamiento en vivero	Características de la planta		Enfermedades	
		Atributos agronómicos	Exigencias ambientales	Susceptible a	Tolerante a
Naranja agrio <i>Citrus aurantium</i>	Vigoroso desarrollo vertical, tallo único.	Induce árboles de porte medio, precoces y longevos. Sistema radical superficial.	Tolerante a la sequía y suelos salinos.	CTV	Phytophthora ssp. Exocortis Xyloporosis
Limón macrofila <i>Citrus macrophylla</i>	Vigoroso desarrollo.	Induce un porte vigoroso, precocidad y alta productividad. Presenta un sistema radical profundo.	Susceptibilidad alta al frío y tolera la falta de humedad por periodos largos.	CTV Xyloporosis Tylenchulus semipenetrans	Exocortis Phytophthora ssp.
Limón volkameriano <i>Citrus volkameriana</i>	Vigoroso desarrollo antes y después de injertar.	Induce árboles vigorosos de buena producción, aunque de calidad media.	Susceptibilidad media al frío. Tolera suelos salinos y calizos.	Tylenchulus semipenetrans Blight Xyloporosis	CTV Exocortis
Mandarina cleopatra <i>Citrus reshni</i>	Desarrollo lento antes y después de injertar, tallo único.	Induce árboles vigorosos de menor altura, producción tardía con frutos pequeños.	Tolerante al frío y a los suelos salinos.	Armillaria mellea	Exocortis Phytophthora ssp. Xyloporosis
Naranja trifoliada <i>Poncirus trifoliata</i>	Vigor medio, desarrollo vertical y lento.	Induce árboles de porte medio y de baja producción.	No se adapta a suelos cálcicos.	Exocortis Radopholus similis	CTV Phytophthora ssp.
Limón rugoso <i>Citrus x jambhiri</i>	Desarrollo rápido uniforme, con tallo único.	Induce árboles de producción media y baja calidad.	No se adapta a suelos salinos	Phytophthora ssp. Armillaria mellea	Exocortis Xyloporosis

Stover and Castle, 2002; Amorós, 2003; Agustí, 2003; Castle, 2010; Orozco-Santos *et al.*, 2014.

1.3 Enfermedades de los cítricos

En México se han descrito al menos 50 patógenos que causan daños a los cítricos; sin embargo, solo algunos se consideran de importancia económica o tienen una ocurrencia variable o elevada (Orozco-Santos *et al.*, 2013).

En los últimos años, los cítricos han estado bajo el riesgo de plagas y enfermedades de importancia cuarentenaria (SENASICA, 2011). Entre los casos diversos actualmente con regulaciones por parte del gobierno de México destacan: el virus tristeza de los cítricos (CTV) y su vector el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*) (Rivas *et al.*, 2010), el virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) y sus vectores, ácaros pertenecientes al género *Brevipalpus* (Mora y Santillán, 2013); el Huanglongbing de los cítricos (HLB) o “dragón amarillo” y sus vectores los psíidos *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* (SENASICA, 2010). Si bien en la actualidad no existe cura absoluta para el HLB, la SAGARPA, a través del SENASICA y los gobiernos estatales, ha emprendido un ambicioso programa para su prevención y contención (Mora-Aguilera *et al.*, 2014); además, se avanza en las investigaciones para desarrollar materiales genéticos tolerantes a la enfermedad (DGSV-SENASICA, 2014).

1.3.1 El Huanglongbing

El Huanglongbing de los cítricos se encuentra presente en 39 países de los continentes Asiático, Africano y Americano; sin embargo, la especie *Candidatus Liberibacter africanus* se distribuye en África y Asia; *Candidatus Liberibacter americanus* sólo se encuentra en Brasil al igual que *Candidatus Liberibacter caribbeanus* en Colombia. Por su parte la especie de mayor distribución *Candidatus Liberibacter asiaticus*; se encuentra ampliamente distribuida en Asia de donde es originario, así como en Sudamérica, Centroamérica y Norteamérica (Santivañez *et al.*, 2014; EPPO, 2015) (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Ocurrencia de *Candidatus liberibacter* en el mundo.

Especie	Temperatura	Vector	Temperatura desarrollo vector	Ocurrencia	Detección	Cita
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-40 °C	<i>Diaphorina citri</i>	25-28 °C.	China	1890	Zhao, 1981
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-40 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Taiwan y las islas Filipinas	1950	Otake, 1990
<i>Candidatus Liberibacter africanus</i>	22-25 °C	<i>Trioza erytreae</i>	20-24 °C	Sudáfrica	1990	Garnier <i>et al.</i> , 2000
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-40 °C	<i>Diaphorina citri</i>	25-28 °C.	India	1996	Bové, 2006
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-40 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Brasil	2004	Coleta-Filho <i>et al.</i> , 2004
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-40 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Estados unidos	2005	Bové, 2006
<i>Candidatus Liberibacter americanus</i>	25-40 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Brasil	2005	Teixeira <i>et al.</i> , 2005
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-30 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Cuba	2006	Da Graca, 2008
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-30 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Belice	2009	SENASICA, 2009
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	22-30 °C	<i>Diaphorina citri</i>		México	2009	SENASICA, 2009
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-30 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Guatemala	2010	OIRSA, 2011
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-30 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Costa Rica	2011	OIRSA, 2011
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-30 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Argentina	2012	OIRSA, 2014
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	25-30 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Paraguay	2013	EPPO, 2015
<i>Candidatus Liberibacter caribbeanus</i>	25-40 °C	<i>Diaphorina citri</i>		Colombia	2014	EPPO, 2015

Una planta o árbol de cítricos que ha sido infectado con HLB no tiene cura, irremediablemente disminuirá su producción en calidad o cantidad, y después eventualmente detienen su desarrollo y producción de calidad a un nivel no rentable. *D. citri* está prácticamente en cualquier entidad donde se cultiva cítricos en México, y el HLB se ha

detectado, en campo y en áreas urbanas de 22 estados citrícolas del país, existe un riesgo elevado de daño para la citricultura nacional (Salcedo *et al.* 2010, SENASICA, 2016) (Figura 1.1). Para disminuir los riesgos del daño por HLB en la citricultura mexicana la DGSV-SENASICA ha realizado una propuesta para hacer un manejo regional de este problema (SENASICA-LANREF, 2012). Estas medidas regionales incluyen el uso de plantas sanas (libres de la bacteria), control del vector en Áreas Regionales de Control (ARCO's) mayores a 500 ha y eliminación de plantas enfermas entre otros (Salcedo *et al.* 2010, Mora-Aguilera *et al.* 2014; DGSV-SENASICA, 2014). El control de *D. citri* se basa primordialmente en el uso de aceites e insecticidas organosintéticos (López-Arroyo *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso irracional de estos últimos puede incrementar los riesgos de selección de resistencia por el psílido, se puede perturbar el equilibrio de otras plagas y sus enemigos naturales por ejemplo mosca prieta y ácaros, se puede ocasionar contaminación ambiental y daño directo al hombre (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013; Vázquez-García *et al.*, 2013). Conociendo la situación de la citricultura nacional y el HLB, se considera importante evaluar estrategias de control alternativo a *D. citri* y dentro de éstas el control biológico es una alternativa con potencial (López-Arroyo *et al.* 2008; Cortez-Mondaca *et al.*, 2010; Casique-Valdes *et al.*, 2011; DGSV-SENASICA, 2014).

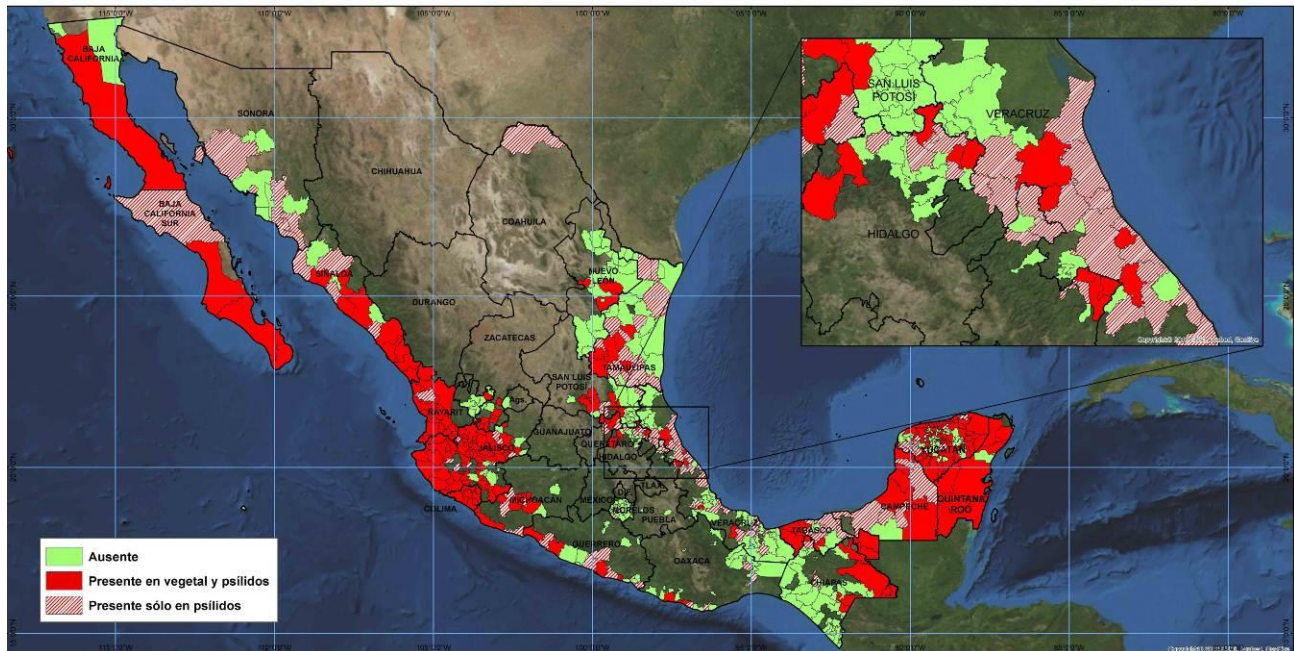





Figura 1.1. Estatus de la distribución del HLB y su vector en México. Créditos: SENASICA 2016. <http://sinavef.senasica.gob.mx/SIIVEF/HLB.aspx>.

1.3.2 Síntomas foliares

Los síntomas inducidos por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) en cítricos son variables y pueden ser similares a los causados por deficiencias nutrimentales y otros patógenos sistémicos. Los árboles afectados usualmente desarrollan uno o más brotes amarillos, de ahí el nombre de la enfermedad. Las hojas afectadas desarrollan un patrón de áreas amarillas y verdes sin límites definidos, dando apariencia de un moteado con un patrón asimétrico, siendo el síntoma más característico en hojas de árboles enfermos (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Las hojas también pueden llegar a ser más gruesas, con venas dilatadas y apariencia corchosa. Los síntomas varían de acuerdo al cítrico (Cuadro 1. 4), tiempo de infección, la etapa de la enfermedad, etc. y pueden ser confundidos o enmascarados con los síntomas de otras enfermedades como deficiencias de minerales como zinc, hierro,

manganeso, calcio, etc. (Bové, 2006). Sin embargo, la presencia del patógeno debe ser confirmada con métodos moleculares.

Cuadro 1.4. Variación de la expresión sintomática en cítricos infectados por CLas en México.

Cítrico	Síntomas iniciales	Síntomas severos	Síntomas típico
Limón mexicano <i>Citrus aurantifolia</i> ¹	Punteado clorótico	Moteado difuso, engrosamiento de nervaduras, brotes nuevos deformes y cloróticos, amarillamiento generalizado de la lamina foliar, clorosis, defoliación, muerte de ramas y posterior muerte.	
Limón persa <i>Citrus latifolia</i> ^{1,2}	Mancha angular, moteado difuso leve	Moteado difuso, engrosamiento y acorchado de nervaduras, brotes nuevos deformes y cloróticos, amarillamiento generalizado de la lamina foliar, clorosis, y defoliación.	
Naranja dulce <i>Citrus sinensis</i> ¹	Mancha angular	Moteado difuso, engrosamiento y acorchado de nervaduras, hojas con aspecto coriáceo y clorosis.	

¹Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; ²Flores-Sánchez *et al.*, 2015.

En limón mexicano existen estudios en huertos con manejo tecnificado y baja tecnología, en los que asociaron la severidad de los síntomas en relación a la concentración de clorofila en árboles sintomáticos, tomando como referencia cinco clases de severidad en el dosel (0, 25, 50, 75 y 100%). En los que reportan un efecto detrimental de clorofila en función de severidad con 24.9% reducción en hojas sintomáticas (100%) y de 1.3% en hojas

asintomáticas (25%); así mismo, la producción se redujo un 61% y 35.3% en baja tecnología y manejo tecnificado, respectivamente. Este estudio sugiere que el efecto fisiológico en limón mexicano es diferenciado por cronicidad-severidad del HLB y por manejo agronómico (Hernández-Chan *et al.*, 2014; Flores-Sánchez *et al.*, 2014).

1.3.3 Síntomas anatómicos

Dentro de las características histológicas inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), es la acumulación masiva de almidón en las hojas de naranja (Achor *et al.*, 2010), presumiblemente como resultado de la presencia de áreas necróticas del floema dispersas en todas partes del sistema vascular en los pecíolos de las hojas (Kim *et al.*, 2009). Sin embargo, Esquivel-Chávez *et al* (2012) no encontraron este efecto en el floema de las nervaduras centrales de hojas sintomáticas en limón persa y mexicano en un estudio donde se analizó la progresión de las alteraciones histológicas durante seis meses. Además, hay taponamiento de los tubos cribosos del floema con calosa y P-proteína (Folimonova y Achor, 2010). Este taponamiento de los tubos cribosos fue analizado cuantitativamente en tres cítricos diferentes y no se encontraron diferencias significativas ($P= 0.005$) en la concentración de proteínas entre cítricos pero si entre tejido sintomático y asintomático (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Koh *et al* (2011), reportan que el taponamiento con calosa inhibe el transporte de los fotoasimilados, lo cual contribuye al desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

Dos informes sobre la expresión génica de CLAs demostraron que hay varios genes implicados en el metabolismo de los hidratos de carbono regulados diferencialmente (Albrecht y Bowman, 2008; Kim *et al.*, 2009). Sin embargo, hace falta un amplio análisis de los cambios en los hidratos de carbono a nivel histológico para entender su efecto en la

expresión de la enfermedad. Diferentes estudios para determinar el incremento de metabolitos como respuesta temprana a la infección de CLas se han basado en estudios de expresión génica (Albrecht y Bowman, 2012; Hui-Ling y Burns, 2012; Albrecht y Bowman, 2008). En estos estudios se han detectado genes putativamente asociados al mecanismo de transporte, metabolismo de hidratos de carbono, respuesta de defensa, ROS, fotosíntesis, etc. Sin embargo, falta complementar estos resultados con estudios histológicos que muestren la expresión efectiva de dichos genes.

Musetti *et al.* (2010), menciona que la producción de proteínas es una respuesta de defensa y que la inducción del gen P1-AAC15 está indirectamente relacionado con el desarrollo de síntomas. Esto puede ser resultado de la respuesta de la planta para sellar los tubos cribosos con una barrera en contra del aumento y la distribución de la población de la bacteria, además, esta respuesta de taponamiento se relaciona directamente con la oclusión y consecuente deformación del floema derivado de la diferenciación celular de las células acompañantes del floema (hiperplasia) inducido por la presencia de CLas en los cítricos.

1.3.4 Variedades de cítricos y su relación con CLas

Diferentes estudios han clasificado a las variedades de cítricos como: susceptibles, moderados y tolerantes (Cuadro 1.5). Un ejemplo de esto son los reportes en los cuales describen al limón persa como tolerante a CLas presentando síntomas leves con relación a títulos altos de la bacteria en las plantas (Folimonova *et al.*, 2009). Por otra parte existen reportes de cultivares altamente tolerantes a CLas; por ejemplo, *Poncirus trifoliata* ha sido utilizado como portainjerto, estos árboles no presentan síntomas de la enfermedad infectados de forma natural en campo (Albrecht and Bowman, 2011; Folimonova *et al.*, 2009; Stover *et al.*, 2001). Además, se reporta que los extractos de los frutos y semillas de *Poncirus*

trifoliata han sido ampliamente utilizados como compuestos antibacterianos (Rahman *et al.*, 2009). Albrecht and Bowman (2011), mencionan que estos compuestos pueden estar involucrados en la reducción del desarrollo o movimiento de CLas, causando la resistencia o tolerancia a CLas.

En general estos trabajos se han evaluado a nivel de invernadero con inoculaciones por injerto. Sin embargo existen pocos estudios de susceptibilidad en combinación de injerto-portainjerto. Un estudio sobre portainjertos de limón mexicano reveló diferencias en la expresión sintomática del HLB en este cítrico, *C. macrophylla* el portainjerto más utilizado en la región productora de Tecomán, Colima, presentó mayor expresión sintomática comparada con *C. volkameriana* el cual expresó síntomas de moderados a leves (Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha detectado un huerto en producción de naranja dulce el cual presenta niveles de severidad altos en la expresión sintomática del HLB, estos síntomas no son predominantes para cítricos de las condiciones de México (Robles, 2012 comunicación personal). Interesantemente en la península de Yucatán donde la disponibilidad del HLB no alcanza los niveles de colima, el patrón predominante con naranja dulce es naranjo agrio.

Cuadro 1.5. Respuesta de diferentes genotipos de cítricos a la infección *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Nombre científico	Nombre común	Uso	CLas ⁱ	Descripción del síntoma	Cita
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	Naranja valencia	Variedad	+++	Susceptible-clorosis incluyendo la reducción del crecimiento, muerte	Albrecht and Bowman, 2011; Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Limón Mexicano	Variedad	+++	Susceptible-clorosis generalizada manchas cloróticas dispersas en hojas, reducción del crecimiento en brotes, muerte de plantas	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. amblycarpa</i> (Hassk.) Ochse	Mandarina híbrida	Variedad	+++	Variable-clorosis y una cierta reducción del crecimiento	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>Citrus reshni</i> Hort ex Tan	Mandarina Cleopatra	Variedad	+++	Variable-hojas cloróticas, cierta reducción del crecimiento en brotes	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. reticulata</i> Blanco	Mandarina Sun Chu Sha	Variedad	+++	Moderadamente tolerante dispersos grupos de hojas cloróticas	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. aurantium</i> L.	Naranjo agrio	Portainjerto	+++	Moderadamente tolerante con clorosis elevada	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. volkameriana</i> Pasq.	Limón Volkameriana	Portainjerto	+++	Moderadamente tolerante dispersos grupos de hojas cloróticas.	Albrecht and Bowman, 2011; Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. macrophylla</i> Wester	Limón macrofila	Portainjerto	+++	Moderadamente tolerante dispersos grupos de hojas cloróticas.	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>X Citroncirus webberi</i> J. Ingram & H. E. Moore	Swingle citrumelo	Variedad	+++	Moderadamente tolerante amarillamiento de las hojas más viejas.	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>X Citrofortunella microcarpa</i> (Bunge) Wijnands	Calamondin	Variedad	+++	Moderadamente tolerante síntomas leves en las hojas más viejas.	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>Citrus micrantha</i> Wester	Lima	Variedad	+++	Moderadamente tolerante síntomas leves en las hojas más viejas.	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. latifolia</i> Tanaca	Limón persa	Variedad	+++	Tolerante. Síntomas poco o nada.	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>Citrus halimii</i> B. C. Stone	Lima	Variedad	++	Susceptible, clorosis, acorchado de la nervadura,	Folimonova <i>et al.</i> , 2009

				muerte de plantas.	
<i>C. reticulata</i> Blanco	Tangerina clementina	Variedad	++	Susceptible-clorosis en la punta de las hojas, crecimiento reducido, muerte	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. × tangelo</i> J. Ingram & H. E. Moore	Tangelo Minneola	Variedad	++	Susceptible-clorosis en la punta de las hojas, reducción del crecimiento	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. paradisi</i> MacFadyen	Pomelo Duncan	Variedad	++	Susceptible-clorosis incluyendo la reducción del crecimiento, muerte	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>Citrus medica</i> L.	Citron	Variedad	++	Moderadamente tolerante síntomas fuertes en las hojas más viejas	Stover <i>et al.</i> , 2001; Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. paradisi</i> MacFadyen	Pomelo rojo rubí	Variedad	++	Susceptible-clorosis en la punta de hojas, reducción del crecimiento	Albrecht and Bowman, 2011
<i>C. maxima</i> (Burm.) Merr.	Pomelo rosa Hirado Buntan	Variedad	++	Variable-fuertes síntomas en hojas jóvenes y viejas	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. indica</i> Tanaka	Limón	Variedad	++	Variable y principios de clorosis severa en hojas	Stover <i>et al.</i> , 2001; Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>Citrus medica</i> L.	Cidra	Variedad	++	Moderadamente tolerante síntomas fuertes en las hojas más viejas	Stover <i>et al.</i> , 2001; Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>C. limonia</i> Osbeck	Limón Eureka	Variedad	++	Tolerante-no presenta síntomas	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
X <i>Citroncirus webberi</i> J. Ingram & H. E. Moore	Carrizo citrange	Portainjerto	+	Tolerante. Clorosis poca o ninguna	Folimonova <i>et al.</i> , 2009
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.	Naranja trifoliada	Portainjerto	+/-	Inconsistente	Albrecht and Bowman, 2011; Stover <i>et al.</i> , 2001
<i>Citrus latipes</i> (Swingle)	Khasipapeda	Portainjerto	+/-	Inconsistente	Stover <i>et al.</i> , 2001

¹ Concentración de títulos bacterianos +++ Alta concentración y + título bajo pero muestra positiva.

La naranja trifoliada (*P. trifoliata*), comúnmente utilizada como patrón y algunos de sus híbridos no expresan síntomas distintivos a la infección de CLas. Albrecht y Bowman (2011), observaron mayores rendimientos de las plantas de naranja trifoliada y US-897 cultivadas en invernadero y campo, por lo que reportaron tolerancia de estos genotipos a CLas. Estos mismos autores (Albrecht y Bowman, 2012), evaluaron el comportamiento a 18 meses después de la inoculación de CLas en ocho portainjertos Carrizo, US-897, US-942, US-802, US-812, Benecke naranja trifoliada, limón Volkameriano y mandarina Cleopatra. Estos autores los clasificaron como: a) Tolerantes a Carrizo, US-897 y US-942; b) Moderadamente tolerante a US-802, US-812 y limón Volkameriano; y c) Susceptible a mandarina Cleopatra. Albrecht y colaboradores (2012) reportaron que el patrón (híbridos de mandarina, 'Pomelo' con naranja trifoliada, así como, citranges, naranjo agrio, limón volkameriano y mandarinas) en naranja dulce no indujo altos niveles de resistencia a CLas, aunque, detectaron diferencias en la expresión de los síntomas, daño en dosel, crecimiento del tallo, y calidad de la fruta en algunos portainjertos. En su trabajo no reportan relación con el tiempo de infección o cronicidad de la enfermedad pero sus datos sugieren q en limón volkameriano y naranjo agrio existe un efecto retardado en la severidad de los síntomas (Figura 1.2), lo cual podría coadyuvar en el manejo integrado del cultivo de los cítricos con la enfermedad del Huanglongbing y su combinación injerto-portainjerto.

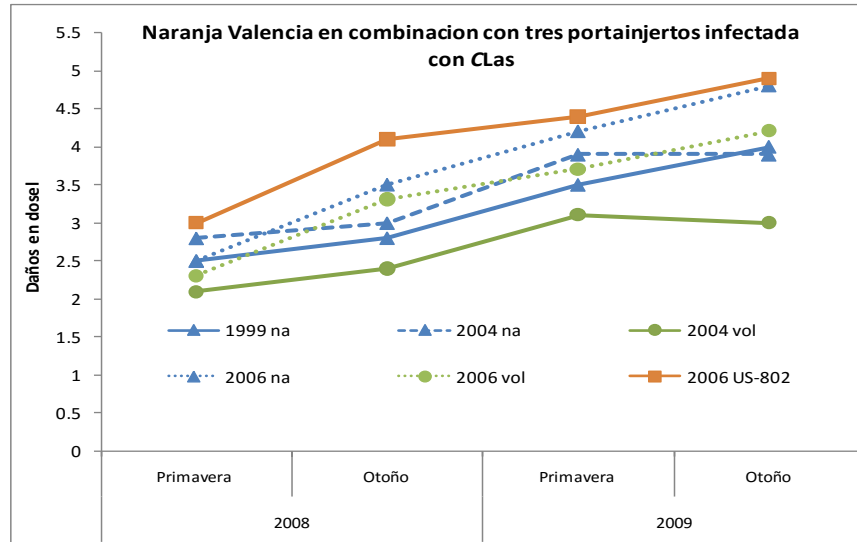


Figura 1.2. Severidad de síntomas de HLB en Naranja dulce y su combinación con naranjo agrio (na), limón volkameriano (vol) y el híbrido US-802. Daños en dosel a partir de la clasificación del 1 (copa del árbol completo y poca muerte regresiva) al 5 (muerte regresiva / defoliación en más del 60% de la copa de los árboles y/o retraso en el crecimiento severo del árbol). Elaborada con datos de: Albrecht *et al.*, 2012.

1.3.5 Concentración y distribución de CLas

CLas infecta todas las especies de cítricos, pero cada especie presenta diferencias en la expresión sintomática (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). Se tienen reportes que indican la relación inversa entre los síntomas que se presentan en el hospedante y la concentración bacteriana (Folimonova *et al.*, 2009; Stover *et al.*, 2001). Por otra parte, Flores-Sánchez *et al.* (2015), describió la relación de la concentración bacteriana con la severidad y sus resultados afirman que la expresión de síntomas está directamente relacionada con la cantidad de la concentración bacteriana. Esta relación pudiera asociarse con las alteraciones inducidas a nivel celular diferenciando los síntomas macroscópicos. En estudios de actividad fotosintética, las unidades clorofila fueron muy bajas con alto nivel de severidad (Flores-Sánchez, 2014).

La concentración bacteriana en las plantas de cítricos presenta una distribución irregular dentro de una rama y entre ramas de todo el dosel del árbol. Teixeira *et al.*, (2008), evaluaron la concentración de CLam en naranja dulce, a partir de PCR convencional y tiempo real (PCR-TR), utilizadas para la cuantificación de CLam en las hojas. Aunque PCR-TR fue capaz de detectar hasta 10 CLam por gramo de tejido (1/g), no pudo ser detectada en algunas hojas asintomáticas de una rama positiva, mientras que en las hojas con moteado de ramas sintomáticas de un mismo árbol, el título de CLam alcanzó valores tan altos como 10^7 1/g. Estos resultados demuestran la distribución heterogénea del HLB (Figura 1.3). En comparación con los cítricos agrios en México infectados con CLas, estos presentan síntomas en ramas completas pero los brotes terminales de estas ramas se mantienen asintomáticos por un período hasta de 45 días. Esto se puede explicar por el mayor taponamiento y deformación del floema en los cítricos agrios (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Es muy probable que la heterogeneidad observada en naranja dulce se encuentre en los cítricos agrios. Sin embargo, las tasas de brotación más intensas, la severidad de los síntomas y la defoliación sugieren que la movilidad bacteriana podría ser más intensa. Sin embargo, los estudios histológicos indican un fuerte bloqueo del floema a partir del incremento en el índice de hiperplasia (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Esto sugiere que podría limitar la translocación de la bacteria a puntos de crecimiento vegetativos por cierto tiempo en función de la severidad del síntoma. Visiblemente esto se observa en brotes nuevos con síntomas en el crecimiento vegetativo de la estación previa pero ausentes en el crecimiento nuevo (Figura 1.4). No obstante, la multiplicación temporal y progresiva de CLas dentro de la planta es poco conocida, así como la translocación a partir del injerto de

material tomado de cítricos infectados. Aunque se conoce, que el tiempo entre la transmisión del patógeno y la expresión de síntomas es variable (tres a cuatro meses después del injerto), o después de ocho meses de la alimentación por el vector (Hung *et al.*, 2001). Se ha demostrado que las condiciones experimentales, tales como la temperatura y la condición del tejido vegetal utilizado para el injerto, tienen influencias significativas en la transmisión de la enfermedad (Lopes y Frare, 2008; Loeza, 2015 comunicación personal).

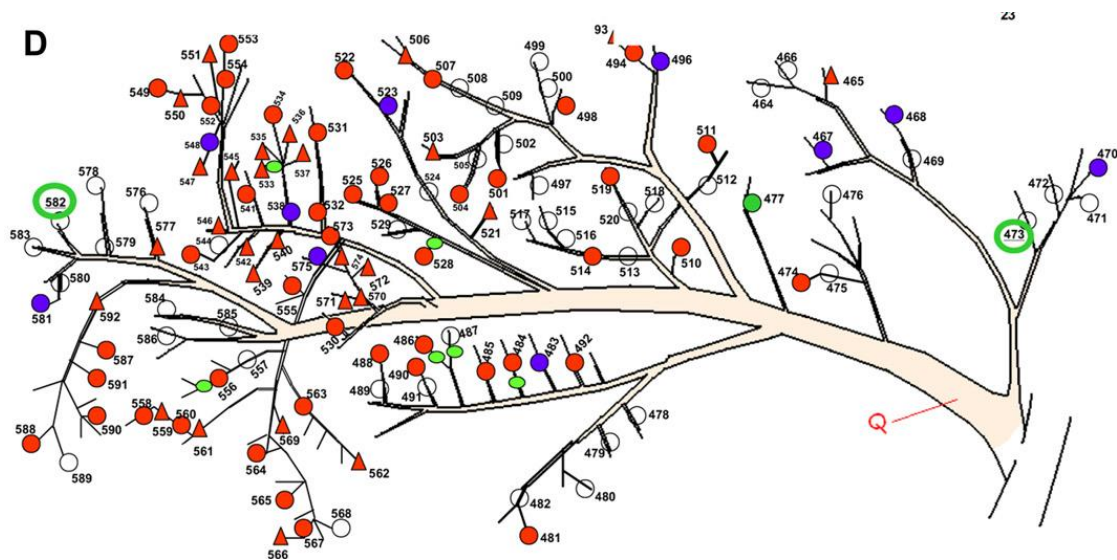


Figura 1.3. Distribución del CLam en subramas proveniente de un árbol positivo. A) Triángulos muestras positivas con síntomas de moteado; B) círculos rojos muestras positivas sin síntomas; C) círculos azules muestras negativas a PCR convencional y positivas RT-PCR con deficiencia de zinc; D) círculos blancos negativos; E) círculos verdes negativos PCR-convencional y positivos RT-PCR; y F) elipses verdes frutos afectados (Teixeira *et al.*, 2008).

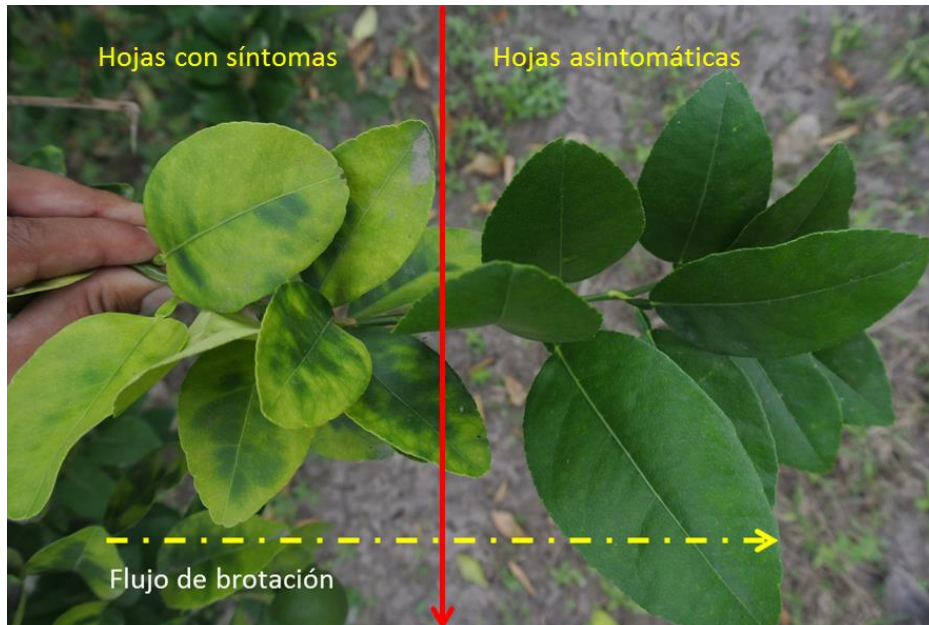


Figura 1.4. Efecto putativo del bloqueo a nivel del floema induciendo una obstrucción temporal en la distribución de CLas en dirección al siguiente flujo de crecimiento en ramas de limón mexicano. Foto créditos: Fabiola Esquivel, 2012.

Esquivel-Chávez y colaboradores (2012), realizaron un trabajo con respecto a la histología de limón mexicano y persa, mediante la evaluación de cinco variables, en el que reportaron que estos cítricos son más susceptibles a la infección por CLas y que las alteraciones a nivel celular incrementan con el tiempo de infección y a su vez están relacionados con el tipo de manejo agronómico y la edad de los árboles. Sin embargo, en dicho trabajo no se controló el tiempo de infección, la concentración bacteriana, ni la edad de los árboles, los cuales son factores estrechamente relacionados con el tipo de síntomas y alteraciones que pudiera estar induciendo la bacteria en diferentes hospedantes.

En México la enfermedad “Huanglongbing”, causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), ha sido más prevalente en cítricos agrios. La mayoría de los reportes son en limón mexicano en el que se ha estimado pérdidas hasta de un 75% (Robles-González *et al.*, 2013; Bermúdez-Guzmán *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2014); pero la enfermedad afecta todos

los cultivares de cítricos presentando variación en la expresión sintomática desde la presencia en árboles asintomáticos hasta árboles con síntomas severos. Sin embargo, poco se sabe del efecto de CLas en la expresión de síntomas en combinaciones injerto-portainjerto. En contraste con estos trabajos, la información sobre la dinámica en la expresión sintomática y fisiológica asociadas con el deterioro del sistema de transporte en tejidos foliares de árboles infectados CLas es escasa. En este trabajo se determinará la asociación de características de la expresión sintomática de HLB y la concentración bacteriana, comparando estos parámetros en tejidos sanos, asintomáticos y sintomáticos de diferentes cítricos de importancia comercial y su combinación injerto-portainjerto. Por lo anterior se planteó la siguiente hipótesis y objetivos generales.

Hipótesis

La concentración y distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* está condicionada por flujos de crecimiento en las plantas y limitada aún más por el daño que ésta induce en los cítricos dependiente de su combinación injerto-portainjerto, esto deriva en un efecto diferencial en el potencial de inóculo.

Objetivos generales

- 1) Evaluar el efecto de la combinación injerto-portainjerto en la expresión de síntomas de CLas y su concentración en limón mexicano, persa y naranja dulce.
- 2) Evaluar la concentración y distribución bacteriana y su efecto en la expresión sintomática e histológica en plantas de limón mexicano injertadas en tres patrones.
- 3) Evaluar las implicaciones de la combinación naranja dulce-patrón en la concentración bacteriana y los cambios histológicos a nivel del tejido foliar.

1.4 Literatura Citada

- Achor D., E. Etxeberria, N. Wang, S.Y Folimonova., K.R Chung. and G. Albrigo. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal* 9: 56-64.
- Agusti, M. 2003. *Citricultura*. 2^{da} Edición, revisada y ampliada. Ediciones Mundi-Prensa. 422 p.
- Amoros, C. M. 2003. *Producción de agrios*. 3^{ra} edición, revisada y ampliada. Ediciones Mundi-Prensa. 352 p.
- Albrecht, U., and Bowman, K.D. 2008. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science* 175: 291–306.
- Albrecht U. and K. D. Bowman. 2011. Tolerance of the Trifoliolate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HortScience*. 46:16-22.
- Albrecht U. and K. D. Bowman. 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science* 185(186): 118–130.
- Albrecht, U., McCollum, G., Bowman, K.D. (2012). Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. *Scientia Horticulturae* 138: 210–220.
- Bermúdez-Guzmán, M. de J., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Orozco-Santos M., Loeza-Kuk, E., Michel-López, C. Y., Cortez-Mondaca, E., Lucero-Pulido, M. C. 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. Disponible en: <http://escholarship.org/uc/item/9jw2w985>
- Bove J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
- Casique-Valdes, R., Reyes-Martínez, A. Y., Sanchez-Peña, S. R., Bidochka, M. J., and Lopez-Arroyo, J. I. 2011. Pathogenicity of *Hirsutella citriformis* (Ascomycota:

- Cordycipitaceae) to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). Florida Entomologist 94: 703-705.
- Castle, W.S. 2010. A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. HortScience 45: 11–15.
- Coletta-Filho, H. D., Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., De Negri, J. D., Pompeu, J., Jr, Machado, M. A., Amaral, A. M. & Muller, G. W. 2004. First report of the causal agent of Huanglongbing (‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’) in Brazil. Plant Disease 88, 1382.
- Cortez-Mondaca, E., Lugo-Angulo, N. E., Perez-Marquez, J., and Apodaca-Sánchez, M. A. 2010. First Report of *Diaphorina citri* Kuwayama natural enemies and parasitism in Sinaloa, México. Southwestern Entomologist 35: 113-116.
- Da Graca, J. V. 2008. Biology, History and World Status of Huanglongbing. 7 pp. In: memorias del I Taller Internacional sobre Hunaglongbing de los Cítricos *Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). 7-9 de Mayo, 2008. Hermosillo, Sonora, México.
- DGSV-SENASICA. 2014. Detecciones de HLB en México, comunicados en pdf números 02 al 11. [En línea]. Disponible en <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9361> Fecha de consulta: 12 de Diciembre de 2015.
- EPPO. 2015. PQR-EPPO data base on quarantine pests. Disponible en <http://www.eppo.int>
- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. Á., Flores-Sánchez, J. L., López-Arroyo, J. I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Agrociencia 46: 769-782.
- Flores-Sánchez, J., Mora-Aguilera, G., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., Velázquez-Monreal, J., y Manzanilla, M. 2014. Impacto productivo y fisiológico inducido por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón mexicano a cuatro años de Ingreso en Colima. Revista Mexicana de Fitopatología 32 (Suplemento): S54. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen322014>
- 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.

- Folimonova, S.Y., C. J. Robertson, S.M. Gamsey, S. Gowda, and W.O. Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354.
- Folimonova, S. Y. and Achor, D. S. 2010. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100: 949-958.
- Garnier, M., Jagoueix, S., Cronje, E., Le, R. P., Roux, F. G., 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 '*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*.' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2119-2125.
- Grafton-Cardwell, E. E., Stelinski, L. L., and Stansly, P. A. 2013. Biology and management of Asian Citrus Psyllid, vector of the Huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology* 58: 413-32.
- Hernández-Chan, E., Mora-Aguilera, G., Cano-Medrano, R., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J.I., Velázquez-Monreal, J., Flores-Sánchez, J., y Domínguez-Monge, S. 2014. Efecto fisiológico y nutrimental del HLB en limón mexicano. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32 (Suplemento): S97. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen322014/>
- Hui-Ling, L., and Burns, J. K. 2012. Gene expression in *Citrus sinensis* fruit tissues harvested from Huanglongbing-infected trees: comparison with girdled fruit. *Journal of Experimental Botany*, 1-13. doi:10.1093/jxb/ers070.
- Hung, T. H., Wu M. L., and Su, H. J. 2001. Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus Huanglongbing. *European Journal of Plant Pathology* 107: 183–189.
- Kim, JS, U.S. Sagaram, J.K. Burns, J.L. Li, N. Wang. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50–7.
- Koh J. E., L. Zhou, D. S. Williams, J. Park, N. Ding, Y. P. Duan, B. H. Kang. 2011. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". DOI 10.1007/s00709-011-0312-3.

- López-Arroyo, J. I., Jasso, J., Reyes, M. A., Loera-Gallardo, J., Cortez-Mondaca, E., Miranda, M. A. 2008. Perspectives for biological control of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in Mexico. *In: Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing*. Abstract 11.8. USDA, University of Florida. Orlando, Florida.
- López-Arroyo, J.I., Loera-Gallardo, J., Rocha-Peña, M.A., Berlanga, A., Hernández-Torres I. y Almeyda-León, I.H. 2010. Perspectivas para el control biológico del pulgón café y psílido asiático de los cítricos en México. pp. 152-166. *In: Velázquez-Monreal, J.J., Robles-González, M.M., Medina-Urrutia, V.M., Manzanilla-Ramírez, M.A., Orozco-Santos, M., (Ed.). Tristeza de los cítricos y Huanglongbing: Temas selectos*. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Col., Méx
- Lopes, S. A., and Frare, G. F. 2008. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. *Plant Dis.* 92:21-24.
- Manzanilla, R.M.A., Robles, G. M.M., Velázquez, M. J.J., Orozco, S.M. 2015. Manejo integral del cultivo de limón mexicano en un escenario de alta incidencia de HLB. Folleto para productores. SAGARPA INIFAP-CIRPAC Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima. México 48 p.
- 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. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(2): 106-119.
- Mora, A.G., y Santillan, G.M.T. 2013. Ficha Técnica No. 35 Leprosis de los cítricos *Citrus leprosis virus C*. Actualización 2015. SENASICA, Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LANREF-CP). ISBN: 978-607-715-154-8. 38: 26 p.
- Musetti, R., Paolacci, A., Ciaffi, M., Tanzarella, O. A., Polizzotto, R., Tubaro, F., Mizzau, M., Ermacora, P., Badiani, M., and Osler, R. 2010. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *The American Phytopathological Society.* 100 (4): 390-399.
- OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). 2011 y 2014. www.oirsa.org/portal/noticias.html
- Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Hernández-Fuentes, L.M., y Nieto-Ángel, D. 2013. Manejo integrado de

- plagas y enfermedades en limas acidas (limón mexicano y limón persa). Memoria científica No. 1. XI Congreso Internacional de Cítricos. Memoria del simposio Internacional sobre HLB en cítricos ácidos. INIFAP.
- Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Bermúdez-Guzmán, M.J., Carrillo-Medrano, S. H., Medina-Urrutia, V. M., Hernández-Fuentes, L.M., Gómez-Jaimes, R., Manzano-Sánchez, G., Farías-Larios, J., Nieto-Ángel, D., Mijangos-Hernández, E., Sánchez-de la Torre, J.A. y Varela-Fuentes, S. 2014. El Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 449p.
- Otake, A. 1990. Bibliography of citrus greening disease and its vectors attached with indices, and a critical review on the ecology of the vectors and theirs control. Japanese International Cooperation Agency 16 p.
- Rahman, A, Al-Reza, S.M., Yoon, J.f., and Kang, S.C. 2009. *In vitro* inhibition of foodborne pathogens by volatile oil and organic extracts of *Poncirus trifoliata* Rafin. seeds. J. Sci. Food Agr. 89:876-881.
- Rivas, V.P., Loeza K.E., Mora A.G., Ruíz G.N., Ochoa M.D.L., Gutiérrez E.A., y Febres V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del Citrus tristeza virus de Yucatán y Tamaulipas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1:493-507.
- Robles, G. M., Velázquez, M. J.J., Manzanilla, R. M.A., Orozco, S. M., Flores, V. R., Medina, U. V.M. 2011. El HLB en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] su dispersión y síntomas en Colima, México. In: Segundo Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el Huanglongbing en México. Diciembre 2011. Montecillo. México.
- Rocha-Peña, M.A., y Padrón-Chávez, J.E. (Eds.). 2009. El Cultivo de los Cítricos en el Estado de Nuevo León. Libro Científico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. CIRNE. Campo Experimental General Terán. México. 475 p.
- Salcedo B, D., Hinojosa, R., Mora, A. G., Covarrubias, G. I., DePaolis, F., Cántora, G. C., y Mora, F. S. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p.

- Santivañez, C.T., Vernal, H.P., Mora, A.G., Díaz, P.G., y López, A.J. I. 2014. Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. Libro técnico, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). ISBN: 978-92-5-107711-5. 73 p.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2009. <http://www.senasica.gob.mx>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2010. <http://www.senasica.gob.mx>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2011. <http://www.senasica.gob.mx>
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). 2016. <http://sinavef.senasica.gob.mx/SIIVEF/HLB.aspx>
- SIAP (Sistema de información agrícola y pecuaria). 2016. Cítricos. Anuario estadístico de la producción agrícola. SAGARPA, México. [En línea]. Disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>. Fecha de consulta: 20 de enero de 2016.
- Stover, E., Bowman, K., McCollum, G., Niedz, R., Shatters, Jr. R., and Hall, D. 2001. Breeding citrus for HLB resistance at the USDA/ARS, U. S. Horticultural Research Laboratory, 2001 S. Rock Road, Ft. Pierce, FL 34945 ed.stover@ars.usda.gov
- Stover, E., and Castle, W. 2002. Citrus Rootstock Usage, Characteristics, and Selection in the Florida Indian River Region. Horttechnology 12(1): 143-147.
- Teixeira, C. D., Saillard C., Eveillard S., Danet, L. J., da Costa, P., Ayres, J.A. and Bové, J. 2005. *Candidatus* Liberibacter americanus, associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 1857–1862.
- Teixeira, D. C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E. C., Wulff, N. A., Eveillard-Jagoueix, S., Yamamoto, P.T., Ayres, A. J., Bove, J. M. 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.
- Trujillo-Arriaga, J., Sánchez-Anguiano, H. M., y Robles-García, P. L. 2008. In: Memoria del 1er. Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus*

- Liberibacter spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora, México. <http://www.concitver.com/HuanglongbingyPsilidoAsiatico/Indice.html>
- Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Manzo-Sánchez, G., Robles-González, M. M., Orozco-Santos, M., Carrillo-Medrano, S. H. 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.
- Vazquez-Garcia, M., Velazquez-Monreal, J., Medina-Urrutia, V. M., Cruz-Vargas, C. D., Sandoval-Salazar, M., Virgen-Calleros, G., and Torres-Moran, J. P. 2013. Insecticide resistance in adult *Diaphorina citri* Kuwayama from lime orchards in Central West Mexico. *Southwestern Entomologist* 38: 579-596.
- Zhao, X. Y. 1981. Citrus yellow shoot disease (Huanglongbing) - a review. *Proceedings of the International Society of Citriculture*. 1:466-469.

Capítulo 2

Implication of rootstock type on the quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Mexican lime tissue

Implicación del tipo de patrón en la distribución cuantitativa de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el tejido de limón mexicano

2.1 Resumen

El “Huanglongbing”, causado por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), está presente en varias zonas cítricas de América afectando principalmente cítricos dulces. En México, CLas ha sido más prevalente en cítricos agrios; sin embargo, existe un conocimiento limitado de la expresión de síntomas en diferentes combinaciones injerto-portainjerto. El objetivo fue analizar la concentración estacional y distribución de CLas en el tejido foliar así como en la expresión de síntomas en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) (Lm) injertado sobre *C. macrophylla* (Cm), *C. aurantium* (Ca) y *C. volkameriana* (Cv). Adicionalmente se comparó el efecto basal y distal al sitio de inoculación dividiendo cada planta en tres ramas y dos secciones. A partir de los 12 meses después de la inoculación (mdi) las plantas se muestrearon cada 30 días hasta los 20 mdi. Se extrajo el DNA de cada muestra y se cuantificó el número de copias de 16S rDNA CLas mediante q-PCR (1161 muestras totales). Se analizaron bajo un diseño de parcelas divididas (SAS[®] ver 9.4). Los tipos de síntomas expresados en las distintas combinaciones fueron contrastantes y consistieron predominantemente en punteado clorótico, moteado asimétrico y clorosis leve en Lm/Cv; moteado albino (3/7 plantas) y aclaramiento de nervaduras en Lm/Ca; muerte de ramas (7/7) y muerte de plantas (5/7) en Lm/Cm. A nivel dosel, la mayor severidad se observó en Lm/Cm (60-100% dosel sintomático). En promedio la mayor concentración fue 1.1×10^6 copias CLas/ μ l en la combinación de Lm/Ca en cinco fechas (P=0.001). En general se

detectó una tendencia inversamente proporcional a la expresión sintomática. Esta tendencia sobresalió en Lm/Cm. A mayor severidad (100%) menor concentración de CLas (Lm/Cm 4.2×10^5 , 18 mdi) y a menor severidad (50%) mayores títulos bacterianos (Lm/Cm 2.0×10^4 , 12 mdi). La combinación Lm/Ca se asoció con cierta tolerancia a CLas debido a que tuvo los títulos más altos de la bacteria ($P=0.001$) en cinco de nueve fechas pero una menor expresión de síntomas severos. Esto pudiera explicar las epidemias de baja intensidad en regiones de México con combinaciones de naranja dulce sobre Ca.

Palabras clave: Huanglongbing, *Citrus aurantifolia*, *Citrus aurantium*, *C. volkameriana*, *C. macrophylla* y q-PCR.

2.2 Introducción

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLas) infecta todas las especies de cítricos causando una expresión diferencial de síntomas (Folimonova *et al.*, 2009; 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, moteado con patrón asimétrico y frutos con pericarpio engrosado asimétricamente (Flores *et al.*, 2015; Esquivel *et al.*, 2012).

En México, CLas ha sido más severo en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) induciendo epidemias de mayor intensidad en el Pacífico Mexicano (Esquivel *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013; Mora-Aguilera *et al.* 2014a; Mora-Aguilera *et al.* 2014b; Flores *et al.*, 2015). La producción de este cítrico es la más afectada, ya que su rendimiento se reduce hasta 50% cuando la severidad es del 75 al 100% a nivel del dosel (Robles-González *et al.*, 2013; Mora-Aguilera *et al.*, 2014b; Flores *et al.*, 2015;). Velázquez-Monreal y colaboradores (2012), analizaron la expresión visual de síntomas inducidos por CLas en limón mexicano injertado en limón Macrofila (*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 condiciones de invernadero y campo, de naranja “Valencia” injertada en el híbrido trifoliado US-897 de naranja trifoliada (*P. trifoliata*) y mandarina “Cleopatra” (*C. reticulata*), concluyendo la existencia de tolerancia de este genotipo a la infección de CLas. En otro estudio los mismos autores (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 susceptibles a CLas (Albrecht y Bowman 2012). Albrecht y colaboradores (2012) reportaron que los patrones (mandarina Cleopatra, limón Volkameriano, Carrizo citrange, naranjo agrio, Benton citrange, limón rugoso, Kinkoji, Swingle citrumelo, US-942, US-897, US-852, US-812, US-802, y US-801) injertados con naranja dulce no indujeron altos niveles de resistencia a CLas, aunque, detectaron diferencias en la expresión de los síntomas foliares, 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 progresión en el tiempo 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 y CLam en tejidos de planta joven y adulta se ha estudiado en naranja dulce (Coletta-Filho *et al.*, 2010; Folimonova *et al.*, 2009; Kawabe *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2009a; Teixeira *et al.*, 2008). En estos trabajos no se evaluó el efecto de la combinación injerto-portainjerto y en general no se analizó el efecto de fecha 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 el efecto del portainjerto en un período de 20 meses a partir de la inoculación.

Este trabajo tuvo como propósito establecer el efecto del Limón mexicano injertado en tres portainjertos en la concentración estacional y distribución de CLas en el tejido foliar así como en la expresión de síntomas bajo la hipótesis de que la concentración y distribución de CLas ésta influenciada por el tipo de portainjerto y por el nivel de daño e inóculo en los tejidos foliares de los flujos de crecimiento de la estación previa, lo cual determina un efecto diferencial en la expresión de síntomas. En este trabajo se incluyeron los portainjertos *C. macrophylla*, *C. volkameriana* ampliamente empleados a nivel comercial y 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* y por estar asociado a regiones con baja prevalencia de CLas.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Portainjertos

Se obtuvieron plantas certificadas de *C. macrophylla* (*Cm*), *C. volkameriana* (*Cv*) y *C. aurantium* (*Ca*) de 6 meses de edad y 1.5cm de grosor de tallo para su uso como portainjertos de plantas de limón mexicano (*Lm*).

2.3.2 Inoculación

El inóculo provino de árboles de *Lm* de ocho años con síntomas de HLB mantenidos en condiciones de invernadero desde el 2010 en Tecomán, Colima. 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. Los brotes fueron usados como

varetas las cuales se injertaron en los portainjertos *Cm*, *Cv* y *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 sustrato. En esas mismas plantas, quince días después, se injertó una vareta de *Lm* negativa a *CLas* a una altura aproximada de 24 cm sobre el nivel del sustrato.

Los ensayos se establecieron en el 2013 en un invernadero del Campo Experimental Tecomán del INIFAP, en el estado de Colima con el fin de evitar mover fuentes de inóculo fuera de una región con alta prevalencia de *CLas*. El experimento constó de 6 tratamientos (Lm^{+CLas} / Cm , Lm^{+CLas}/Cv , Lm^{+CLas}/Ca , Lm^{-CLas} /Cm , Lm^{-CLas}/Cv , y Lm^{-CLas}/Ca); los primeros tres con siete repeticiones y los restantes, usados como testigos, con una repetición para un total de 24 plantas. Se consideró una planta como unidad experimental.

2.3.3 Evaluación de la expresión de síntomas

Se hicieron evaluaciones mensuales a partir de los 12 meses después de la inoculación (mdi) y hasta los 20 mdi. La evaluación de síntomas foliares se realizó con base al porcentaje de copa de plantas con síntomas aplicando 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 el tipo 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.

2.3.4 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 en cada rama. Se tomaron seis muestras foliares por planta con Lm^{+CLas} (3 ramas por 2 secciones distal y proximal) y una muestra de las plantas testigo. 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. Las muestras se trasladaron en frío al Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. México, para los análisis de laboratorio.

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

La detección y cuantificación de CLas se realizó 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 HLBs (FAM- AGACGG GTGAGT AAC GCG/3BQH1) (Li *et al.*, 2006). La mezcla de reacción para la qPCR consistió en 20 μ l, de los cuales 10 μ l son de Universal Probes Supermix (SsoAdvanced™ BIO-RAD), 120 nM de cada iniciador, 180 nM de sonda y 1 μ l de DNA 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/ μ l de 16sr DNA de CLas, dividido en alícuotas de 1:10, de las cuales se hicieron 5 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. El producto de PCR de las fechas uno (12 mdi) y nueve (20 mdi) se mandó a secuenciar con la finalidad de corroborar la infección de CLas.

2.3.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa SAS 9.4 (SAS Institute, Cary, NC). Mediante un diseño de parcelas subdivididas se comparó la combinación (Parcela grande), concentración de CLas (Mediana) y su distribución por ramas (Chica) en el progreso temporal de la enfermedad. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey, con significancia de $p \leq 0.05$, simultáneamente se calculó el área bajo la curva (ABCC) de la variable concentración de CLas.

2.4 . Resultados

2.4.1. Síntomas

A partir de la inoculación de CLas se efectuaron observaciones periódicas para registrar tipo e intensidad de los síntomas en tejidos de Lm. 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 2.1). La combinación de Lm/Ca presentó síntomas de punteado clorótico, moteado asimétrico, clorosis leve, moteado albino una planta y aclaramiento de nervaduras, los síntomas no se presentaron de forma individual, sino que en una misma planta se presentaron dos o tres síntomas (Cuadro 2.1).

Las plantas de la combinación de Lm/Cv presentaron punteado clorótico y moteado entre los 3 y 6 mdi, seguido de aclaramiento de nervaduras y clorosis a los 15 mdi exhibieron una reducción de crecimiento, defoliación y muerte de ramas. La combinación de Lm/Cm presentó punteados cloróticos, seguido de moteados y posteriormente amarillamiento total de hojas jóvenes y maduras. A 17 mdi, los síntomas fueron más severos acompañados de defoliación y muerte de ramas, 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. Con base en la severidad de los síntomas observados, las plantas se agruparon en tres categorías: moderadamente tolerantes, susceptibles y altamente susceptibles (Cuadro 2.1).



Figura 2.1. 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 2.1. Respuesta sintomática del limón mexicano y su combinación injerto-portainjerto a la infección por CLAs.

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 ^a
	2	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	MT
	3	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	MT
	4	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	MT
	5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	MT
	6	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	MT
	7	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	MT
MDI expresión de síntomas		6		12	12	7-8	15	19				
<i>C. volkameriana</i>	8	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	S
	9	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	S
	10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	S
	11	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	S
	12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	S
	13	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	S
	14	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	S
MDI expresión de síntomas			6	6		6-12	12	17	18			
<i>C. macrophylla</i>	15	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	AS
	16	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	AS
	17	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	AS
	18	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	AS
	19	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	AS
	20	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	AS
	21	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	AS
MDI expresión de síntomas		3		3-6	6	6-12	12	17	17	20		

^aMT= moderadamente tolerantes S= susceptible y AS= altamente susceptible.

2.4.2. Concentración y distribución de CLas

La distribución bacteriana fue heterogénea en relación a títulos altos. Se detectaron 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 (Cuadro 2.2). A los 12 mdi en Lm/Cm y Lm/Cv la mayor concentración se detectó en la región proximal, en Lm/Ca la máxima concentración se detectó en la región distal (Figura 2.2), manteniéndose estas concentraciones a través del tiempo. Así mismo, 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 2.3). La cual presentó altas concentraciones de CLas en cinco fechas de evaluación (13, 15, 16, 18 y 19 mdi) ($F < 0.0001$), mientras que en otras dos fechas (12 y 14 mdi) la concentración fue similar a la combinación con *C. volkameriana*. La combinación Lm/Cm superó las otras dos combinaciones en las fechas 17 y 20 mdi (Cuadro 2.3). Destaca que en esta combinación la severidad de síntomas se incrementó a los 17 mdi, presentó defoliación, así como muerte de ramas y plantas a 20 mdi, lo cual coincide con títulos bacterianos altos comparado con las otras dos combinaciones.

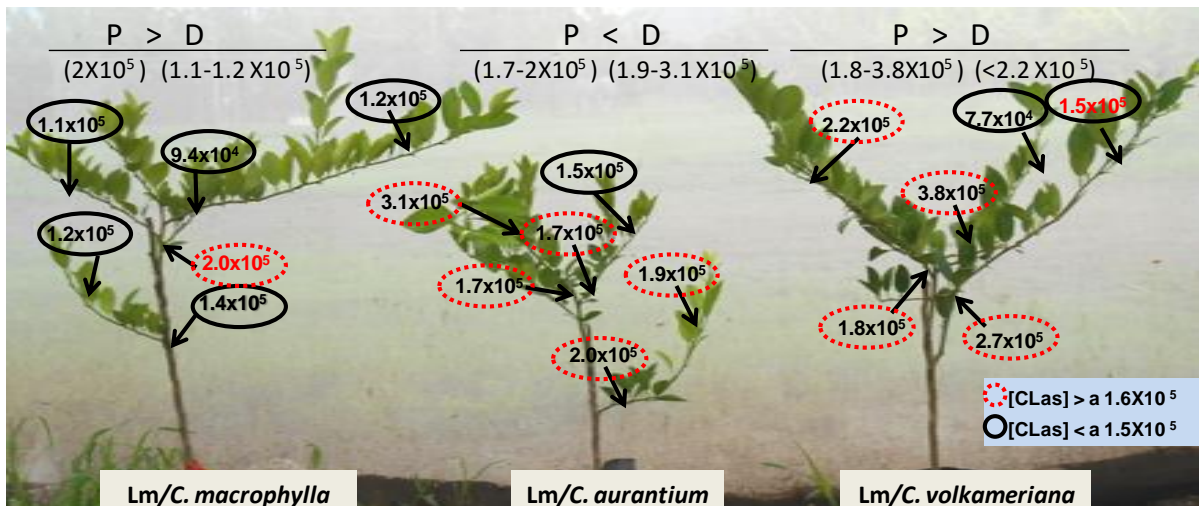


Figura 2.2. Concentración y distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* detectadas por análisis de q-PCR. En secciones proximal y distal al punto de injerto en ramas de limón mexicano sobre 3 patrones 12 meses después de la inoculación.

Cuadro 2.2. Promedio concentración y distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en tejido foliar limón mexicano injertado en los portainjertos *C. aurantium*, *C. volkameriana* y *C. macrophylla* bajo condiciones de invernadero.

MDI		Lm/Ca ^a			Lm/Cv			Lm/Cm		
		Ct	Concentración	log	Ct	Concentración	log	Ct	Concentración	log
12	r1d ^b	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
	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
18	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
	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
20	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
\bar{x}_{ABCC}	$\bar{r}d$		920574.96			460939.38			342214.60	
	$\bar{r}p$		1487111.61			812778.97			733760.40	

Los tipos de síntomas expresados en cada combinación de limón mexicano con los portainjertos fueron variados, la mayor severidad se observó en Lm/*C. macrophylla*. Se detectaron variaciones en la concentración de CLas entre las combinaciones de limón mexicano con *Ca Cv* y *Cm*; y entre ramas de cada planta (Figura 2.3). Las concentraciones entre la parte distal y la proximal respecto al punto de inoculación fueron diferentes (Figura 2.4) , esto asociado al desarrollo de los síntomas de la enfermedad, a mayor severidad menor concentración de CLas (LM/*Cm* 1.30×10^5 a 12 mdi; Cuadro 2.3) y a menor severidad mayores títulos de la bacteria (LM/*Ca* 1.99×10^5 a 12 mdi; Cuadro 2.3), esto último fue notorio en limón mexicano sobre *C. aurantium*, que presentó concentraciones mayores que las otras combinaciones durante cinco fechas de evaluación (Figura 2.3).

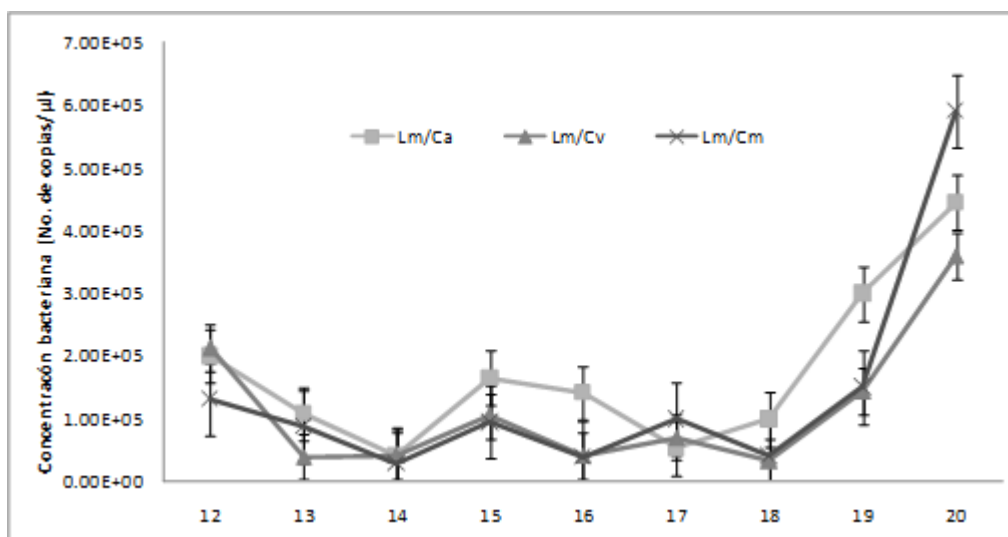


Figura 2.3. Cuantificación temporal de CLas, a partir de los 12 meses después de la inoculación, vía injerto, en limón mexicano injertado en los portainjertos *C. aurantium* (Lm/*Ca*), *C. volkameriana* (Lm/*Cv*) y *C. macrophylla* (Lm/*Cm*). Se omitieron los testigos por ser ceros.

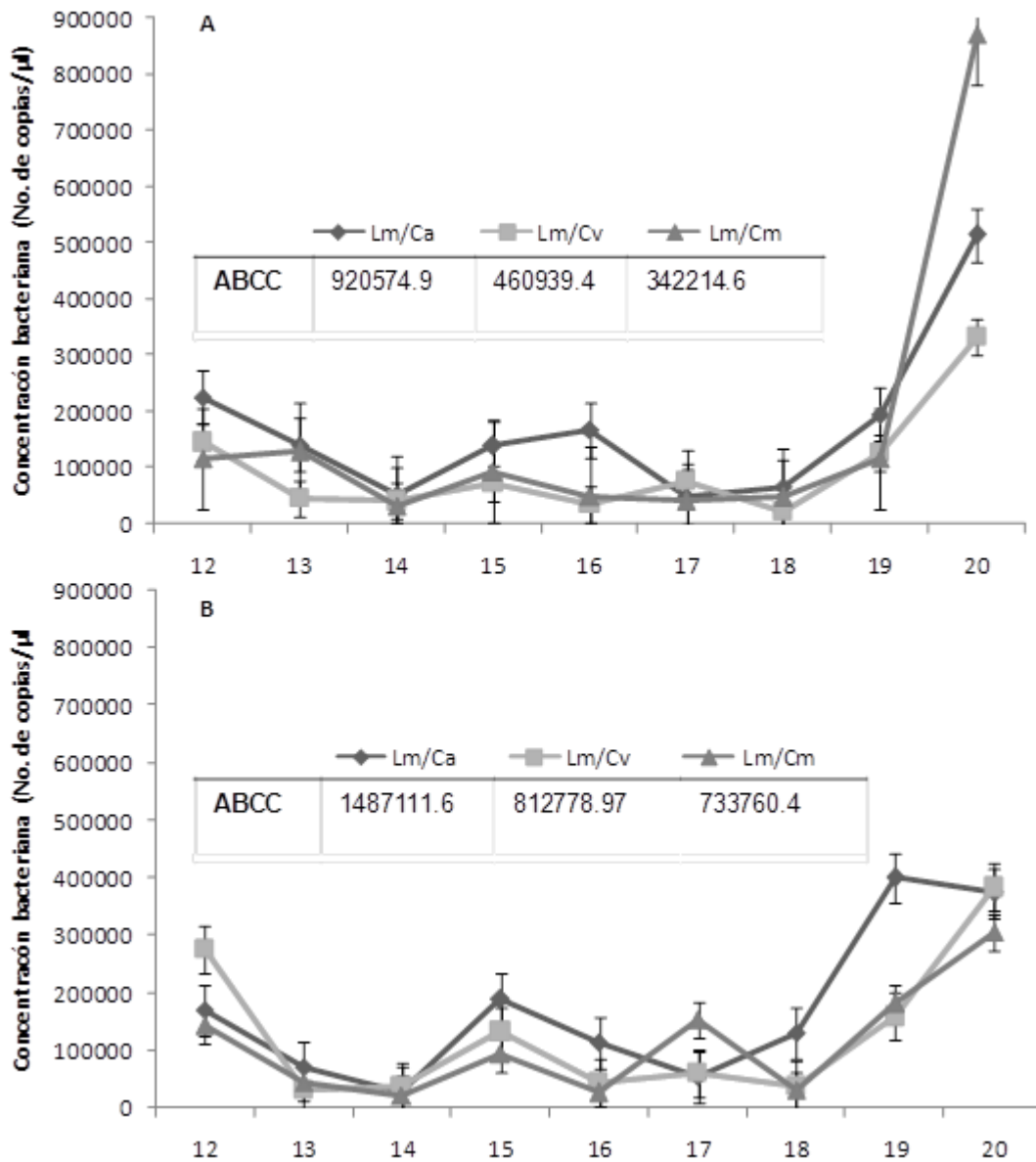


Figura 2.4. Cuantificación temporal de CLas, a partir de los 12 meses después de la inoculación, vía injerto, en limón mexicano injertado en los portainjertos *C. aurantium* (Lm/Ca), *C. volkameriana* (Lm/Cv) y *C. macrophylla* (Lm/Cm). A) Promedio de ramas distales. B) Promedio de ramas proximales. ABCC (Área bajo la curva de concentración). Se omitieron los testigos por ser ceros.

La tendencia inicial fue de forma decreciente entre los 12 a los 14 mdi, y de forma creciente a partir de los 15 a los 20 mdi. El mayor incremento se presentó de los 18 a los 20 mdi. Se presentó una fluctuación estacional. Por ejemplo, para el caso de limón mexicano sobre *C. aurantium* la distribución de la misma 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 2.2). 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.

Cuadro 2.3. Número de copias del gen 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de limón mexicano sobre tres portainjertos.

MDI	<i>Ca^a</i>				<i>Cv</i>				<i>Cm</i>			
	Ct	Concentración	Log		Ct	Concentración	Log		Ct	Concentración	Log	
12	26	1,99E+05	5,03	A ^b	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	

^aLm/*Ca*= *C. aurantium*; Lm/*Cv*= *C. volkameriana*; Lm/*Cm*= *C. macrophylla*.

^bMedias con letras diferentes son significativamente diferentes (P <0.0001).

2.5. Discusión

Las secuencias del inóculo y de los síntomas obtenidos en este estudio (Número de accesión en GenBank: KU159087) fueron iguales y se encuentran dentro de los registros del genoma *Candidatus Liberibacter asiaticus* reportados por Lin *et al.* (2008), por lo que este estudio representó la concentración, distribución y efecto en el tipo de intensidad de los síntomas de CLas en limón mexicano injertado en los portainjertos *C. aurantium*, *C. macrophylla* y *C. volkameriana*.

CLas se detectó en el 100% de las plantas evaluadas excepto en las plantas testigo. Los síntomas visuales se detectaron a los 6 mdi principalmente en Lm/Cm y Lm/Cv lo que sugiere que el período de incubación es menor en estas combinaciones. 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 2.8×10^4 (Lm/Cm) a 7×10^5 (Lm/Ca) copias por 0.1 g de tejido muestreado (Cuadro 3), destacando la fluctuación (decrementos e incrementos) estacional de la concentración de CLas.

En este trabajo se observó que la infección por CLas en limón mexicano sobre tres patrones difiere en al menos dos aspectos 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 (Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Tatineni *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008). Sin embargo, este es el primer trabajo que muestra la dinámica de la concentración intra-planta y en el tiempo a partir de la infección de CLas en limón mexicano. No obstante, la relación de la concentración bacteriana e intensidad de síntomas fue inversamente proporcional entre patrones, pero directamente proporcional dentro de cada patrón. Así la combinación con las severidades más altas observadas en *C. macrophylla* registró títulos bajos de CLas; en contraste, en la combinación de Lm/Ca se tuvo títulos altos del patógeno con síntomas de moderados a leves.

Este trabajo también es el primero que revisa naranjo agrio como patrón de Lm con fines experimentales dado que esta combinación es susceptible al Citrus tristeza virus. Sin embargo, moderada severidad de síntomas respecto a una alta concentración de CLas puede sugerir el porqué las epidemias han sido de baja intensidad en regiones de México con combinaciones de naranjo dulce sobre agrio y expresión asintomáticas en otros casos (Martínez-Bustamante *et al.*, 2015).

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, cabe resaltar, que en este trabajo se mantuvo la evaluación de los 12 hasta los 20 mdi, comparándolo con otros estudios en otras especies de cítricos en los cuales solo se hizo de los 6 hasta los 12 mdi (Coletta-Filho *et al.*, 2010; Folimonova *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2009a).

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 (Ananthakrishnan *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. La combinación Lm/Cv, segunda en la relación de severidad de síntomas, en la concentración también reafirma esta aseveración. A nivel comercial Cm (57%) y Cv (38%) son los más usados en Lm en el Pacífico Mexicano, esto puede explicar porque las epidemias han sido las más intensas en esta región con fuertes

efectos en pérdidas productivas, debido a períodos de incubación más cortos y mayor severidad en follaje con una fuerte reducción en unidades clorofila (Flores-Sánchez *et al* 2014).

Interesantemente, el efecto limitado en la disponibilidad de inóculo en las partes de crecimiento activo de la planta, podría estar relacionado con la concentración bacteriana. En Lm/Cm las regiones distales en general tuvieron la mayor concentración sugiriendo una rápida movilidad de la bacteria posiblemente por un menor índice de hiperplasia en los tejidos (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

2.6. Literatura Citada

- Albrecht, U., and Bowman, K. D. (2011). Tolerance of the Trifoliate Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. HortScience 46(1):16–22.
- Albrecht, U. and Bowman, K.D. (2012). Tolerance of trifoliate citrus rootstock hybrids to *Candidatus liberibacter asiaticus*. Scientia Horticulturae 147:71–80.
- Albrecht, U., McCollum, G., Bowman, K.D. (2012). Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. Scientia Horticulturae 138: 210–220.
- Ananthakrishnan, G., Choudhary, N., Roy, A., Sengoda, V. G., Postnikova, E., Hartung, J. S., Stone, A. L., Damsteegt, V. D., Schneider, W. L., Munyaneza, J. E., and Brlansky, R. H. (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.

- Bermudez-Guzman, M. de J., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Orozco-Santos M., Loeza-Kuk, E., Michel-López, C. Y., Cortez-Mondaca, E., Lucero-Pulido, M. C. (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.
- Boava, L. P., Sagawa, C. H. D., Cristofani-Yaly, M., and Machado, M. A. (2015). Incidence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’-infected plants among citrandarins as rootstock and scion under field conditions. *Phytopathology* 105:518-524.
- Castle, W.S. (2010). A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience* 45: 11–15.
- Coletta-Filho, H. D., Carlos, E. F., Alves, K. C. S., Pereira, M. A. R., Boscariol-Camargo, R. L., de Souza, A. A., and Machado, M. A. (2010). In plant multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 126:53–60.
- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. Á., Flores-Sánchez, J. L., López-Arroyo, J. I. (2012). Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782.
- Flores-Sánchez, J., Mora-Aguilera, G., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., Velázquez-Monreal, J., y Manzanilla, M. 2014. Impacto productivo y fisiológico inducido por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón mexicano a cuatro años de Ingreso en Colima. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32 (Suplemento): S54. <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen322014>

- 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.
- Folimonova, S.Y., Robertson, C. J., Garnsey, S.M., Gowda, S., and Dawson, W.O. (2009). Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354.
- Freitas-Astúa, J., Locali, E.C., Antoniollo, R., Rodríguez, V., Kitajima, E.W., and Machado, M. A. (2003). Detection of *Citrus leprosis virus* in citrus stems, fruits and the mite vector. *Virus Review Research* 8:196.
- Hu, H., Davis, M. J., and Brlansky, R. H. (2013). Quantification of live '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' populations using real-time PCR and propidium monoazide. *Plant Disease* 97:1158-1167.
- Hung, T. H., Wu M. L., and Su, H. J. (2001). Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus Huanglongbing. *European Journal of Plant Pathology* 107: 183–189.
- 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.
- Kawabe, K., Truc N. T. N., Lan, B. T. N., Hong, L. T. T., 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.

- 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.
- Li, W., Li, D., Twieg, E., Hartung, J. S., and Levy, L. (2008). Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR. *Plant Disease* 92:854-861.
- Li, W., Levy, L., and Hartung, J. S. (2009). Quantitative distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants with citrus Huanglongbing. *Phytopathology* 99 (2):139-144.
- Lin, H., Doddapaneni, H., Bai, X., Yao, J., Zhao, X., and Civerolo E. L. (2008). Acquisition of uncharacterized sequences from *Candidatus Liberibacter*, an unculturable bacterium, using an improved genomic walking method. *Molecular and Cellular Probes* 22: 30–37.
- Lin, H., Chen, C., Doddapaneni, H., Duan, Y., Civerolo, E. L., 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.
- Lopes, S. A., Bertolini, E., Frare, G. F., Martins, E. C., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., Fernandes, N. G., and Cambra, M. (2009a). Graft Transmission Efficiencies and Multiplication of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ in Citrus Plants. *Phytopathology* 99(3): 301-306.
- Lopes, S. A., Frare, G. F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N. G., Ayres, A. J., Marin, D. R., and Bové, J. M. (2009b). Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ is heat tolerant, ‘*Ca. L. americanus*’ is heat sensitive. *Plant Disease* 93:257-262.

- Lopes, S. A., and Frare, G. F. (2008). Graft transmission and cultivar reaction of citrus to ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’. Plant Dis. 92:21-24.
- Martínez-Bustamante, V., López-Bautista, V., Alanis-Martínez, I., Mora-Aguilera, G., Gutiérrez-Espinosa, A., Loeza-Kuk, E., Robles-García, P., y Esquivel-Chávez, F. 2015. Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el dosel de Naranja (*Citrus sinensis*), con Infección Asintomática. Revista Mexicana de Fitopatología, 33 (S): 201.
- 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. 2014a. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. Revista Mexicana de Fitopatología 32(2): 106-119.
- Mora-Aguilera G, Flores-Sánchez F, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Oropeza-Salín C, Flores-Olivas A, González-Gómez R y Robles-García P. 2014b. 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: 120-131.
- Morgan, J. K., Zhou, L., Li, W., Shatters, R. G., Keremane, and M., 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
- Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. Á., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., 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

- Tatineni, S., Sagaram, U. S., Gowda, S., Robertson, C. J., Dawson, W. O., 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.
- Teixeira, D. C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E. C., Wulff, N. A., Eveillard-Jagoueix, S., Yamamoto, P.T., Ayres, A. J., and Bove, J. M. (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.
- Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Manzo-Sánchez, G., Robles-González, M. M., Orozco-Santos, M., Carrillo-Medrano, S. H. (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, C. A., Guo, Y., Doud, M. S., and Duan, Y. (2012). A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and rescuing Huanglongbing-affected citrus plants. *Phytopathology* 102: 567-574.

Capítulo 3

Efecto de la interacción *Citrus aurantifolia* y tipo de patrón en la expresión histológica foliar en respuesta a la Infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

3.1. Resumen

En México, los síntomas inducidos por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) han sido más severos en limón mexicano injertado sobre *Citrus macrophylla*. El conocimiento del efecto del injerto/portainjerto en la incidencia y severidad de los síntomas inducidos por CLas es limitado, por lo que los objetivos de esta investigación fueron estimar la expresión de síntomas en limón mexicano injertado en *C. macrophylla*, *C. aurantium* y *C. volkameriana*, y su asociación con alteraciones histológicas del floema. En 2013, se injertó una vareta de limón mexicano positiva a CLas en cada una de siete plantas de *Ca*, *Cv* y *Cm* y un testigo por patrón, en un diseño de parcelas divididas. Las plantas se mantuvieron en invernadero del INIFAP CE-Tecomán. Seis meses después, 6 de las 9 plantas presentaron moteado difuso foliar. Los síntomas observados fueron punteados cloróticos, seguido de moteados difusos, aclaramiento de nervaduras y posteriormente clorosis; en la combinación Lm/cm se presentó después de los 18 mdi muerte de ramas y plantas (20 mdi). La severidad fue mayor en plantas de Lm sobre *Cm* (60-100%), mientras que en Lm sobre *Ca* y *Cv* (<60%) fueron de moderados a leves. Para el análisis histológico, se seleccionaron tres ramas por planta; en cada rama se marcaron las regiones distal y proximal, con respecto a la zona del punto de injerto. A partir de los 12 meses después de la inoculación (mdi) hasta los 20 mdi, se muestreó mensualmente una hoja por rama de cada región. De la porción central de cada hoja se cortaron discos de 6 mm y se analizaron histológicamente. El ancho del floema (hiperplasia) (AF) de Lm sobre *Cm*, *Ca* y *Cv* incrementó con respecto al tejido sano

($P=0.001$). La anchura promedio del floema fue menor en Lm/Ca ($74\pm 2\mu\text{m}$) con respecto a Lm/Cv $80\pm 2\mu\text{m}$ y Lm/Cm $84\pm 2\mu\text{m}$, aunque no hubo diferencias estadísticas. En Lm/Ca el promedio de hiperplasia fue similar en las regiones proximal y distal de las ramas ($76\pm 2\mu\text{m}$), en contraste con las otras combinaciones de Lm/Cv y Lm/Cm donde el incremento de la hiperplasia fue mayor en la sección proximal ($82\pm 2\mu\text{m}$), lo que sugiere un efecto histológico restrictivo de movilidad del inóculo.

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

3.2. Introducción

En las especies cítricas que se cultivan comercialmente, el portainjerto es un componente importante debido a que confiere características agronómicas favorables, así como resistencia o tolerancia a diferentes condiciones abióticas y bióticas (Castle, 2010). En este sentido, la naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*) y algunos de sus híbridos, comúnmente utilizados como portainjertos, no expresan los síntomas típicos inducidos por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). De acuerdo con Albrecht y Bowman (2011), plantas de *P. trifoliata* y del el híbrido US-897, cultivadas en invernadero y campo e infectadas con CLAs, presentaron los mayores rendimientos en comparación a *C. reticulata*, por lo que las reportaron como tolerantes a este patógeno. Posteriormente, estos mismos investigadores reportaron a Carrizo y US-942 como materiales tolerantes; US-802, US-812, Benecke y limón Volkameriano como moderadamente tolerantes; y a la mandarina Cleopatra como susceptible (Albrecht y Bowman, 2012).

En México, los síntomas inducidos por CLAs han sido más severos en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) injertado sobre limón Macrofila (*C. macrophylla*) con respecto al injertado en limón Volkameriano (*C. volkameriana*). (Esquivel *et al.*, 2012; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). También se ha señalado que el rendimiento de limón mexicano se reduce hasta 50% cuando la severidad es del 75 al 100% (Bermudez-Guzman *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013).

CLAs induce la acumulación almidón en las células parenquimatosas en hojas y tallos; esta acumulación es excesiva en cítricos agrios (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012),

probablemente como resultado de la degeneración y colapso del floema debido a la hiperplasia de las células parenquimatosas de este tejido (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Aritua *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2014 y Fu *et al.*, 2015). Esquivel-Chávez y colaboradores (2012), analizaron el efecto de CLas en cítricos dulces y agrios a partir de índices en relación asintomático:sintomático (sano/enfermo) con respecto al área y anchura del floema, y acumulación de almidón, sugirieron que limón mexicano (1:63.8 limón mexicano, 1:2.5 limón persa, y 1:1.9 naranja dulce) es más vulnerable a la infección de CLas.

Para comprender mejor los mecanismos de tolerancia o susceptibilidad de los cítricos a la infección de CLas, se han realizado análisis anatómicos comparativos de limón rugoso tolerantes y de naranja dulce susceptibles a CLas, reportando colapso del floema y acumulación de almidón en tejidos de pecíolos y hojas. Interesantemente, en hojas asintomáticas infectadas, los cambios anatómicos importantes; por ejemplo, colapso celular y la acumulación de almidón se encontraron en naranja dulce, pero no en limón rugoso confirmando su tolerancia (Fan *et al.*, 2013).

A partir del fuerte efecto a nivel histológico que induce CLas en el floema de cítricos agrios (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012), se hipotetizó que la hiperplasia reduce la movilidad bacteriana hacia los flujos de crecimiento en las plantas, afectando directamente la disponibilidad del inóculo potencial para la adquisición por su vector *Diaphorina citri*. Adicionalmente, debido a los antecedentes del efecto del patrón en la concentración bacteriana (Esquivel *et al.*, 2016 en prensa), este trabajo se planteó con el propósito de estudiar el efecto de la interacción *C. aurantifolia* con los patrones *C. macrophylla* (*Cm*), *C.*

aurantium (Ca) y *C. volkameriana* (Cv) en la expresión histopatológica foliar en respuesta a la infección de CLas.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Material vegetal

La investigación se realizó en 2013-2014 en condiciones de invernadero del Campo Experimental Tecomán del INIFAP, en el estado de Colima, con el fin de evitar la movilidad de inóculo fuera de este estado.

Como portainjertos se utilizaron plantas de *C. macrophylla* (Cm), *C. volkameriana* (Cv) y *C. aurantium* (Ca), las cuales se obtuvieron de un vivero comercial certificado. La fuente de inóculo se obtuvo de árboles de limón mexicano de 8 años de edad positivos a CLas desde abril de 2010 (LmCLas). La concentración de la bacteria se estimó mediante PCR cuantitativa.

3.3.2. Inoculación

De la fuente de inóculo se colectaron 9 varetas medianamente lignificadas de más de 20 cm de largo con síntomas visuales de HLB. De manera individual, cada vareta se injertó en tallos de 1.0 cm de diámetro de Cm, Cv y Ca. El injerto fue tipo púa y se hizo a una altura promedio de 34 cm sobre el nivel del sustrato. A los 15 días después de haber injertado las varetas de LmCLas, se injertó una yema sana de limón mexicano (LmS) a una altura de 24 cm sobre el nivel del sustrato (Figura 3.1). Se podó el ápice de todos los portainjertos a fin de inducir el crecimiento de las varetas y yemas de Lm.

3.3.3. Establecimiento de experimento

El experimento se estableció en abril de 2013 bajo un arreglo aleatorio considerando tres tratamientos con tres repeticiones cada uno. Los tratamientos 1, 2 y 3 consistieron, respectivamente, de plantas de *Cm*, *Cv* y *Ca* injertadas con varetas de LmCLAs. El tratamiento testigo consistió de una planta de cada portainjerto en donde se injertó una vareta sana de Lm libre de CLAs (Figura 3.1).

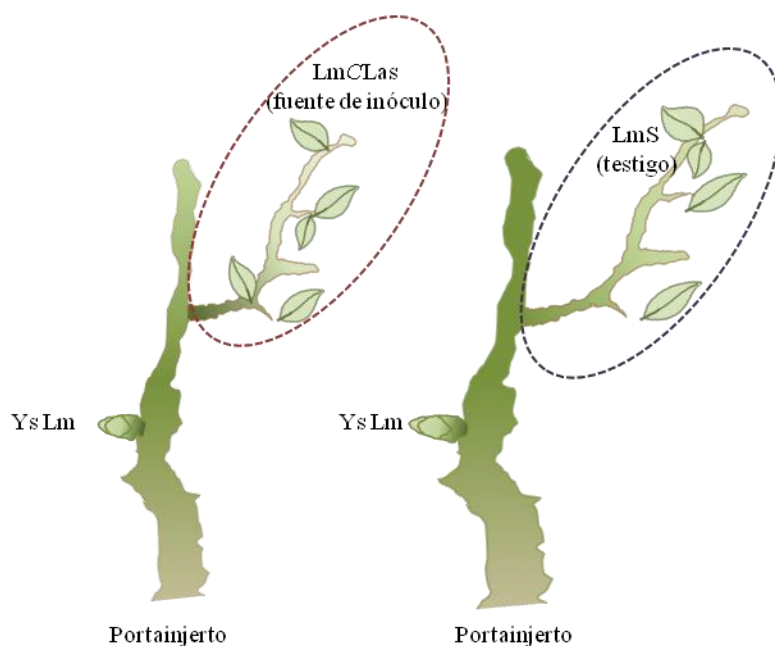


Figura 3.1. Esquema de plantas de limón mexicano y tipos de injertos realizados en tratamientos y plantas testigo. Injerto de yema YsLm= yema sana de limón mexicano; Injerto tipo púa vareta de limón mexicano positiva a CLAs= LmCLAs, vareta de limón mexicano sana= LmS.

3.3.4. Variables evaluadas

Se evaluaron la expresión de síntomas en el follaje y el índice de hiperplasia en floema. La expresión de síntomas se evaluó mensualmente en las plantas de Lm injertado en *Cm*, *Cv*

y *Ca* hasta los 12 meses después de la inoculación (mdi). Se hizo el registro fotográfico de la aparición de punteados cloróticos, moteados difusos, clorosis, y síntomas similares a los causados por deficiencias de minerales. También se determinó la concentración bacteriana mediante q-PCR.

Para evaluar el índice de hiperplasia (anchura del floema), se seleccionaron 3 ramas de *Lm* injertadas en todas las plantas de *Cm*, *Cv* y *Ca*, y se marcaron las regiones proximal y distal (último brote) al punto de injerto. Durante 20 meses, cada 30 días a partir de los 12 mdi, se recolectaron dos hojas de la región proximal y dos de la distal al punto de injerto en cada una de las combinaciones injerto/portainjerto. De los tratamientos testigo se recolectó solo una hoja. El número total de hojas recolectadas fue de 57 por fecha de muestreo.

De la base de la nervadura central de cada hoja se cortaron discos de 6 mm de diámetro tomando como referencia la nervadura central. Los discos foliares se fijaron en FAA por 48 h para ser procesados histológicamente según la metodología descrita por Esquivel-Chávez *et al.* (2012).

De los cortes obtenidos se eligieron 95 portaobjetos de *Lm/Ca*, *Lm/Cm* y *Lm/Cv* por fecha de colecta. De cada portaobjeto se seleccionaron el quinto, décimo, décimo quinto y vigésimo corte, analizando un total de 2375 cortes por combinación injerto/portainjerto. Para calcular la anchura del floema, se tomaron fotomicrografías de los cortes seleccionados. Las mediciones se hicieron sobre las imágenes digitales con el analizador de imágenes Image Tool® ver. 3.0.

Todas las muestras foliares se analizaron por qPCR a partir de 0.1g de nervadura central de la misma hoja seleccionada para los estudios histológicos, el producto de PCR se mandó

a secuenciar para corroborar la presencia de CLas. La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó por el método de CTAB según Freitas-Astúa y colaboradores (2003).

3.3.5. Análisis estadístico

Las mediciones obtenidas de la anchura del floema se analizaron independientemente mediante un diseño estadístico de parcelas subdivididas (ANDEVA) con el programa SAS ver. 9.4. La fecha de muestreo, combinación [Lm/Ca, Lm/Cm y Lm/Cv] y la sección de la rama [Rama 1 (Distal y proximal), rama 2 (Distal y proximal) y rama 3 (Distal y proximal)] se asociaron a la parcela grande, mediana y chica, respectivamente. La medición de anchura de floema se empleó para calcular el índice de hiperplasia ($I_h = \bar{X}$ del anchura del floema de hoja sintomática / \bar{X} del anchura del floema de hoja testigo) en μm^2 . Este índice se encontró previamente como un indicador de daño (Esquive-Chávez *et al.*, 2012).

3.4 Resultados

3.4.1. Síntomas

Los primeros síntomas se registraron tres meses después de la inoculación (mdi) en tres plantas, a los seis meses siete de las nueve plantas presentaron síntomas típicos inducidos por CLas (moteado difuso foliar). La combinación de Lm con los tres portainjertos presentó síntomas variados y diferenciados entre combinaciones. La combinación de Lm/Ca presentó a los seis mdi síntomas de punteado clorótico, moteado leve y en algunos casos moteados albinos leves; otros síntomas observados pero tardíos fueron aclaramiento de nervaduras y clorosis leve (Figura 3.2A, 3.2B, 3.2C, 3.2D y 3.2E). Las plantas de la combinación de Lm/Cv presentaron moteado asimétrico, aclaramiento de nervaduras, clorosis; a los 17 mdi abscisión de hojas y muerte de ramas después de los 18 mdi (Figura 3.2F, 3.2G, 3.2H, 3.2I y

3.2J). El Lm/*Cm* presentó, principalmente, punteados cloróticos, seguido de moteados difusos, aclaramiento de nervaduras y posteriormente amarillamiento total de hojas jóvenes y maduras. A los 17 mdi, los síntomas fueron más severos acompañados de defoliación y muerte de ramas, así como una disminución del crecimiento de brotes nuevos y reducción del tamaño de las hojas. A los 20 mdi dos de las tres plantas murieron (Figura 3.2K, 3.2L, 3.2M, 3.2N y 3.2O). En general, la severidad fue mayor en plantas de Lm sobre *Cm*, mientras que en Lm sobre *Ca* y *Cv* fueron de moderados a leves.

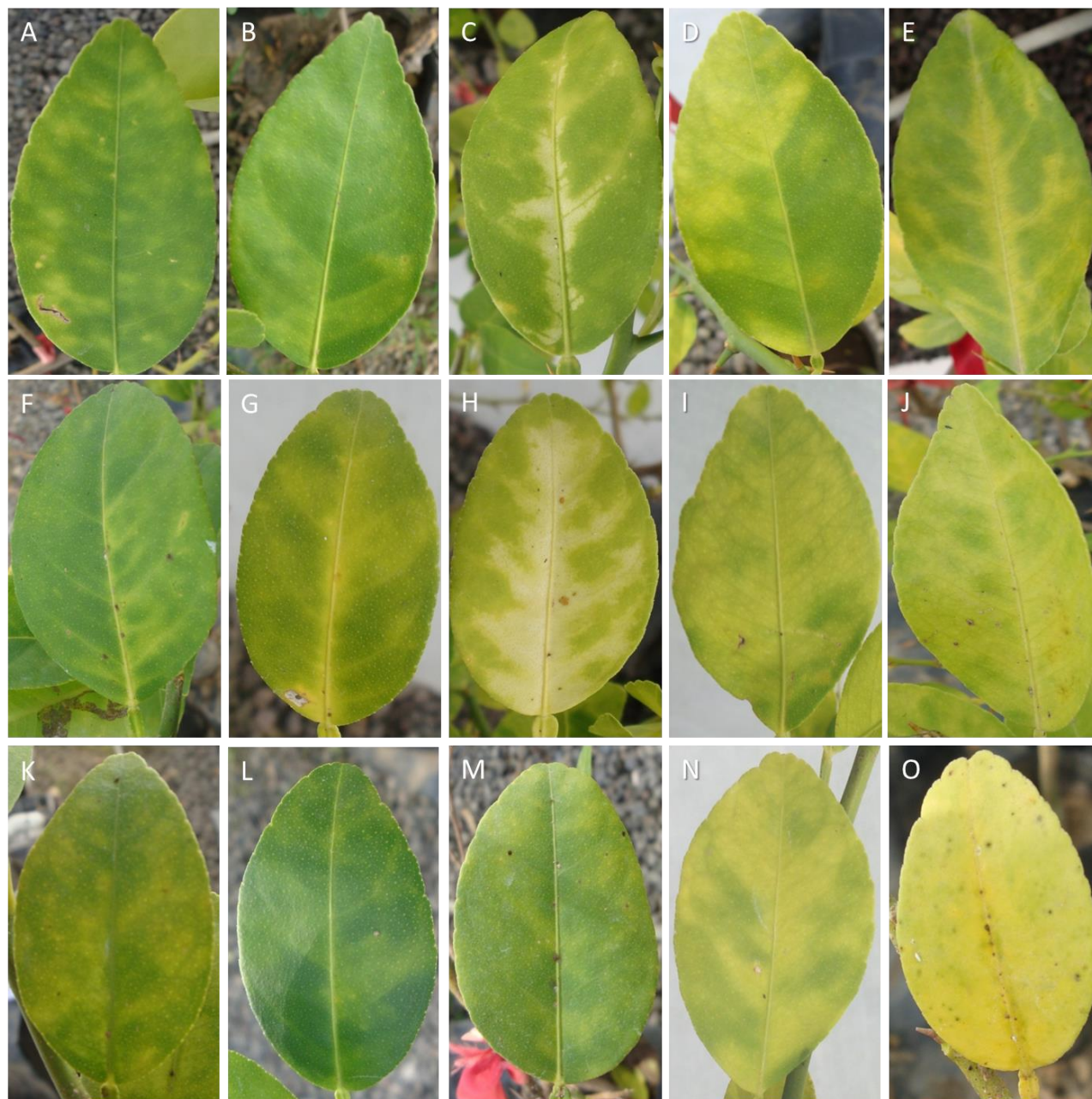


Figura 3.2. Síntomas en limón mexicano sobre tres patrones inducidos por CLAs.

Combinación de Lm/Ca: A) Punteado clorótico, B) Moteado leve, C) Moteado albino, D) Moteado difuso, E) Aclaramiento de nervaduras; Lm/Cv: F) Moteado leve, G) Aclaramiento de nervaduras, H) Moteado albino, I) Moteado difuso J) Clorosis; Lm/Cm: K) Punteado clorótico, L) Moteado leve,, M) Aclaramiento de nervaduras, N) Moteado difuso y O) Clorosis total.

3.4.2. Alteraciones histológicas

El ancho del floema (AF) se asoció con una división celular descontrolada o hiperplasia. AF de la base de la nervadura central de hojas sintomáticas y sanas aumentó con el tiempo en las tres combinaciones de portainjerto con limón mexicano (Figura 3.3), aunque el incremento fue mayor en tejido sintomático en todos los casos ($p \leq 0.05$).

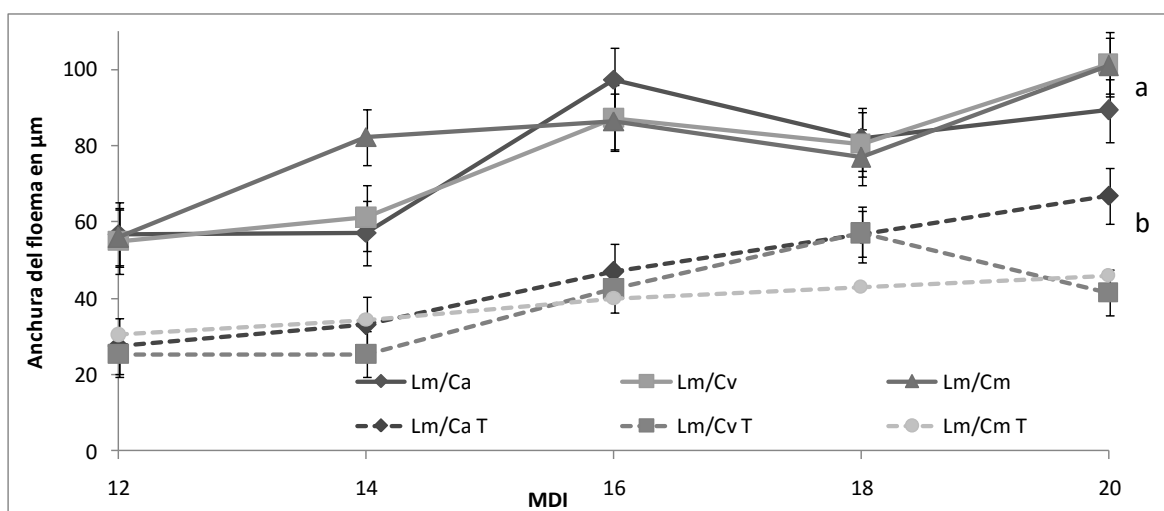


Figura 3.3. Fluctuación del ancho del floema en cortes transversales de hojas de limón mexicano/*C. aurantium*, hojas de limón mexicano/*C. macrophylla* y hojas de limón mexicano/*C. volkameriana* con hiperplasia y tejido sano.

Los materiales sintomáticos de limón mexicano sobre *C. aurantium*, *C. macrophylla* y *C. volkameriana* infectados con CLas presentaron un incremento progresivo en la hiperplasia del floema con respecto al tejido sano. A 20 meses después de la inoculación los efectos diferenciales a nivel celular entre cada portainjerto no fueron significativos ($P=0.001$). Sin embargo, Lm/Cm presentó mayor severidad (Clorosis y muerte de ramas), en contraste con las otras combinaciones (Figura 3.4 y 3.5).

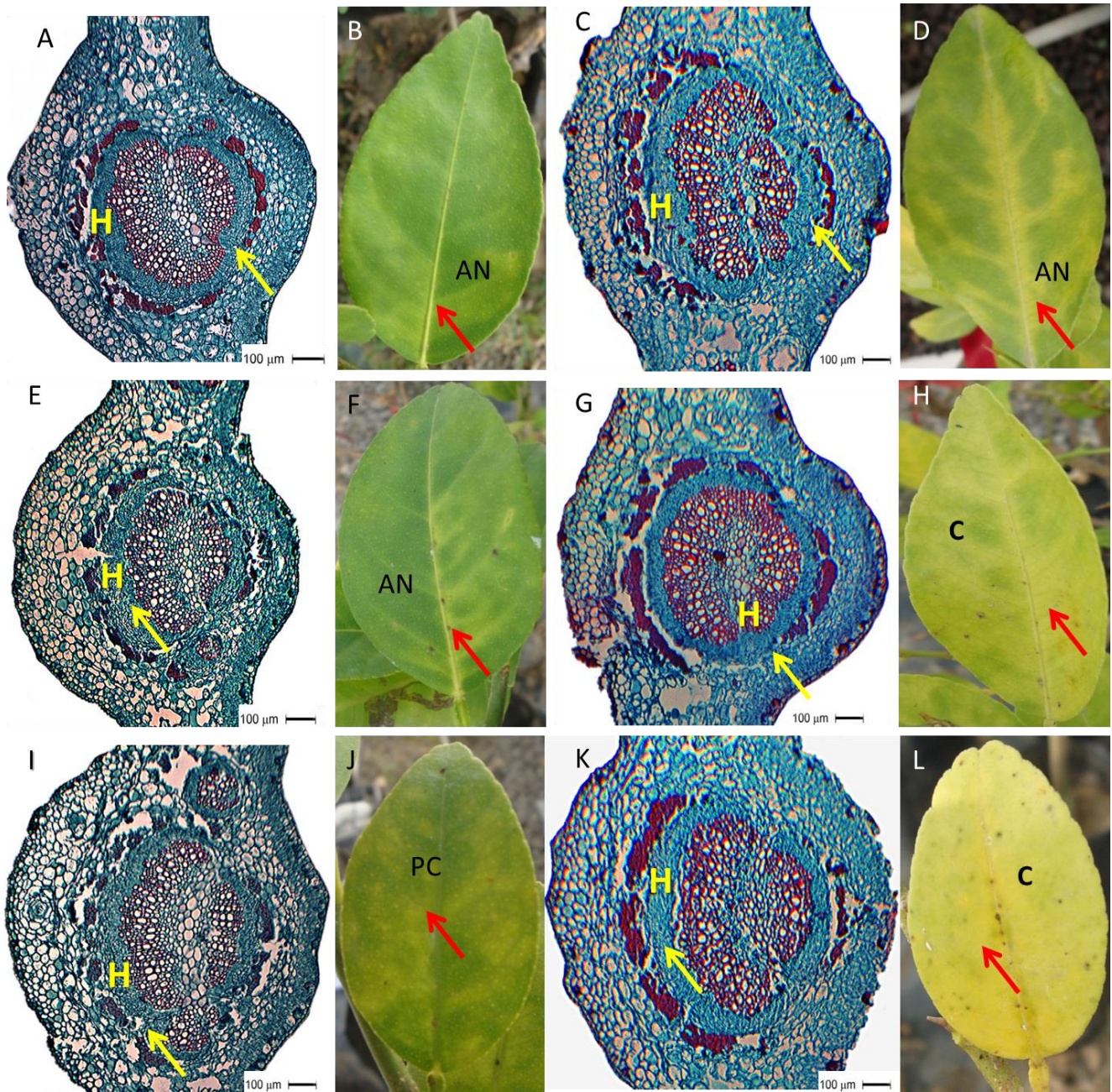


Figura 3.4. Síntomas foliares visuales y secciones transversales de la nervadura central correspondientes a los síntomas inducidos por CLas a los 12 mdi y a los 20 mdi en tejido de limon mexicano (Lm) injertado en *Citrus aurantium*(A-D), *Citrus volkameriana* (E-H) y *Citrus macrophylla* (I-L). Barras=100 µm. H=hiperplasia, AN=acramiento de nervaduras, PC=punteado clorotico y C=clorosis.

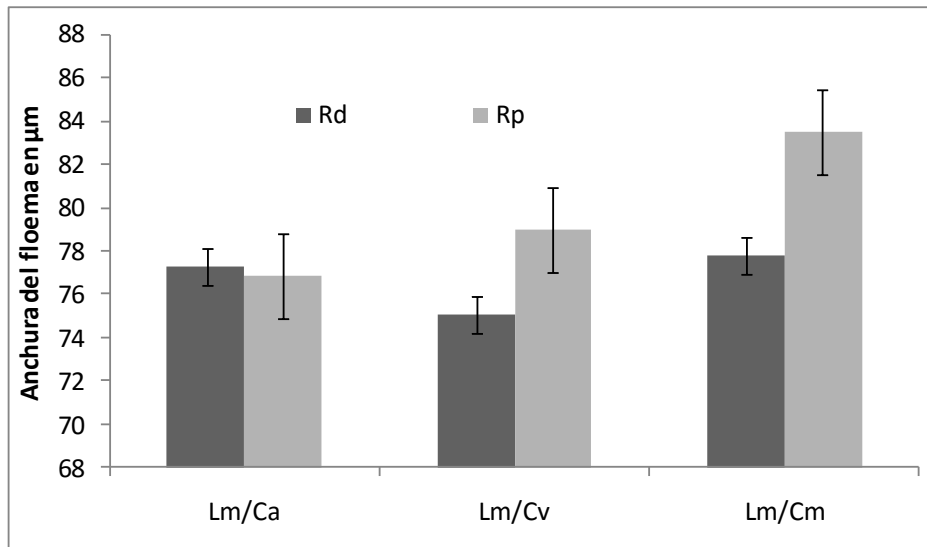


Figura 3.5. Representación gráfica de mediciones de anchura del floema en cortes transversales de hojas de limón mexicano/*C. aurantium*, hojas de limón mexicano/*C. macrophylla* y hojas de limón mexicano/*C. volkameriana* con hiperplasia y tejido sano.

El índice de hiperplasia se calculó a partir de promedios del AF por combinación de Lm en su relación al tejido foliar sano/enfermo (Cuadro 3.1), para este análisis se observaron diferencias significativas entre combinaciones de limón mexicano para cada fecha de evaluación. El Ih fue significativamente mayor en Lm/*C. macrophylla* en las últimas tres fechas de evaluación y estuvo relacionado con la severidad de síntomas en la especie (Cuadro 3.1). Contrastantemente el AF en las hojas de las regiones distal y proximal no fue diferente estadísticamente a partir del análisis del área absoluta bajo la curva ABC de la variable AF en limón mexicano sobre tres patrones durante 5 fechas (Cuadro 3.2). Estos resultados muestran un efecto diferencial en la patogénesis de CLAs.

Cuadro 3.1. Fluctuación del índice de hiperplasia en limón mexicano sobre tres patrones durante 5 fechas (relación sano/enfermo).

Patrón	abr-15 12 mdi	jun-15 14 mdi	ago-15 16 mdi	oct-15 18 mdi	dic-15 20 mdi
Lm/Ca	2.06 a	1.73 b	2.07 b	1.44 b	1.33c
Lm/Cv	2.17 a	2.40 a	2.06 b	1.41 b	2.19 b
Lm/Cm	1.84 b	2.39 a	2.15 a	1.79 a	2.43 a

Cuadro 3.2. Analisis del área absoluta bajo la curva ABCPE de la variable AF en limón mexicano sobre tres patrones durante 5 fechas.

Combinación	Sección	ABCP	Y0	Yf	T-Tes
Lm/Ca	D	298.0	34.3	130.0	4.5 a
	P	-108.4	31.2	134.8	
Lm/Cv	D	48.6	20.8	128.3	2 a
	P	-83.7	39.1	124.9	
Lm/Cm	D	-175.9	40.3	142.0	4 a
	P	-91.6	37.7	142.0	

La concentración bacteriana varió entre períodos de evaluación y entre combinaciones de limón mexicano/portainjerto. Sin embargo, esta asociación no fue comparable con el incremento en la anchura del floema (hiperplasia) (cuadro 3.3 y Figura 3.6), en las diferentes combinaciones, ya que no se observaron diferencias significativas entre combinaciones de limón mexicano, pero si entre plantas enfermas y sanas.

Cuadro 3.3. Analisis de regresión para cada combinación injerto/portainjerto y por sección de la rama.

Combinacion	Seccion de la rama	Variable daño de CLas	Modelo	R²
Lm/Ca	D	Anch F	$Y=11.30x + 47.42$	0.635
	P		$Y=11.30x + 47.42$	0.635
	D	[CLas]	$Y=59085x + 28103$	0.247
	P		$Y=50790x + 10874$	0.389
Lm/Cv	D	Anch F	$Y=13.35x + 40.51$	0.876
	P		$Y=13.35x + 40.51$	0.876
	D	[CLas]	$Y=42450x + 2109$	0.301
	P		$Y=32673x + 81368$	0.118
Lm/Cm	D	Anch F	$Y=10.94x + 51.74$	0.833
	P		$Y=11.68x + 50.56$	0.868
	D	[CLas]	$Y=50790x + 10874$	0.389
	P		$Y=50790x + 10874$	0.389

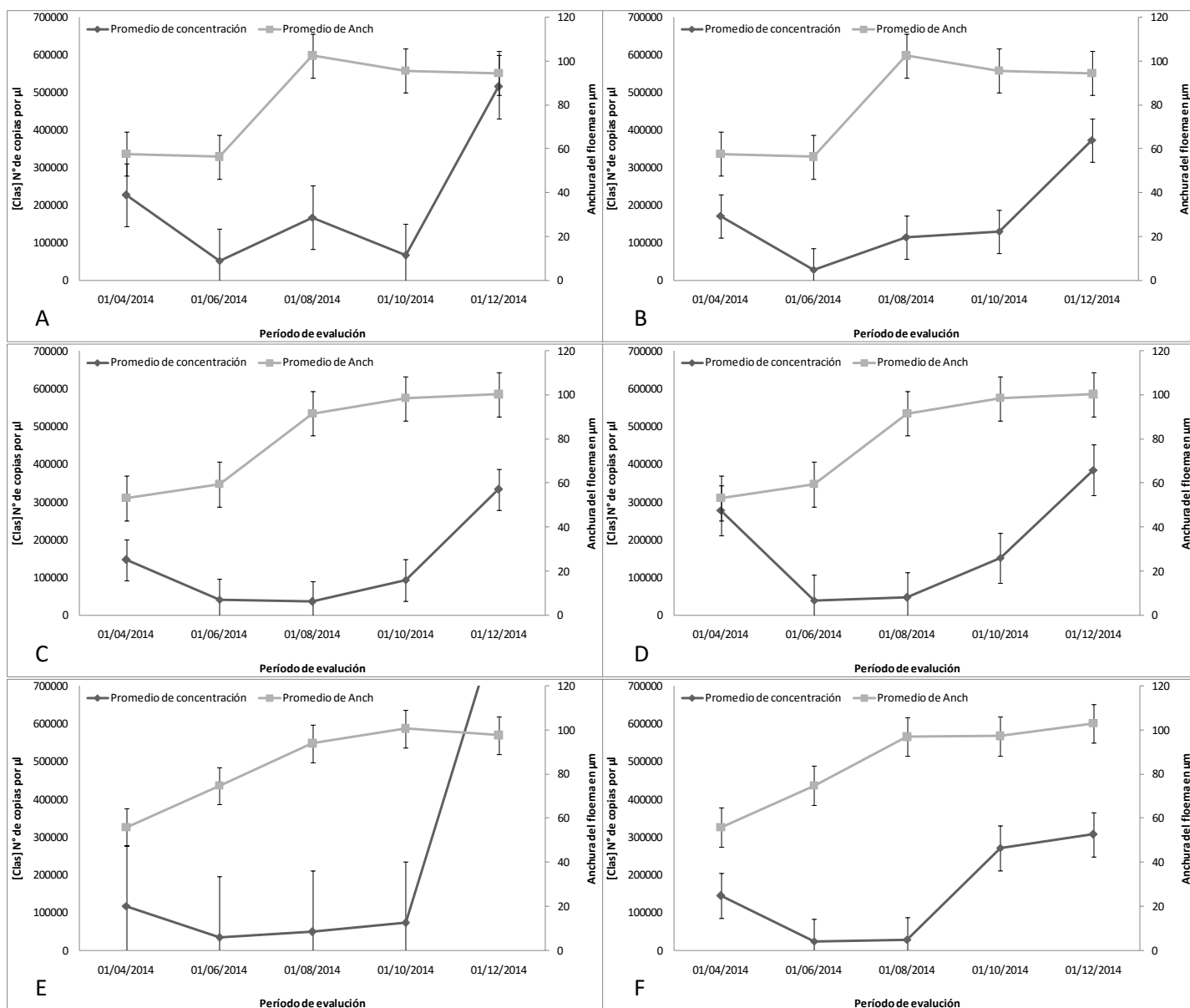


Figura 3.6. Promedio de la anchura del floema en comparación con la fluctuación de la concentración de CLas (datos de Esquivel *et al.*, 2016 *en prensa*) en limón mexicano en combinación con tres patrones. A-B) Limón mexicano/*C. aurantium*, sección distal (A) proximal (B); C-D) Limón mexicano/*C. Volkameriana*, distal (C) proximal (D); y E-F) Limón mexicano/*C. macrophylla*, distal (E) proximal (F).

3.5. Discusión

Las diferentes especies de cítricos y variedades exhiben síntomas variados a la infección por CLas (Folimonova *et al.*, 2009; Esquivel-Chavez *et al.*, 2012). Una vez infectadas, las plantas de limón mexicano muestran síntomas foliares, retraso en el crecimiento de los árboles; pero dependiendo de la combinación los síntomas difieren entre ellas. Previamente se había mostrado el efecto de CLas en la expresión de síntomas visuales e histológicos (Esquivel-Chavez *et al.*, 2012) en cítricos agrios con respecto a *Cm* y *Cv*. En este trabajo se evaluó además el naranjo agrio (*Ca*) como portainjerto y el efecto de posición relativa en la planta tanto de la concentración bacteriana como los cambios histológicos con el fin de determinar si la movilidad del inóculo es afectado por el nivel de daño en los tejidos.

El deterioro del floema de hojas, peciolo y tallos ocasionado por colapso y taponamiento del floema en de naranja Valencia se ha demostrado previamente (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010; Folimonova y Achor, 2010; Etxeberria y Narciso, 2012; Esquivel-Chavez *et al.*, 2012). En este trabajo el floema de las hojas sintomáticas de Lm sobre tres patrones se colapsó. Los análisis anatómicos presentados apoyan la destrucción del tejido del floema a medida que avanza la enfermedad (Figuras 3.4) es probable que se obstruya todo el transporte a través de los tubos cribosos.

La anchura del floema en las hojas de las regiones distal y proximal no fue estadísticamente diferente. Interesantemente se observó que en la combinación de Lm/*Ca* el promedio de AF es similar en las dos regiones de las ramas, en contraste con las otras combinaciones de Lm/*Cv* y Lm/*Cm* donde el incremento de AF fue mayor en la sección proximal (Figura 3.5). Esto último sugiere que existe mayor movilidad bacteriana en las secciones distales debido al menor índice de hiperplasia en esta región de las ramas y en

consecuencia mayor disponibilidad de inóculo en áreas de alimentación del vector de CLas en estas combinaciones de Lm/Cv y Lm/Cm, las cuales fueron diferentes a Lm/Ca. Esta implicación se apoya en un trabajo reciente en el que se detectó mayor concentración de CLas en las regiones distales de las ramas de Lm/Cm (Esquivel *et al.*, 2016 *en prensa*). Éstos resultados muestran un efecto diferencial del portainjerto en la patogénesis de CLas con respecto al testigo sano. La secuenciación molecular confirmó la invariabilidad de la fuente de inóculo.

3.6. Literatura Citada

- Achor, D., E. Etxeberria, N. Wang, S. Y. Folimonova., K. R. Chung, and G. Albrigo. (2010). Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal* 9: 56-64.
- Albrecht, U., and Bowman, K.D. (2012). Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae* 147:71–80.
- Albrecht, U., and Bowman, K. D. (2011). Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HortScience* 46(1):16–22.
- Aritua V, Achor D, Gmitter FG, Albrigo G, Wang N (2013) Transcriptional and microscopic analyses of citrus stem and root Responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. *PLoS ONE* 8(9): e73742. doi:10.1371/journal.pone.0073742.
- Castle, W.S. (2010). A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience* 45: 11–15.
- Esquivel-Chávez F., Valdovinos-Ponce G., Mora-Aguilera G., Gómez-Jaimes R., Velázquez-Monreal J. J., Manzanilla-Ramírez M. Á., Flores-Sánchez J. L., López-Arroyo J. I. (2012). Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782.
- Etxeberria, E., P. González, D. Achor, and G. Albrigo. (2009). Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiol. Mol. Plant Pathology* 74: 76-83.
- Etxeberria E. and Narciso C. (2012). Phloem anatomy of citrus trees: healthy vs. Greening-affected. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 125:67–70.

- Fan J., Chen C., Achor D. S., Brlansky R. H., Li Z., Gmitter Jr. F. G. (2013). Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 83: 69-74
- 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.
- Folimonova S.Y., C. J. Robertson, S. M. Gamsey, S. Gowda, and W.O. Dawson. (2009). Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354.
- Freitas-Astúa, J., Locali, E.C., Antoniollo, R., Rodríguez, V., Kitajima, E.W. and Machado, M. A. (2003). Detection of citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. *Virus Review Research* 8:196.
- Fu S. M., John Hartung, C. Y. Zhou, H. N. Su, J. Tan, and Z. A. Li. (2015). Ultrastructural changes and putative phage particles observed in sweet orange leaves infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Plant Disease*, 99 (3): 320-324. (doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-14-0106-RE>)
- Johnson E. G., Wu J., Bright D. B. and Graham J. H. (2014). Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on Huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology* 63: 290–298.

Stover E., K. Bowman, G. McCollum, R. Niedz, R. Shatters, Jr. and D. Hall. (2001).

Breeding citrus for HLB resistance at the USDA/ARS, U. S. Horticultural Research Laboratory, pp34-45.

Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Manzo-Sánchez, G., Robles-

González, M. M., Orozco-Santos, M., Carrillo-Medrano, S. H. 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.

Capítulo 4

Reacción de tres especies de cítricos a *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediante inoculación y su relación con portainjertos

4.1. Resumen

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLAs) afecta diferencialmente a todas las especies de cítricos. Para las condiciones de México ha provocado epidemias de alta intensidad en cítricos agrios y estas han sido más prevalentes en limón mexicano injertado sobre *Citrus macrophylla*. La interacción de la variedad/portainjerto interfiere directamente con la severidad de los síntomas inducidos por CLAs, pero su conocimiento es limitado, por lo que el objetivo de esta investigación fue comparar el efecto de la varetta procedente de la fuente de inóculo y la copa de cítricos agrios y dulces bajo el supuesto de un comportamiento diferencial de las combinaciones injerto-portainjerto en detrimento de los cítricos agrios. En 2012, tallos de 0.5cm de diámetro de limón mexicano infectado naturalmente y procedente de huertos comerciales de Colima se usaron como fuente de inóculo. La inoculación se realizó por injerto de aproximación en plantas de 1 año previamente establecidas en las combinaciones: Lm/*C. macrophylla* (Cm) 6 plantas, Lm/*C. volkameriana* (Cv) 6 plantas, Lp/Cm 6 plantas, Lp/Cv 6 plantas y Nd/Cv 6 plantas. Por planta se realizó la colecta de dos hojas, una de la sección proximal al punto de inoculación y de la sección distal, cada 30 días por 9 meses a partir de los 24 meses después de la inoculación (mdi). El análisis foliar se realizó de forma independiente. En cada fecha se registraron los síntomas visuales y se evaluó la severidad en el dosel mediante una escala de severidad de 5 clases (1=sano (0%), 2=síntomas leves (25%), 3=síntomas moderados (50%), 4=síntomas fuertes (75%) y 5=síntomas severos (100%)). Un total de 495 muestras se analizaron molecularmente

mediante q-PCR 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). Histológicamente se analizaron 4,375 cortes basales de la nervadura central foliar. La concentración de CLas y anchura de floema se analizaron bajo un diseño de parcelas divididas (SAS[®] ver 9.4). Los tres cítricos presentaron variaciones en la expresión visual de los síntomas. Lm/Cm presentó fuerte clorosis y otros síntomas como punteado clorótico, moteado asimétrico, clorosis, aclaramiento de nervaduras. Fue la única combinación donde ocurrió muerte de ramas en tres de cinco plantas. Lm/Cv mostró exclusivamente una moderada clorosis. Los síntomas en Lp/Cm fueron análogos a Lm/Cm sin presentar muerte de ramas. Las plantas de Lp/Cv desarrollaron síntomas de punteado clorótico, aclaramiento de nervaduras y moteados asimétricos. En Nd/Cv los síntomas fueron de leves a moderados, y se presentó principalmente acorchado en hojas. A nivel de severidad en dosel, Lm/Cm fue el más afectado con un promedio del 75% a los 32 mdi. En los tres cítricos evaluados se presentó una tendencia similar en cuanto al incremento y decremento de la concentración de CLas en el tiempo, observándose dos picos importantes de máxima concentración; el primero a los 25 y 26 mdi y el segundo entre los 29 y 30 mdi. Las combinaciones de Lm/Cm y Lm/Cv presentaron las más altas concentraciones siendo estadísticamente diferentes (P=0.001) con respecto a los otros cítricos. Nd/Cv tuvo consistentemente la concentración más baja en un promedio del 57% y 28% con respecto a Lm/Cm y Lp/Cm, respectivamente. Histológicamente, en Lm/Cm la anchura de floema presentó el mayor incremento ($93.5 \pm 2 \mu\text{m}$) respecto a la combinación de Nd/Cv ($82.5 \pm 2 \mu\text{m}$) a los 32 mdi, aunque no hubo diferencia estadística.

Palabras clave: Huanglongbing, agrios y dulces, *C. volkameriana* y *C. macrophylla*.

4.2. Introducción

Los síntomas de Huanglongbing (HLB) son variados y se pueden parecer a los de otros desórdenes de cítricos. Las hojas también pueden llegar a ser más gruesas, con venas dilatadas y apariencia corchosa. Los síntomas varían de acuerdo al tiempo de infección, la etapa de la enfermedad, etc. (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Flores-Sánchez *et al.*, 2015) y pueden ser confundidos o enmascarados con los síntomas de otras enfermedades como deficiencias de minerales como zinc, hierro, manganeso, calcio, etc. (Bové, 2006), sin embargo, algunas de sus características son específicas. Los árboles afectados usualmente desarrollan uno o más brotes amarillos, de ahí el nombre de la enfermedad. En las hojas se desarrolla un patrón de áreas amarillas y verdes sin límites definidos, dando apariencia de un moteado ("manchas") asimétrico, siendo el síntoma más característico en hojas de árboles enfermos (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLAs) induce alteraciones a nivel histológico, entre las que destacan la acumulación masiva de almidón en hojas y tallos, hiperplasia y consecuente degeneración de las células acompañantes del floema, taponamiento de los tubos cribosos del floema con calosa y proteínas (Kim *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010; Folimonova y Achor, 2010; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). El taponamiento de los tubos cribosos fue analizado en limón mexicano, persa y naranja dulce y no se encontraron diferencias significativas ($P= 0.005$) en la concentración de proteínas entre cítricos pero si entre tejido sintomático y asintomático (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Koh y colaboradores (2012), reportaron que el taponamiento con calosa inhibe el transporte de los fotoasimilados, lo cual contribuye al desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

Por otra parte, se ha detectado la distribución de CLas en relación con su concentración en diferentes estudios. Flores-Sánchez y colaboradores (2015), describieron la relación de la concentración bacteriana con la severidad del HLB y sus resultados indican que la expresión de síntomas de la enfermedad está directamente relacionada con el nivel de concentración del patógeno. Esta detección pudiera asociarse con las alteraciones inducidas a nivel celular diferenciando los síntomas macroscópicos. La concentración bacteriana en las plantas de cítricos presenta una distribución irregular dentro de una rama y entre ramas de todo el dosel del árbol. Teixeira y colaboradores (2008), evaluaron la concentración de *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) en hoja de naranja dulce, mediante las técnicas de PCR convencional y en tiempo real (RT-PCR). Aunque RT-PCR fue capaz de detectar hasta 10 copias de CLam por gramo de tejido (1/g), esta bacteria no pudo ser detectada en algunas hojas de una rama positiva, la cual presentaba muchas asintomáticas, mientras que en las hojas con moteado de ramas sintomáticas de un mismo árbol, el título de CLam alcanzó valores tan altos como 10^7 x 1/g. Estos resultados demuestran la distribución heterogénea del HLB, pero aparentemente no se observa brote joven asintomático como en cítricos agrios. Esto se puede explicar por el mayor taponamiento del floema en los cítricos agrios (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Es muy probable que la heterogeneidad observada en naranja dulce se encuentre en los cítricos agrios. Sin embargo, las tasas de brotación más intensas, la severidad de los síntomas y la defoliación sugieren que la movilidad bacteriana podría ser más severa en los cítricos ácidos. Sin embargo, los estudios histológicos indican un fuerte bloqueo del floema a partir del incremento en el índice de hiperplasia (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Esto sugiere que podría limitar la translocación de la bacteria a puntos de crecimiento vegetativos

por cierto tiempo en función de la severidad del síntoma. Visiblemente esto se observa en brotes nuevos con síntomas en el crecimiento vegetativo de la estación previa pero ausentes en el crecimiento nuevo.

Por otra parte, el HLB afecta a todas las especies de cítricos pero en cada una de ellas presenta diferencias en la expresión sintomática. Distintos estudios han clasificado a las variedades de cítricos como: susceptibles, moderados y tolerantes. Un ejemplo de esto son los reportes en los cuales se describe al limón persa como tolerante a HLB presentando síntomas leves con relación a títulos altos de la bacteria en las plantas (Folimonova *et al.*, 2009). También existen reportes de variedades altamente tolerantes al HLB por ejemplo *Poncirus trifoliata*, el cual ha sido utilizado como portainjerto (Albrecht y Bowman, 2011; Folimonova *et al.*, 2009; Stover *et al.*, 2001). Los extractos de los frutos y semillas de *P. trifoliata* han sido ampliamente utilizados como compuestos antibacterianos (Rahman *et al.*, 2009). Albrecht y Bowman (2011), mencionan que estos compuestos pueden estar involucrados en la reducción del desarrollo o movimiento de CLAs, causando la resistencia o tolerancia al HLB. En general, estos trabajos se han evaluado a nivel de invernadero con inoculaciones por injerto en pie franco. Sin embargo, existen pocos estudios de susceptibilidad en la combinación injerto-portainjerto. En un trabajo sobre portainjertos y limón mexicano se encontraron diferencias en la expresión sintomática del HLB en este cítrico; el cual sobre *Citrus macrophylla*, el portainjerto más utilizado en la región productora de Tecmán, Colima, presentó mayor expresión sintomática en comparación con *C. volkameriana*, con el que expresó síntomas de moderados a leves (Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha detectado un huerto en Jalisco, Mex., de producción de naranja dulce sobre *C. volkameriana* el cual presenta niveles de severidad altos en la

expresión sintomática del HLB, estos síntomas no son predominantes para este cítrico de las condiciones de México (Robles-García, 2013 comunicación personal con la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV)). Interesantemente en la península de Yucatán donde la dispersión y severidad del HLB no alcanza los niveles del estado de Colima, el patrón predominante con naranja dulce es naranja agrio. Esto sugiere que se deben hacer estudios formales de portainjertos en relación a limón mexicano y persa como injertos, a pesar de que la concentración CLas es análoga en los tres portainjertos referidos.

Un trabajo previo con respecto a la histología de limón mexicano y persa mediante la evaluación de cinco variables mostró que estos cítricos son más susceptibles a la infección por CLas y que las alteraciones a nivel celular se incrementan con el tiempo de infección, y a su vez están relacionados con el tipo de manejo agronómico y la edad de los árboles (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Sin embargo, en dicho estudio no se registró el tiempo de infección, la concentración bacteriana, ni la edad de los árboles, los cuales son factores estrechamente relacionados con el tipo de síntomas y alteraciones que pudiera estar induciendo la bacteria en diferentes hospedantes.

En contraste con estos trabajos, se sabe poco sobre los cambios de expresión sintomática asociados con la expresión fisiológica en el sistema de transporte afectados por la concentración de CLas en los tejidos foliares. En el presente trabajo, la cantidad de inóculo, los cambios a nivel sintomático, y la concentración de CLas se compararon en tejido sano, asintomático y sintomático en diferentes genotipos de cítricos comercialmente importantes para determinar si los cambios fisiológicos podrían estar asociados con la infección por HLB, y la severidad de los síntomas. Por lo anterior se propuso el presente proyecto con la hipótesis y objetivo siguientes:

Hipótesis: *Candidatus Liberibacter asiaticus* presenta un efecto diferencial en la severidad de los síntomas que induce dependiente de la especie citrícola, esto está condicionado por la combinación injerto-portainjerto impidiendo altas concentraciones de la bacteria en las plantas.

Objetivo: Evaluar el efecto de la combinación injerto-portainjerto en la expresión de síntomas de CLas y su concentración en limón mexicano, persa y naranja dulce.

4.3. Materiales y métodos

Este trabajo se llevó a cabo en invernadero y laboratorio. Los ensayos se establecieron en el 2012 en un invernadero del Campo Experimental (C.E.) Tecomán del INIFAP, en el estado de Colima, donde primero se obtuvieron plantas de limón mexicano (Lm), limón persa (Lp) y naranja dulce (Nd); las cuales después se inocularon con CLas mediante injerto de varetas de limón mexicano infectadas con HLB (CLas⁺) y se mantuvieron en el invernadero por 24 meses para ser analizadas molecular e histológicamente en el laboratorio de Fitosanidad del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo.

4.3.1. Portainjertos

Para generar las plantas de Lm, Lp y Nd se utilizaron como portainjerto plantas certificadas de limón Macrofila *C. macrophylla* (Cm) y limón Volkameriana *C. volkameriana* (Cv) de 6 meses de edad con 1.5 cm de grosor, las cuales se injertaron individualmente con una yema sana de alguna de las tres especies indicadas, según el caso, a una altura de 34 cm sobre el nivel del suelo y se así obtuvieron plantas de diferentes combinaciones injerto/ portainjerto: Lm/Cm, Lm/Cv, Lp/Cm, Lp/Cv y Nd/Cv.

4.3.2. Inoculación

Las plantas de Lm, Lp y Nd producidas se inocularon con Lm^{+CLas} . El inóculo provino de árboles de Lm de ocho años con HLB mantenidos en condiciones de invernadero desde el 2010. Para ello se colectaron brotes medianamente lignificados de más de 20 cm de longitud con síntomas severos inducidos por CLas para la obtención de varetas que se injertaron en plantas de Lm, Lp y Nd. Las varetas previamente se cortaron en bisel y se insertaron en el tallo de los portainjertos a una altura promedio de 24 cm sobre el nivel del suelo (Figura 4.1). La confirmación y concentración de CLas en los árboles utilizados como fuente de inóculo se estimó por PCR en tiempo real (q-PCR). Las plantas utilizadas como testigo también fueron injertadas con varetas de limón mexicano pero negativas a CLas ($CLas^-$), éstas se obtuvieron del Banco de Germoplasma del C. E. Tecomán.

El experimento constó de los siguientes cinco tratamientos: Lm^{+CLas}/Cm , Lm^{+CLas}/Cv , Lp^{+CLas}/Cm , Lp^{+CLas}/Cv y Nd^{+CLas}/Cv ; además también se incluyeron cinco testigos: Lm^{-CLas}/Cm , Lm^{-CLas}/Cv , Lp^{-CLas}/Cm , Lp^{-CLas}/Cv y Nd^{-CLas}/Cv . Los tratamientos tuvieron cinco repeticiones y los testigos solo una, dando un total de 30 plantas. Se consideró una planta como unidad experimental.



Figura 4.1. Procedimiento de inoculación de CLAs por injerto en plantas de limón mexicano, limón persa y naranja dulce. A) Insertado de varetas de limón mexicano CLAs⁺; B y C) Sellado de varetas; D) Destape 15 días después de la inoculación; E y F) Inóculo y copa, respectivamente.

4.3.3. Evaluación de la expresión de síntomas

A partir de los 24 meses después de la inoculación (mdi) hasta los 32 mdi se hicieron evaluaciones mensuales de la severidad de síntomas foliares en las plantas, lo cual se hizo en base al porcentaje de copa de las plantas mostrando a éstos, empleando una escala de cinco clases: 1) sano (=0%), 2) síntomas leves (25%), 3) síntomas moderados (50%), 4) síntomas fuertes (75%) y 5) síntomas severos (100%). Se registró la presencia 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.

4.3.4. Desarrollo de la enfermedad, concentración y distribución de CLas

Para evaluar el progreso de la infección, la concentración y distribución de la bacteria, se monitoreó en cada planta la copa y el brote que se desarrolló a partir de la vareta Lm^{+CLas} utilizada como inóculo. De esta forma se tomaron dos muestras foliares por planta de cada tratamiento y solo una muestra de la copa de las plantas testigo por tratamiento. Se colectaron 55 muestras por muestreo mensual (Cuadro 4.1). Para ello se tomó una hoja por sección en cada planta (copa o inóculo); en el muestreo inicial se eligió la primer hoja basal del brote seleccionado y en éste en la siguiente fecha de muestreo fue otra hoja ubicada en forma ascendente y así sucesivamente para cada muestro. Esto con la finalidad de identificar la concentración y distribución de CLas en cada fecha.

Cuadro 4.1. Unidades de muestras obtenidas de los tratamientos evaluados y sus testigos en el periodo abril –diciembre, 2014.

Tratamientos	14-abril	20-may	27-jun	10-jul	10-agos	10-sep	10-oct	10-nov	10-dic
Lm^{+CLas}/Cm	10 ¹	10	10	10	10	10	10	10	10
Lm^{-CLas}/Cm	1 ²	1	1	1	1	1	1	1	1
Lm^{+CLas}/Cv	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Lm^{-CLas}/Cv	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lp^{+CLas}/Cm	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Lp^{-CLas}/Cm	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lp^{+CLas}/Cv	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Lp^{-CLas}/Cv	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Nd^{+CLas}/Cv	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Nd^{-CLas}/Cv	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Muestras	55	55	55	55	55	55	55	55	55
Totales/Colecta									

¹En cada tratamiento se tomó la mitad de muestras (5) de la copa y la otra mitad (5) del brote que se originó del inóculo Lm^{+CLas} en cada planta.

²En las plantas testigo se tomó solo una muestra de la copa en cada planta.

Todas las muestras se analizaron por qPCR a partir de 0.1 g de nervadura central de la hoja. La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó por el método de CTAB de acuerdo al procedimiento de Freitas-Astúa y colaboradores (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 μ l, de los cuales 10 μ l fueron de Universal Probes Supermix (SsoAdvanced™ BIO-RAD), 120 nM de cada iniciador, 180 nM de sonda y 1 μ l de DNA 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 por 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). Se prepararon diluciones seriales del ADN de la bacteria a partir de 1'109,500 ng/ μ l de 16sr DNA de CLas, dividido en alícuotas de 1:10, de las cuales se hicieron 5 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 hicieron dos repeticiones de cada muestra. El producto de PCR de la primera y décima fechas de muestreo se mandó secuenciar para corroborar que se trabajó con CLas.

4.3.5. Análisis Histológico

En el análisis histológico que tuvo como finalidad de evaluar el progreso de la infección y el índice de hiperplasia (Anchura del floema), únicamente se consideraron tres plantas o repeticiones por cada uno de los cinco tratamientos y la planta testigo respectiva de cada caso, siendo un total de 20 plantas las que se utilizaron en este estudio. Para la toma de datos de cada una de las plantas de los distintos tratamientos se seleccionaron dos muestras foliares (una de la copa y otra del brote que se originó del inóculo Lm^{+CLas}) y solo una muestra de la copa de las plantas testigo por tratamiento. Dando así un total de 35 muestras procesadas por fecha de muestreo (Cuadro 4.2).

Para el análisis histológico se procesaron muestras de cada una de las siguientes fechas de muestreo: 1(14-abril-14); 3 (20-jun-14); 5 (10-ago-14); 7 (10-sep-14) y 9 (10-nov-14) (Cuadro 4.2). De cada muestra se disectó una sección de la base de la nervadura central de una hoja. Y de la parte media de cada hoja se cortaron discos de 6 mm tomando como referencia la nervadura central. El material vegetal se fijó en FAA por 48 h, se deshidrató gradualmente en etanol y se incluyó en paraplast (SIGMA®). Las muestras se cortaron transversalmente a 10 μ m de grosor con un micrótopo rotatorio (A. O. Company mod. Spencer 820), de las cuales se obtuvieron cinco laminillas por muestra y en cada laminilla se montaron 20 cortes, dando un total de 17500 cortes histológicos.

Las secciones obtenidas se tiñeron con safranina-verde rápido preparada en metilcelosolve según el protocolo descrito por López *et al.* (2005) (Anexo 1). Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico marca VELAB, y en un fotomicroscopio III Carl Zeiss con cámara digital para microscopía Paxcam 3.

Para las mediciones (μm) de áreas con hiperplasia se tomaron 5 imágenes por laminilla a 10 X aumentos, teniendo como referencia el primero, quinto, décimo, quinceavo y veinteavo corte de la laminilla. Las mediciones en las imágenes digitales se hicieron con el analizador de imágenes ImageTool ver. 3.0. En el Cuadro 4.2 se presenta el número de muestras, laminillas, imágenes y mediciones, correspondientes a las fechas de muestreo 1, 3, 5, 7 y 9. Así mismo se observa un total de 175 muestras procesadas y 875 laminillas analizadas.

Cuadro 4.2. Muestras procesadas para su análisis histológico.

Fecha de Muestreo	Núm. de Muestras	Núm. de Laminillas (5/muestra)	Núm. de Imágenes (5/laminilla)	Núm. de Mediciones (μm) (4^1/imagen)
1	35	175	875	3500
3	35	175	875	3500
5	35	175	875	3500
7	35	175	875	3500
9	35	175	875	3500
Total	175	875	4375	17500

¹Se obtuvo un promedio por imagen para evitar cualquier error.

4.3.6. 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 de Tukey, con significancia de $p \leq 0.05$.

4.4. Resultados

4.4.1. Síntomas

A partir de la inoculación de CLas (abril de 2012) en plantas de las combinaciones injerto/portainjerto: Lm/*Cm*, Lm/*Cv*, Lp/*Cm*, Lp/*Cv* y Nd/*Cv* 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, así como también se determinó la concentración del patógeno en dos partes de cada planta como son la copa (variedad) y el brote que se originó del inóculo. El análisis se inició 24 mdi y concluyó a los 32 mdi.

El número de plantas con síntomas y la intensidad de éstos se incrementaron con el tiempo. A los 6 mdi, la mayoría de las plantas inoculadas con el patógeno expresaron los síntomas típicos inducidos por éste, excepto las de naranja dulce (Figura 4.2). Los tres cítricos presentaron variaciones en la expresión visual de los síntomas, entre los cuales se observaron aclaramiento de nervaduras, moteado leve, moteado blancuzco, moteado asimétrico y clorosis (Figura 4.3; Cuadro 4.3). El limón mexicano en combinación con *Cm* presentó síntomas de punteado clorótico, moteado asimétrico, clorosis, aclaramiento de nervaduras y muerte de ramas, los síntomas no se presentaron de forma individual, sino que en una misma planta se presentaron dos o tres síntomas (Cuadro 4.3). En la combinación Lm/*Cv* sólo se observó clorosis. Las plantas de limón persa en combinación con *Cm* fueron casi tan susceptibles como el limón mexicano sobre ese mismo portainjerto (Lm/*Cm*) con síntomas similares 24 mdi sin presentar muerte de ramas. Las plantas de Lp/*Cv* mostraron una respuesta muy variable; desarrollaron síntomas de punteado clorótico, aclaramiento de nervaduras y moteados asimétricos entre los 3 y 6 mdi, mientras que otras presentaron síntomas tardíos de clorosis y moteado blancuzco a los 15 mdi. Los síntomas observados en

naranja dulce sobre Cv fueron de leves a moderados, siendo la única combinación en la que se presentó acorchado en hojas y en algunas plantas sobre todo en la parte del injerto se observó moteado difuso (Cuadro 4.3). La severidad de síntomas fue mayor en plantas de Lm injertadas sobre *C. macrophylla*, así mismo se registró la más alta concentración de CLas en esta combinación (Figura 4.4). El Lm, Lp y Nd en las diferentes combinaciones mostraron síntomas leves a moderados en 32 meses evaluados.

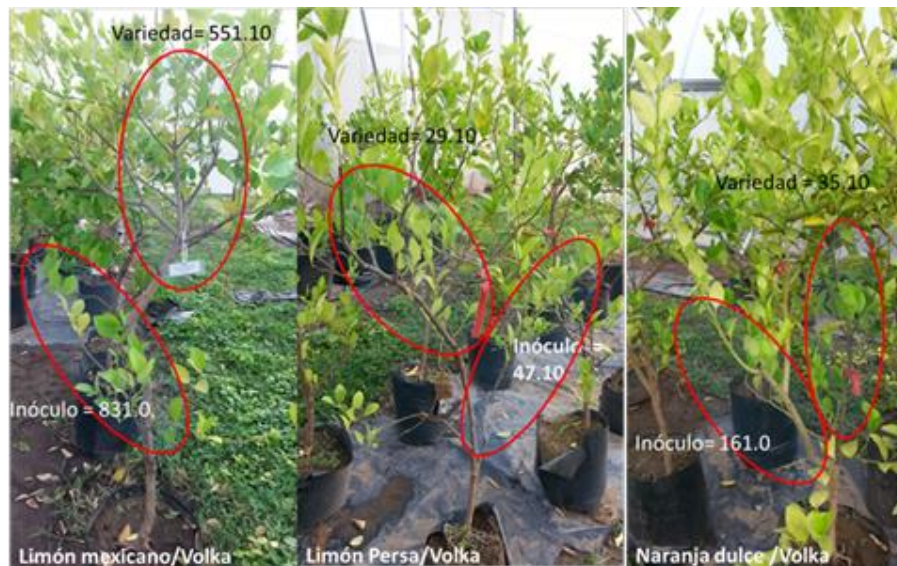


Figura 4.2. Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de cítricos sobre dos patrones, a los 24 meses después de la inoculación. Análisis de PCR cuantitativo en tiempo real.

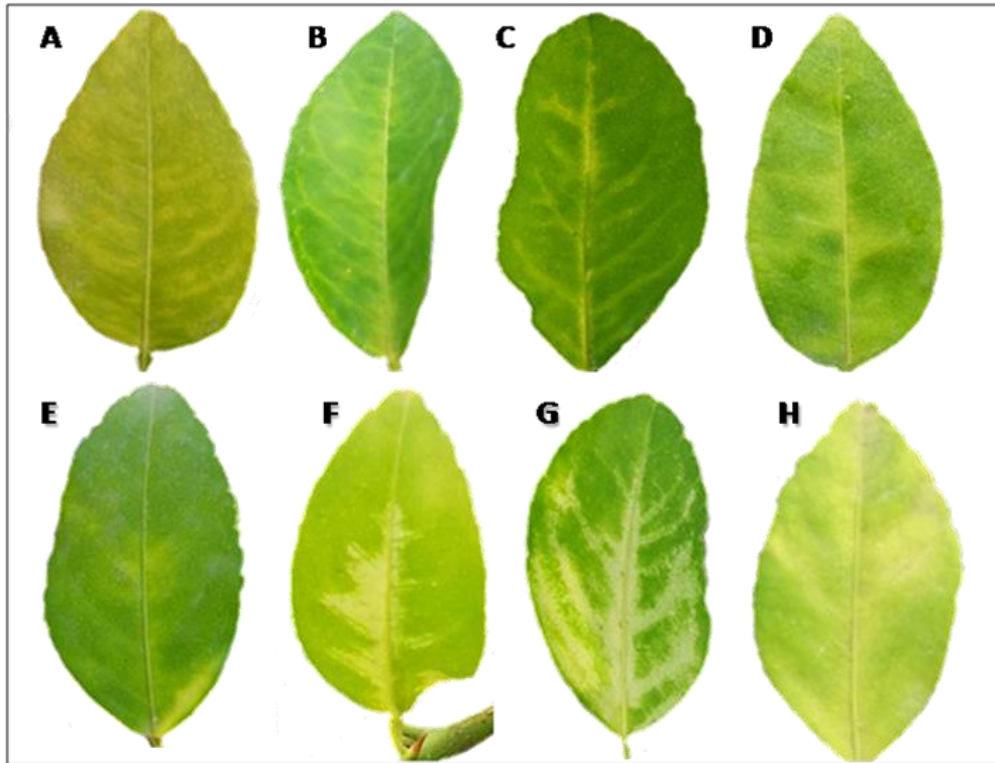


Figura 4.3. Síntomas inducidos por CLas 12 meses después de la inoculación en limón mexicano (A, D, F y H), limón persa (E y G) y naranja dulce (B y C). A) Punteado clorótico; B y C) Aclaramiento de nervaduras; D) Moteado asimétrico; E) Moteado leve; F y G) Moteado blancuzco; y H) Clorosis.

Cuadro 4.3. Expresión de síntomas en cítricos y su relación en la combinación injerto/portainjerto inducidos por CLAs.

Combinación injerto/portainjerto	# Núm. de planta	Síntomas							
		Punteado clorótico	Moteado leve	Moteado asimétrico	Moteado blanquizco	Aclarado de nervaduras	Clorosis	Acorchado	Muerte de ramas
Limón mexicano / <i>C. macrophylla</i>	1	+	-	+	-	+	+	-	+
	2	-	-	+	-	+	-	-	-
	3	+	-	+	-	+	+	-	-
	4	+	-	+	-	+	+	-	-
	5	+	-	+	-	+	+	-	-
Limón mexicano / <i>C. volkameriana</i>	6	+	+	-	-	-	+	-	-
	7	+	+	-	-	-	+	-	-
	8	+	+	-	-	-	+	-	-
	9	+	+	-	-	-	+	-	-
	10	+	+	-	-	-	+	-	-
Limón persa/ <i>C. macrophylla</i>	11	+	-	+	-	+	+	-	-
	12	-	-	+	-	-	+	-	-
	13	+	-	-	-	+	+	-	-
	14	-	-	+	-	-	+	-	-
	15	+	-	+	-	-	+	-	-
Limón persa / <i>C. volkameriana</i>	16	-	-	-	+	+	+	-	-
	17	+	-	-	-	+	+	-	-
	18	-	-	+	-	+	-	-	-
	19	+	-	-	-	-	+	-	-
	20	-	-	+	+	-	-	-	-
Naranja dulce / <i>C. volkameriana</i>	21	-	-	+	-	-	-	+	-
	22	-	-	+	-	-	-	+	-
	23	-	-	+	-	-	-	+	-
	24	-	-	+	-	-	-	+	-
	25	-	-	+	-	-	-	+	-

4.4.2. Concentración y distribución de CLas

Los resultados mostraron que las plantas de cítricos aparentemente presentaron diferencias en la concentración bacteriana en cada una de las combinaciones injerto/portainjerto con respecto a las diferentes fechas de evaluación. La distribución del patógeno fue heterogénea en relación a títulos muy bajos, las mayores concentraciones se registraron en la parte proximal al punto de inoculación. Las dos combinaciones de limón mexicano con los dos portainjertos *Cm* y *Cv* tuvieron la mayor concentración a los 24 mdi, pero también registró las concentraciones más bajas a los 28 y 29 mdi (Cuadro 4.4.1 y 4.4.2). Estas concentraciones se mantuvieron a través del tiempo, aunque, mostraron algunas variaciones en al menos un período de evaluación y un efecto diferencial según el cítrico afectado. El Lp^{+CLas} y la Nd^{+CLas} tuvieron concentraciones similares en las diferentes fechas de evaluación, contrastando con las concentraciones altas detectadas en *Lm* en sus diferentes combinaciones, siendo significativamente diferente ($F < 0.0001$) con respecto a los otros dos cítricos y sus combinaciones.

Cuadro 4.4.1. Análisis de cuantificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, número de copias del gen 16S rDNA, en cítricos sobre dos portainjertos (copa del árbol).

MDI	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Combinación	Concentración de CLas (# de copias/ μ l)								
<i>Lp/Cv</i>^a	51.7	26.8	67.3	145.9	32.6	32.6	78.8	71.7	19.3
<i>Lp/Cm</i>	53.1	17.9	17.9	75.7	25.0	25.0	100.0	43.8	19.4
<i>Lm/Cm</i>	46.7	69.5	411.1	165.7	6.4	6.4	587.0	588.3	19.6
<i>Lm/Cv</i>	279.2	659.1	157.1	261.3	11.9	11.9	26.2	21.4	.
<i>Nd/Cv</i>	42.7	14.6	181.5	181.5	18.8	18.8	60.7	44.3	8.5

^a Datos de la sección de la copa (Variedad) de cada combinación.

Cuadro 4.4.2. Análisis de cuantificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, número de copias del gen 16S rDNA, en cítricos sobre dos portainjertos (inóculo).

MDI	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Combinación	Concentración de CLas (# de copias/μl)								
Lp/Cv ^a	82.7	51.8	168.5	98.8	18.6	18.6	87.9	40.0	17.6
Lp/Cm	58.3	23.0	23.0	230.2	24.7	24.7	90.0	40.2	35.4
Lm/Cm	131.5	143.9	170.9	162.8	43.9
Lm/Cv	37.1	37.5	85.1	125.2	24.5	24.5	32.3	50.2	.
Nd/Cv	26.0	33.9	77.7	77.7	35.4	35.4	100.4	128.0	27.8

^a Datos de la sección del inóculo de cada combinación injerto-portainjerto.

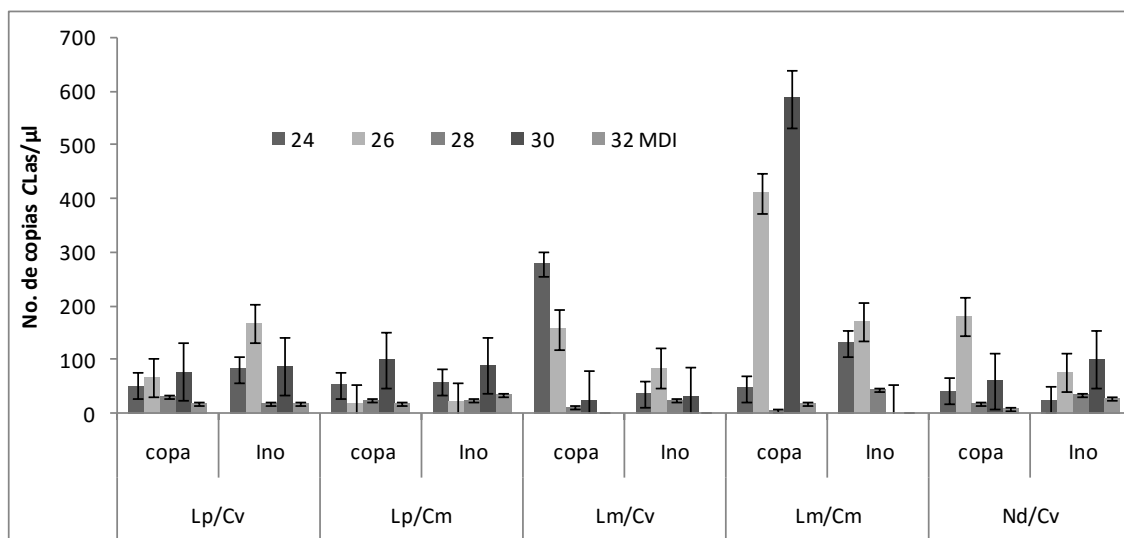


Figura 4.4. Cuantificación temporal de CLas mediante análisis de PCR cuantitativo en tiempo real de los 24 hasta los 32 meses después de la inoculación en limón persa (Lp), limón mexicano (Lm) y naranja dulce (Nd) sobre dos portainjertos diferentes Volkameriana (Cv) y Macrofila (Cm). Copa=Variedad; Ino=Inóculo.

Los síntomas expresados en cada combinación de limón mexicano, presentaron variaciones según la severidad de los síntomas, observándose la mayor severidad de los mismos 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 de la copa y disminuyendo en el brote desarrollado en el inóculo de la planta muestreada en periodos de 30 días respecto a la determinación anterior (Figura 4.4). En los tres cítricos evaluados se presentó una tendencia similar en cuanto al incremento y decremento de la concentración en las diferentes fechas de evaluación, observándose dos picos importantes de máxima concentración bacteriana en todo el periodo de evaluación; el primero a los 25 y 26 mdi y el segundo entre los 29 y 30 mdi (Figura 4.5). No habiendo una tendencia diferencial en la distribución y concentración de la bacteria entre patrones evaluados. En general, en los tres cítricos, durante dos fechas de evaluación (28 a 29 mdi) se presentaron las más bajas concentraciones de la bacteria. Esto último pudiera asociarse con incremento de la temperatura, lo que estaría induciendo directamente bajas concentraciones del patógeno.

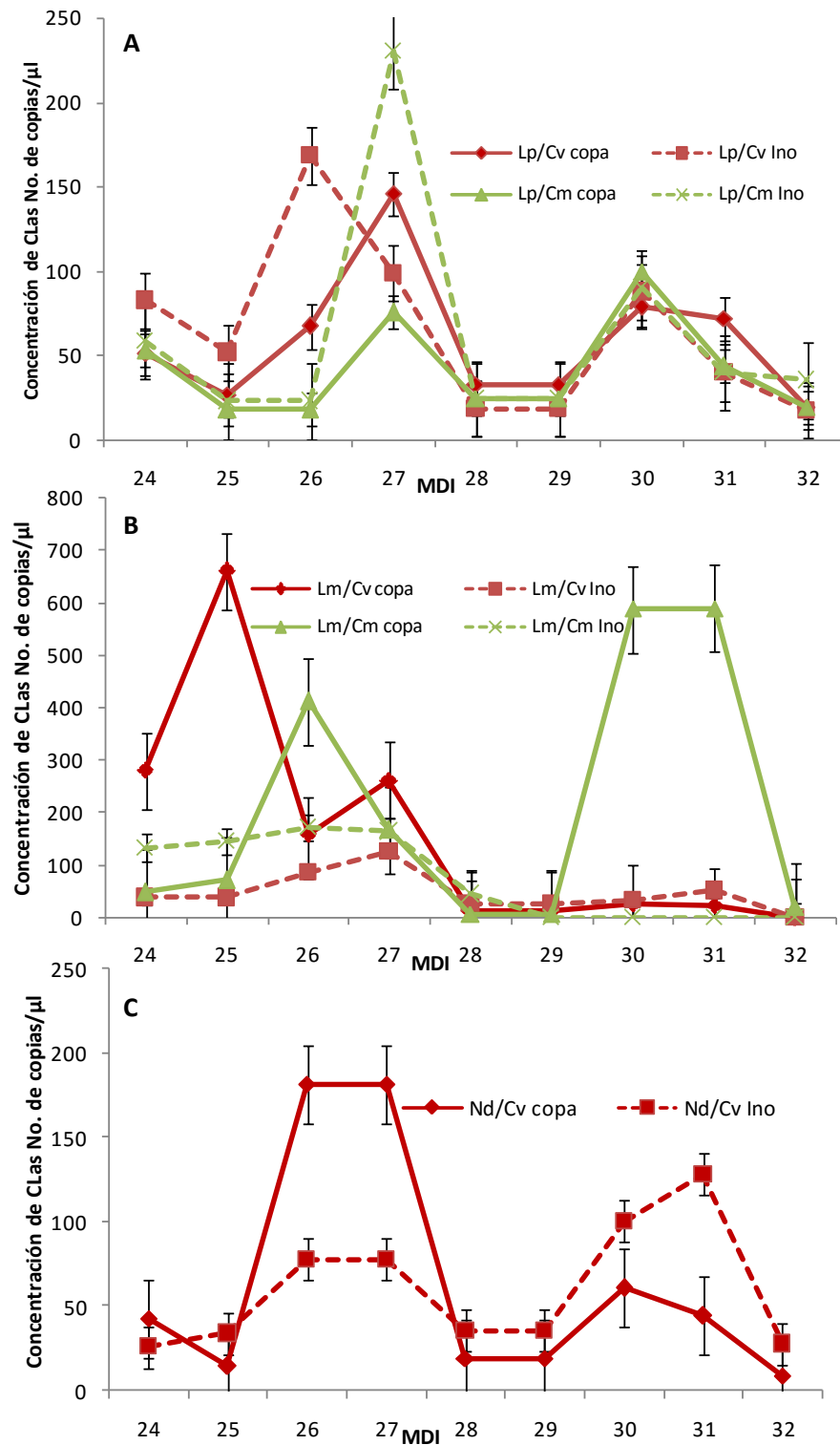


Figura 4.5. Dinámica de la concentración de CLAs en el tiempo a partir de los 24 hasta los 32 meses después de la inoculación en cítricos y su relación injerto/portainjerto. Detección por análisis de PCR cuantitativo en tiempo real.

4.4.3. Análisis histológico

A nivel histológico, las células parenquimatosas del floema de la nervadura central de las hojas de Lm^{+CLas}/*C. macrophylla* y *C. volkameriana*; Lp^{+CLas}/*C. macrophylla* y *C. volkameriana*; Nd^{+CLas}/*C. volkameriana* presentaron hiperplasia y la consecuente desorganización del sistema vascular. La anchura del floema de hojas tanto sintomáticas como asintomáticas de HLB aumentó en las tres combinaciones de limón mexicano durante el tiempo (Figura 4.6), aunque el incremento fue mayor en tejido con síntomas de la enfermedad en todos los casos ($p \leq 0.05$). El incremento de la anchura de este tejido está asociado directamente con el aumento en la división celular (hiperplasia) de las células del parénquima de floema.

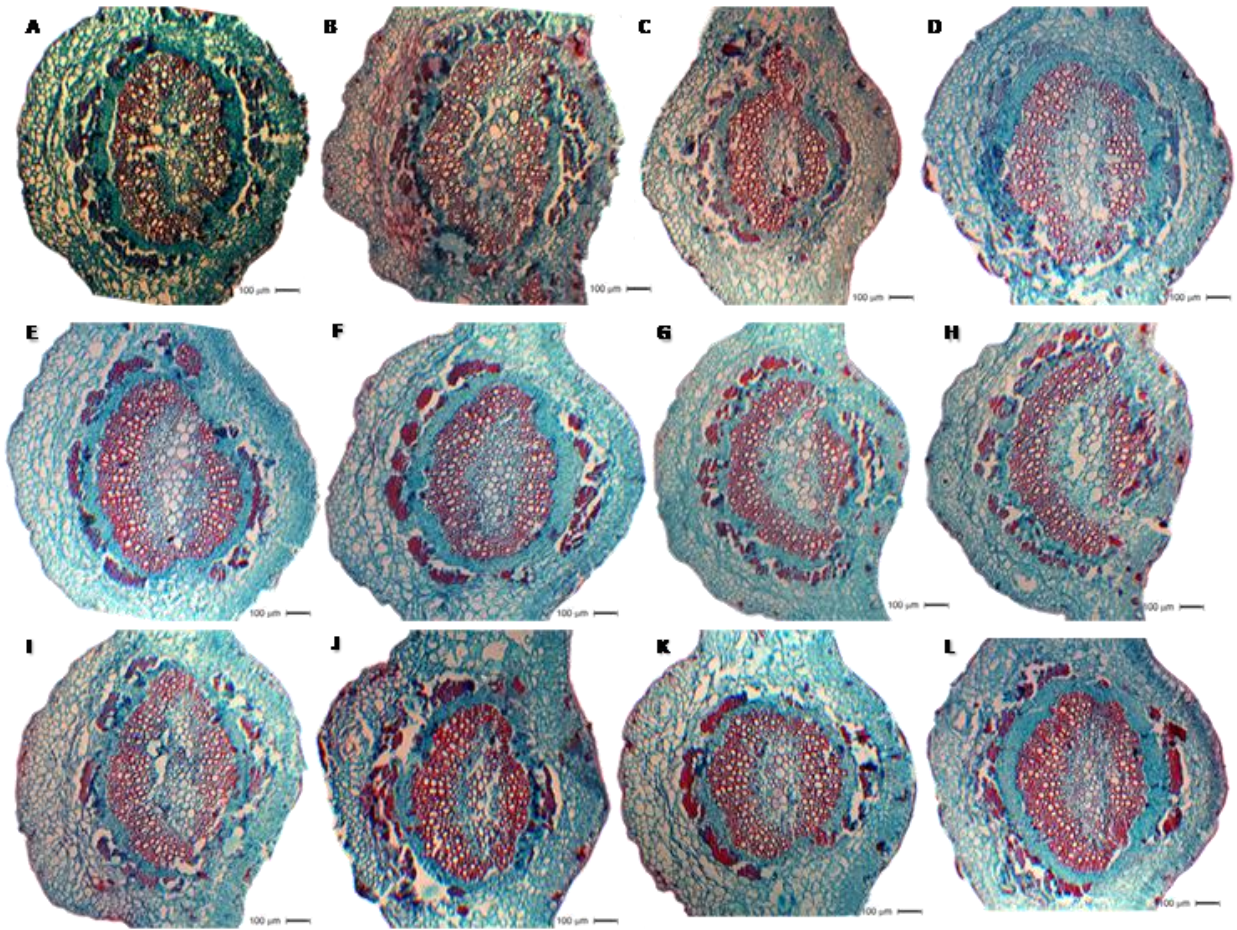


Figura 4.6. Micrografías de cortes transversales en hojas de limón de mexicano (Lm), limón persa (Lp) y naranja dulce (Nd) sobre los patrones *Citrus macrophylla* (Cm) y *C. volkameriana* (Cv) infectadas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* a los 24 meses después de la inoculación. Lm: A, B, C y D; Lp: E, F, G y H; Nd: I y J; sobre Cm: A, B, E, F y K; Sobre Cv: C, D, G, H, I, J y L; Copa: A, C, E, G e I; injerto: B, D, F, H Y J; y Testigos: K y L.

El colapso del floema inducido por la hiperplasia de las células acompañantes presentó un incremento progresivo durante el periodo de evaluación de los 24 hasta los 32 mdi (Figuras 4.7 y 4.8), así como, los síntomas macroscópicos. El ancho del floema (hiperplasia) (AF) de Lm sobre Cm y Cv; Lp sobre Cm y Cv; y Nd sobre Cv incrementó con respecto al tejido sano, pero no se observaron diferencias significativas entre cítricos, ni tampoco entre combinaciones (Figuras 4.6 y 4.7).

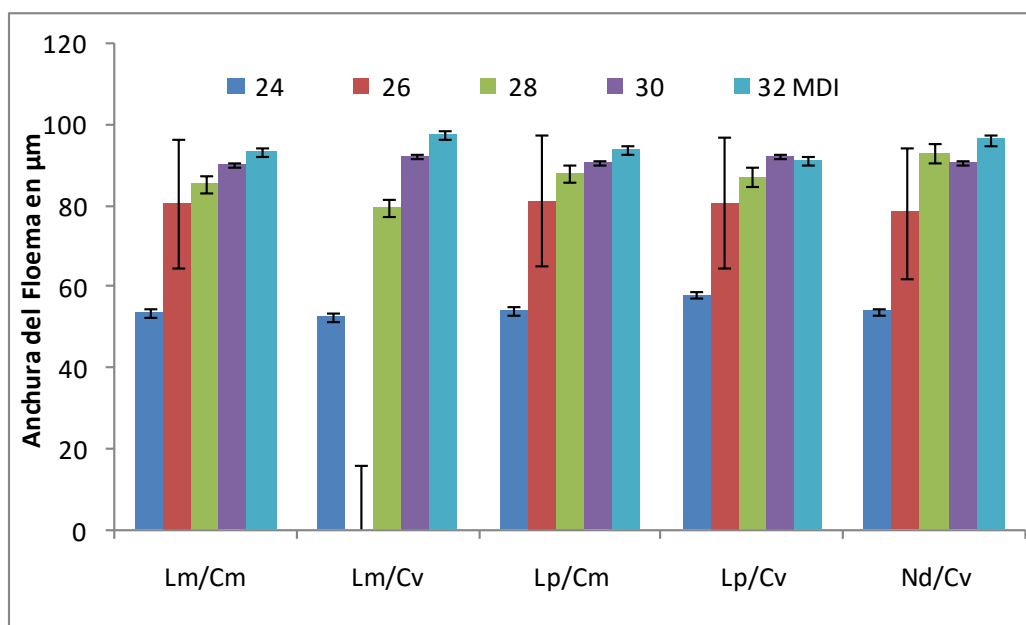


Figura 4.7. Fluctuación temporal de la anchura del floema en tres cítricos.

El limón mexicano fue el cítrico macroscópicamente más afectado por CLAs en este ensayo. Esta misma especie sobre *C. macrophylla* presentó un incremento significativo en la hiperplasia del floema de manera progresiva en las diferentes fechas de muestreo (Figura 4.8), estimado con la anchura del floema ($X=86.82 \mu\text{m}$) con respecto al tejido sano del testigo ($X=47.04 \mu\text{m}$) mostrando concordancia con la severidad visual de los síntomas. Esta asociación no fue comparable con el incremento en la anchura del floema (hiperplasia) en las diferentes combinaciones ni entre cítricos, ya que no se observaron diferencias significativas entre combinaciones de cítricos, pero sí entre plantas enfermas y sanas.

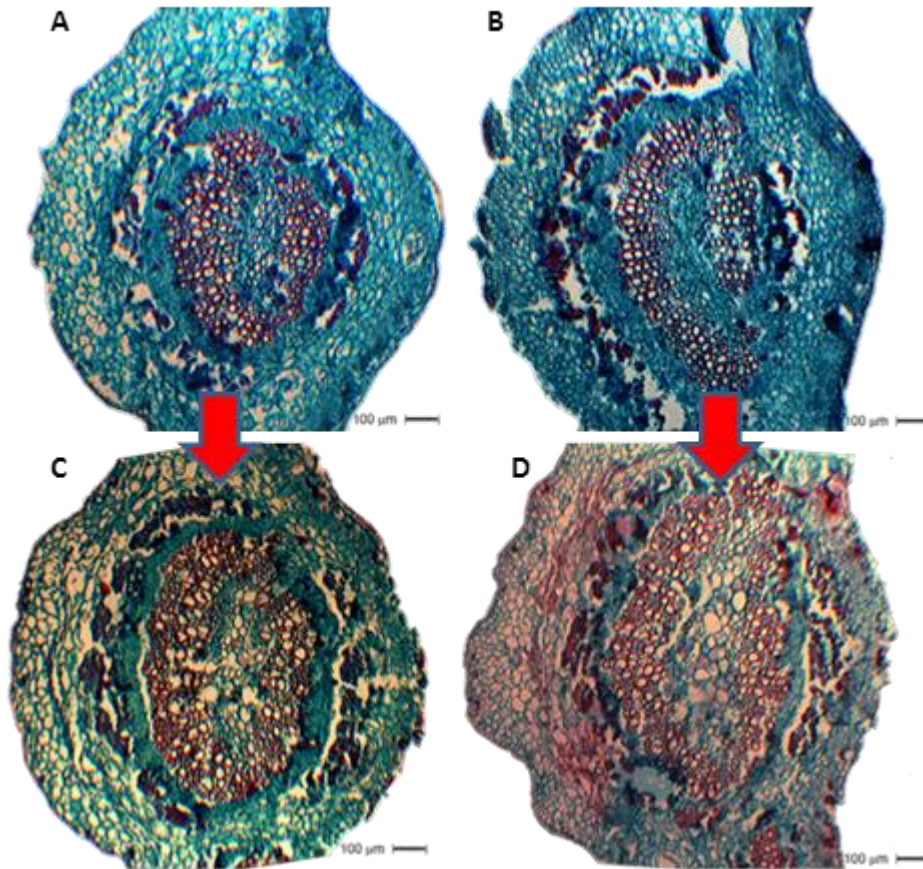


Figura 4.8. Micrografías de cortes transversales en hojas de limón mexicano sobre *C. macrophylla* infectadas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* a los 24 meses después de la inoculación (mdi): A) copa, B) inóculo; y a los 32 mdi: C) copa, D) inóculo.

4.5. Discusión

CLas se detectó en el 100% de las plantas evaluadas excepto en las plantas testigo. Las diferentes especies de cítricos y variedades exhiben síntomas variados debido a la infección por CLas (Folimonova *et al.*, 2009; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Una vez infectadas, las plantas de cítricos muestran síntomas foliares, retraso en el crecimiento de los árboles; pero dependiendo de la combinación (variedad/portainjerto) los síntomas difieren entre ellas. En este ensayo el limón mexicano injertado sobre *C. macrophylla* fue el cítrico más afectado por CLas, Robles-González y colaboradores (2013), también reporto severidades muy altas

en este cítrico. El mismo limón mexicano sobre *C. volkameriana* presentó síntomas similares a la combinación previa sin llegar a ocurrir la muerte de ramas. Diferencias similares fueron reportadas en limón rugoso infectadas por CLas (Fan *et al.*, 2013).

En el presente trabajo los niveles de concentración de la bacteria variaron entre las diferentes combinaciones evaluadas de limón mexicano, limón persa y naranja dulce con los portainjertos *Macrofila* y *Volkameriana*, pero todas las plantas exhibieron concentraciones muy bajas del patógeno (Cuadro 4.4.1 y 4.4.2). Dentro de todas las combinaciones, se observaron diferencias en las concentraciones de CLas a través del tiempo, es decir, se presentó una fluctuación, aumentaba y disminuía dicha concentración (Figura 4.5). Sin embargo, estas diferencias no fueron consistentes.

En los tres cítricos estudiados (Lm, Lp y Nd) se presentó una tendencia similar en cuanto al incremento y decremento de la concentración de CLas en las diferentes fechas de evaluación, observándose dos picos importantes de máxima concentración bacteriana en todo el periodo de evaluación; el primero a los 25 y 26 mdi (mayo a junio) y el segundo entre los 29 y 30 (Octubre a noviembre) mdi. Estos picos de máxima concentración de la bacteria están directamente relacionados con los picos poblacionales más altos para el vector de CLas el psílido asiático de los cítricos, el cual se da en los meses de mayo a julio y octubre a diciembre (Figura 4.5) (Orozco-Santos *et al.*, 2014).

Como en el floema de hojas, peciolo y tallos de naranja Valencia (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010; Folimonova y Achor, 2010), ocurrió colapso del floema de las hojas sintomáticas tanto de limón mexicano como de limón persa sobre *Macrofila* y *Volkameriana*; así como de naranja dulce sobre *Volkameriana* también se colapsó. La

anchura del floema de hojas sintomáticas y sanas aumentó en las combinaciones injerto/portainjerto anteriores a través del tiempo (Figuras 4.6, 4.7 y 4.8), aunque el incremento fue mayor en tejido sintomático en todos los casos ($p=0.05$). El colapso y taponamiento del floema se ha detallado aún más por Achor y colaboradores (2010), Etxeberria y Narciso (2012) y Esquivel-Chávez *et al.* (2012). Los análisis anatómicos presentados mostraron la destrucción del tejido del floema a medida que avanza la enfermedad (Figuras 4.6, 4.7 y 4.8) y es probable que se obstruya todo el transporte de fotoasimilidos a través de los tubos cribosos.

4.6. Conclusiones

En limón mexicano se detectó mayor concentración de CLas a los 24 meses después de la inoculación, también los síntomas fueron más evidentes en este cítrico sobre Macrofila. La distribución bacteriana fue heterogénea en relación a títulos muy bajos. A pesar de que el patógeno se distribuye de manera heterogénea dentro de cada planta, la comparación de la concentración de éste en limón mexicano, limón persa y naranja dulce y sus combinaciones con los portainjetos Macrofila y Volkameriana reveló que se detectaron niveles similares de CLas en éstas aún con grados de severidad diferentes, lo que indica la ausencia de correlación entre ambas variables.

4.7. Literatura Citada

- Achor, D., Etxeberria, E., Wang, N., Folimonova, S. Y., Chung, k. R., and Albrigo, G. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal* 9: 56-64.
- Albrecht, U., and Bowman, K. D. 2011. Tolerance of the trifoliolate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HortScience*. 46:16-22.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. Á., Flores-Sánchez, J. L., López-Arroyo, J. I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782.
- Etxeberria, E., González, P., Achor, D., and Albrigo, G. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiol. Mol. Plant Pathology* 74: 76-83.
- Etxeberria, E. and Narciso, C. 2012. Phloem anatomy of citrus trees: healthy vs. greening-affected. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 125:67–70.
- Fan, J., Chen, C., Achor, D. S., Bransky, R. H., Li, Z., Gmitter Jr., F. G. 2013. Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 83: 69-74.

- Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J. I., 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.
- Folimonova, S.Y., Robertson, C. J., Garnsey, S.M., Gowda, S., and Dawson, W.O. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354.
- Folimonova, S. Y. and Achor, D. S. 2010. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *The American Phytopathological Society*. 100 (9): 249-258.
- Freitas-Astúa, J., Locali, E.C., Antoniolo, R., Rodríguez, V., Kitajima, E.W., and Machado, M. A. 2003. Detection of Citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. *Virus Review Research* 8:196.
- Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., Wang, N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50–7.
- Koh, J. E., Zhou, L., Williams, D. S., Park, J., Ding, N., Duan, Y. P., 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. DOI 10.1007/s00709-011-0312-3.
- Li, W., Hartung, 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.

- López, C. L., Márquez, G. J. y Murguía, S. G. 2005. Técnicas para el Estudio del Desarrollo en Angiospermas. Editorial Las Prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM. 178 p.
- Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Bermúdez-Guzmán, M.J., Carrillo-Medrano, S. H., Medina-Urrutia, V. M., Hernández-Fuentes, L.M., Gómez-Jaimes, R., Manzo-Sánchez, G., Farías-Larios, J., Nieto-Ángel, D., Mijangos-Hernández, E., Sánchez-de la Torre, J.A. y Varela-Fuentes, S. 2014. El limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 449p.
- Rahman, A., Al-Reza, S. M., Yoon, J. F., and Kang S. C. 2009. In vitro inhibition of foodborne pathogens by volatile oil and organic extracts of *Poncirus trifoliata* Rafin. seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture 89:876-881.
- Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramirez, M. Á., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., 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.
- Stover, E., Bowman, K., McCollum, G., Niedz, R., Shatters, Jr. R., and Hall, D. 2001. Breeding citrus for HLB resistance at the USDA/ARS, U. S. Horticultural Research Laboratory, 2001 S. Rock Road, Ft. Pierce, FL 34945 ed.stover@ars.usda.gov
- Teixeira, D. C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E. C., Wulff, N. A., Eveillard-Jagoueix, S., Yamamoto, P.T. Ayres, A. J., Bové, J. M. 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.

Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Manzo-Sánchez, G., Robles-González, M. M., Orozco-Santos, M., Carrillo-Medrano, S. H. 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.

Capítulo 5

¿Es la fuente de inóculo o tipo de patrón responsable en una condición asintomática del naranjo dulce (*Citrus sinensis*)?

5.1. Resumen

A partir de la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) en plantas asintomáticas de *Citrus sinensis* (Cs) en Puebla, México; y debido a que la detección molecular del patógeno no era consistente, se propuso el presente proyecto con el fin de probar la hipótesis de que el naranjo agrio como portainjerto podría tener una implicación en la expresión asintomática de CLas en naranjo dulce (Nd); con los objetivos siguientes: 1) Evaluar las implicaciones de la combinación Nd-patrón y su comparación con tres fuentes de inóculo de CLas en la concentración bacteriana y cambios histológicos a nivel de tejido foliar; 2) Analizar molecularmente la implicación de la proteína pp2 en posibles mecanismos de resistencia de la planta en detrimento de la concentración de CLas. En 2014, se realizaron injertos tipo púa con tres fuentes de inóculo de CLas proveniente de Puebla, Jalisco y Quintana Roo sobre patrones certificados de naranjo Volkameriano (*C. volkameriana*) (Cv) y naranjo agrio (*C. aurantium*) (Ca). Este experimento consistió de 10 plantas por fuente de inóculo, con las combinaciones Nd/Cv y Nd/Ca. A partir de los tres mdi se colectaron muestras cada 30 días por 5 meses. Secuencialmente, se seleccionaron hojas ascendentemente a partir de la base de una rama seleccionada por planta. En cada fecha se registraron los síntomas visuales y se evaluó la severidad en dosel. Las muestras se analizaron molecularmente mediante q-PCR (430 muestras totales) e histológicamente (1,350 cortes foliares analizados), bajo un diseño de parcelas divididas (SAS[®] ver 9.4). Los tipos de síntomas expresados en las distintas combinaciones fueron contrastantes y

consistieron en aclaramiento de nervaduras y clorosis ligera en Nd/Ca, moteado difusos, moteado albino y clorosis en Nd/Cv. La expresión de síntomas inició entre los 101 y 135 ddi. La combinación Nd/Ca con CLas-P mantuvo su condición asintomática. La concentración bacteriana presentó fluctuaciones en las diferentes fechas de muestreo en un rango de 3.1×10^4 a 6.6×10^6 . No se presentaron diferencias entre patrones con respecto al inóculo, pero si entre fuentes de inóculo, siendo mayor y estadísticamente diferente en CLas-J. Con este inóculo, la máxima concentración se detectó en Nd/Cv a los 122 ddi con 6.6×10^6 . Se observó un efecto diferencial en la anchura del floema inducida por CLas según la fuente de inóculo con respecto al testigo sano. El efecto promedio fue de 38%, 28% y 27% para CLas-J, CLas-Q y CLas-P, respectivamente. La mayor alteración se observó en CLas-J ($42 \pm 2 \mu\text{m}$), lo que coincide con la alta concentración de CLas. La combinación Nd/Ca se asoció con cierta tolerancia a CLas debido a títulos altos de la bacteria (1.1×10^6 copias CLas/ μl a los 4 mdi) con nula expresión de síntomas (CLas-P) o baja expresión de síntomas en CLas-J y CLas-Q (<25%).

Palabras Clave: Huanglongbing, *C. aurantium*, *C. volkameriana*, and q-PCR.

5.2. Introducción

CLas infecta todas las especies de cítricos con diferencias en la expresión sintomática (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Velázquez-Monreal *et al.*, 2012). Se tienen reportes que indican la relación inversa entre la intensidad de los síntomas en el hospedante y la concentración bacteriana (Folimonova *et al.*, 2009; Stover *et al.*, 2001). Lo que se contrapone con lo reportado por Flores-Sánchez y colaboradores (2015), quienes describieron que la concentración de CLas está directamente relacionada con la severidad de la enfermedad en condiciones de campo. Esta relación pudiera asociarse también con las alteraciones inducidas a nivel celular.

El desarrollo y la intensidad epidémica de la enfermedad en México han sido distintos a los esperados, después de la entrada de CLas. En 2010, un estudio realizado por el IICA reportó que los principales daños por susceptibilidad de las especies disponibles en México serían en cítricos dulces de acuerdo a las referencias obtenidas de la literatura en Brasil, EUA, Asia y otros países (Salcedo *et al.*, 2010). Sin embargo, estudios recientes demostraron que en México las especies citrícolas más susceptibles han sido cítricos agrios.

A finales de 2013, el área oficial fitosanitaria del SENASICA reportó en la región norte de Puebla, una condición atípica relacionada con la detección recurrente de muestras vegetales asintomáticas en plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) injertados sobre naranjo agrio (*C. aurantium*) (Robles, 2013. Comunicación personal). Debido a que la detección molecular del patógeno no era consistente y que los árboles no presentaban la sintomatología del HLB, se estableció un experimento en invernadero con el fin de probar la hipótesis de que el naranjo agrio como portainjerto podría tener una implicación en la

expresión asintomática de CLas en naranjo dulce. Por lo anterior se propuso el presente proyecto con los objetivos siguientes:

- Objetivos:** 1) Evaluar las implicaciones de la combinación naranja dulce-patrón y su comparación con tres fuentes de inóculo de CLas en la concentración bacteriana y cambios histológicos a nivel de tejido foliar.
- 2) Analizar molecularmente la implicación de la proteína pp2 en posibles mecanismos de resistencia de la planta en detrimento de la concentración de CLas.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1 Experimento en Invernadero

Con el fin de evitar posible riesgo de escape de inóculo, el 24 de abril 2014, se estableció un experimento en condiciones de invernadero del INIFAP-Tecomán, Colima. Se realizó un injerto tipo púa con tres fuentes de inóculo de CLas proveniente de Puebla, Jalisco y Quintana Roo sobre patrones certificados de naranjo Volkameriano (*C. volkameriana*) (*Cv*) y naranjo agrio (*C. aurantium*) (*Ca*). Con la finalidad de determinar que la condición asintomática se debiera al origen del inóculo se empleó inóculo proveniente de plantas asintomáticas procedentes de ramas CLas+ dichas plantas se mantuvieron en jaulas con doble malla antiafidos. Además como parte del diseño experimental se injertaron varetas de naranjo dulce (*C. sinensis*) (*Cs*) certificadas como controles negativos (Cuadro 5.1). Trascurridos 25 días después de la inoculación (ddi) se realizó el destape de los injertos para corroborar el prendimiento de los mismos (15 de mayo, 2014). Los injertos que murieron

fueron remplazados el 6 de junio con material correspondiente a la fuente de inóculo requerida.

Cuadro 5.1. Descripción de la fuente de inóculo, injerto, portainjerto y número de repeticiones establecidas en el diseño del experimento.

Fuente de Inóculo	Reg. Citrícola	Patrón	Injerto	Repetición	
Naranja dulce Asintomática	Centro-Golfo	Volkameriana	Púa +	16 ¹	
		(Cv)	Púa -	5	
San José Acateno, Puebla		N. Agrio	Púa +	16	
		(Ca)	Púa -	5	
Naranja dulce sintomática	Península	Volkameriana	Púa +	10	
		(Cv)	Púa -	5	
		Quintana Roo	N. Agrio (Ca)	Púa +	10
				Púa -	5
Naranja dulce sintomática	Pacífico	Volkameriana	Púa +	10	
		(Cv)	Púa -	5	
		Jalisco	N. Agrio	Púa +	10
			(Ca)	Púa -	5

¹Se calculó el número de plantas con base a los datos de transmisibilidad reportados por Velázquez-Monreal *et al.* (2012) y Albrecht y Bowman (2011).

5.3.2. Selección de material vegetal para fuente de inóculo

El material vegetal utilizado como fuente de inóculo fue seleccionado de regiones cítricas de naranja dulce (*C. sinensis*) en los estados de Quintana Roo, Jalisco y Puebla. Este último fue seleccionado con base a los resultados de qPCR realizados a un árbol asintomático positivo localizado en San José Acateno, Puebla. Se seleccionó varetas de ramas con mayor concentración de CLas. La concentración de CLas fue cuantificada en cada fuente de inóculo.

Las varetas de los inóculos provenientes de Jalisco y Puebla se colectaron el 22 y 23 de abril 2014, respectivamente, en ambos casos se cortaron varetas de 10-15 cm de longitud de árboles de naranja dulce, procurando que las varetas portaran yemas viables, se envolvieron con papel absorbente y se conservaron en una hielera con geles refrigerantes para su traslado a las instalaciones del INIFAP-Tecomán, Colima. Por su parte el material de Quintana Roo fue colectado el 24 de abril 2014, este material es parte de una colección de éste centro de Investigación.

5.3.3. Recolecta de tejido vegetal y evaluación de expresión de síntomas

Con el fin de determinar la concentración bacteriana y determinar los cambios histológicos inducidos por CLas tres meses después de la inoculación (mdi) se inició la colecta de material, el 14 de Julio 2014 y a partir de esta fecha se realizaron muestreos periódicos cada 20 días (Cuadro 5.2). En cada colecta se cortaron dos hojas de la parte proximal al punto de injerto, la muestra se colocó en bolsas de polipapel dentro de una hielera con geles refrigerantes para su conservación y traslado al laboratorio LANREF del Colegio de Postgraduados.

Además en cada colecta, se monitoreó la expresión de síntomas y su progresividad con el fin de registrar el desarrollo de la enfermedad.

Cuadro 5.2. Cronograma de colectas de material vegetal por fuente de inóculo y patrón, en el periodo julio a octubre, 2014.

Fuente Inóculo	Patrón	Repetición	14-jul	4-ago	27-ago	19-sep	1-oct
Puebla	Volkameriana	16	16	16	16	16	16
		5	5	5	5	5	5
	N. Agrio	5	5	5	5	5	5
		5	5	5	5	5	5
Quintana Roo	Volkameriana	10	10	10	10	10	10
		5	5	5	5	5	5
	N. Agrio	10	10	10	10	10	10
		5	5	5	5	5	5
Jalisco	Volkameriana	10	10	10	10	10	10
		5	5	5	5	5	5
	N. Agrio	10	5	5	5	5	5
		5	5	5	5	5	5
Muestras Totales/Colecta			86	86	86	86	86

5.3.4. Cuantificación de CLas qPCR

Para la cuantificación de CLas se utilizó el método de curva estándar en un volumen de reacción de 20 µl, empleando el siguiente set de primers HLBas (TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG) y HLBp (GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG), junto con la sonda HLBbr (FAM- AGACGG GTGAGT AAC GCG/3BQH1) descritos por Li *et al.*, (2006) y el supermix SsoAdvanced™ (BIO-RAD). La reacción se llevó a cabo en un termociclador StepOne (Applied Biosystems) y el programa de termociclaje consistió en desnaturalización inicial a 95 °C por 3min, 40 ciclos que consistieron en 95°C por 5 s, seguido de 59 °C por 40s y 59 °C por 35s (Anexo 1).

5.3.5. Análisis molecular de proteínas asociadas a mecanismos de resistencia

Para la detección de la proteína de lectina pp2 (específica del floema) reportada por Albrecht y Bowman (2008) quienes detectaron esta proteína en plantas de naranja dulce solo en presencia de CLAs. Para ello se realizó la extracción de RNA con el protocolo de CTAB 2% (Doyle y Doyle 1987; Freitas-Astúa *et al.*, 2003) con 100 mg de nervadura central. Para la obtención del cDNA (DNA complementario) se utilizó el Kit RETROscript® (AMBIO) siguiendo las especificaciones de manufactura. Se realizó el diseño de un par de primers PP2F (CGG ACA AAG AGA ACA GAG GAT G) y PP2R (TCG AAC TCT CCC AGC TCT ATC) con base a la secuencia de *Arabidopsis thaliana* (Albrecht y Bowman, 2008). La PCR se llevó a cabo bajo las condiciones de reacción de acuerdo al Cuadro 5.3. El programa de termociclaje consistió en desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos que consistieron de una etapa de desnaturalización a 95 °C por 30 s, anillamiento a 55.9 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 30 s; y una etapa de extensión final a 72 °C por 5 min.

Cuadro 5.3. Condiciones de PCR con el set de primers PP2F/PP2R

Reactivo	1X
Buffer 10x	2.5 ul
MgCl ₂	1.25 ul
dNTP'S	0.5 ul
PP2F	2ul
PP2R	2ul
Taq	0.4ul
H ₂ O libre de nucleasas	14.35
	23 ul
cDNA	2

Los fragmentos amplificados por PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio en una proporción 1:10. La electroforesis fue corrida con buffer TAE 1X; se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb. El voltaje utilizado fue de 90 volts por 45 min. Trascurrido el tiempo de electroforesis, se reveló con un transiluminador de luz UV.

5.3.6. Análisis histológico

Para el análisis histológico se procesaron un total de 201 muestras 63 pertenecientes a la colecta 1 (14-jul-14), 61 a la colecta 3 (27-ago-14) y 77 a la colecta 5 (10-oct-14) (Cuadro 5.4). Previamente, estas muestras tuvieron un proceso de fijación (FAA). El proceso completo incluyó una serie de fases, las cuales se describen a continuación (Figura 5.1) (Anexo 2).

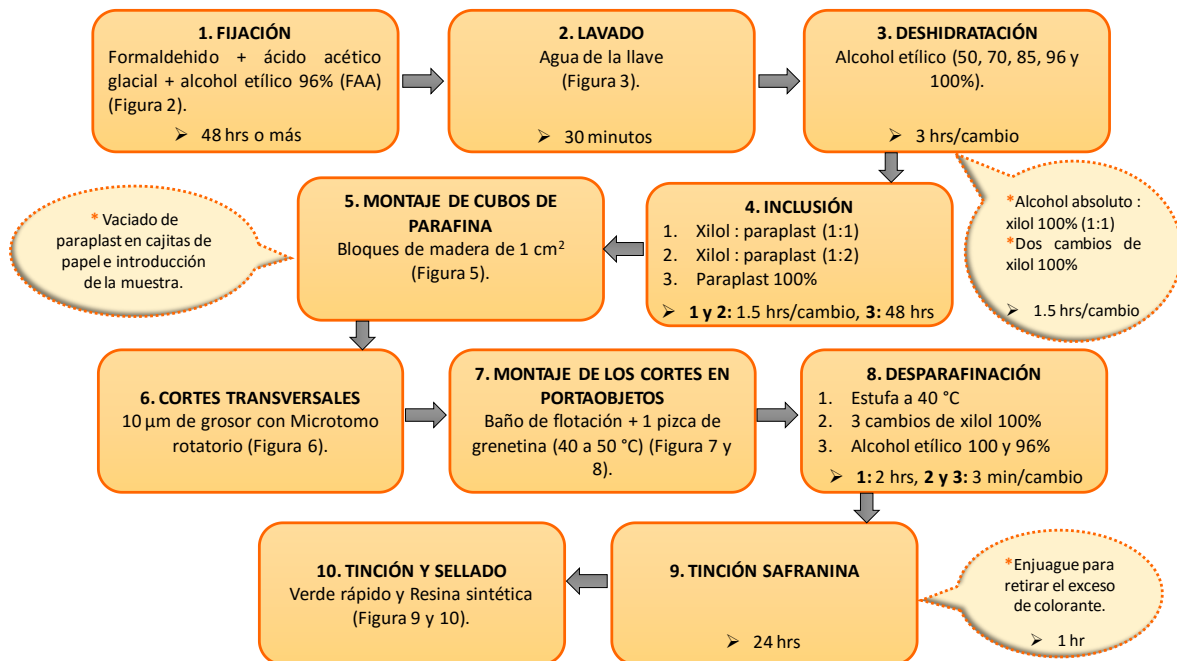


Figura 5.1. Diagrama del proceso de preparación del tejido foliar para realizar un análisis histológico. Fuente: López *et al.*, 2005.

Cuadro 5.4. Número de muestras seleccionadas por fuente de inóculo y tipo de patrón, para análisis histológico. Período julio–octubre, 2014.

Fuente de Inóculo	Patrón	14-jul	27-ago	10-oct
Puebla³	Volkameriano	16	16	16
	N. Agrio	5	5	20¹
Quintana Roo	Volkameriano	10	10	10
	N. Agrio	10	10	10
Jalisco	Volkameriano	10	10	10
	N. Agrio	10	8	9
Testigo (-)	Volkameriano	5²	5	5
	N. Agrio	5	5	5
Muestras Totales/Colecta		63	61	77

¹Se adicionaron las muestras pertenecientes a la reinoculación en naranjo agrio fuente de inóculo Puebla.

²De un total de 5 testigos correspondientes a cada porta-injerto y colecta, solo fue procesada 1 muestra.

³fecha de inoculación de varetas positivas a CLas: 20-abril-2014.

De un total de 201 muestras ya incluidas en parafina, se seleccionaron tres muestras por cada fuente de inóculo (una muestra por planta) y patrón para cada fecha de colecta, teniendo un total de 54 muestras (16 pertenecientes a la colecta 1, 17 a la colecta 3, 16 a la colecta 5, 3 al ensayo 4 (Re-inoculación Naranja Agrio (RINA)) y 2 a los testigos). Cada muestra fue sometida a las fases 6-10 de la figura 5.1. Las observaciones se realizaron en un microscopio compuesto con cámara digital para microscopia.

Para las mediciones (μm) de áreas con hiperplasia se tomaron 5 imágenes por laminilla a 10 X aumentos, tomando como referencia el 1 ro, 5 to, 10 mo, 15 to y 20 mo corte de la laminilla. Las mediciones en las imágenes digitales se hicieron con el analizador de imágenes Image Tool ver. 3.0. En el Cuadro 5.5 se muestra el número de muestras, laminillas, imágenes y mediciones, correspondientes a la colecta 1, 3 y 5, así como la RINA

y los testigos correspondientes. Así mismo se observa un total de 54 muestras procesadas y 270 laminillas analizadas.

Cuadro 5.5. Numero de muestras laminillas, imágenes y mediciones realizadas para determinar la hiperplasia del floema en material vegetal proveniente de la combinación *Cs/Ca* y *Cs/Cv*.

Colecta	# de muestras	# de Laminillas (5/muestra)	# de Imágenes (5/laminilla)	# de Mediciones (μm) (4¹/imagen)
1	16	80	400	1600
3	17	85	425	1700
5	16	80	400	1600
RINA²	3	15	75	300
Testigo <i>Ca</i>	1	5	25	100
Testigo <i>Cv</i>	1	5	25	100
TOTAL	54 muestras	270 laminillas	1350 imágenes	5400 mediciones

¹Se obtuvo un promedio por imagen para evitar cualquier error.

²Re-inoculación en naranjo agrio, de este material solo se tiene una colecta.

5.3.7. Análisis de resultados

Mediante SAS ver 9.4 se realizó un análisis estadístico mediante un diseño de parcelas sub-subdivididas donde la parcela grande fueron las diferentes fechas de evaluación, la mediana los patrones *Ca* y *Cv* y la chica, los tipos de fuentes de inóculo. La comparación de medias se realizó con Tukey ≤ 0.05 .

5.4. Resultados

5.4.1. Detección y cuantificación de CLas en tres fuentes de inóculo

La selección de material vegetal como fuente de inóculo proveniente de Jalisco y Quintana Roo se realizó con base a su diagnóstico positivo a CLas de plantas sintomáticas a HLB. Sin embargo, para elegir las varetas de Puebla se tomaron en cuenta las cuantificaciones de CLas en nueve ramas de un árbol asintomático CLas+ (Cuadro 5.6). Se realizó la cuantificación de CLas de cada vareta injertada con la finalidad de conocer la concentración inicial (0) de CLas en cada planta con las tres fuentes de inóculo.

Cuadro 5.6. Concentración de CLas y CT's de nueve ramas asintomáticas positivas empleadas para la elección de varetas fuente de Inóculo, Puebla.

Rama	CT	Concentración
A3R1M1	34.47	597.18
A3R3M1	31.94	2738.16
A3R5M2	35.07	416.76
A3R5 M3	34.92	455.02
A3R6M1	34.75	503.55
A3R6M2	34.98	439.94
A3R9M3	34.96	445.64
A3R9M4	34.69	524.80
A3R10M4	35.23	379.11

Una vez transcurrido los 25 días de destape se observó que varias plantas del inóculo de Puebla sobre el patrón de naranjo agrio no habían prendido, por lo que se repitió la inoculación en este patrón el 6 de Junio 2014.

5.4.2. Expresión de síntomas y cuantificación de CLas en tres fuentes de inóculo

El inóculo de Puebla en ninguna combinación indujo una reacción asintomática. La reacción fue sintomática para todas las fuentes de inóculo. El 4 de agosto del 2014 se observó el inicio de la expresión sintomática en 16 de 86 plantas (Figura 5.2), a los 103 días después de la inoculación. La mayor incidencia de plantas sintomáticas en este periodo de incubación fue con el inóculo de Jalisco (9 plantas), seguido del inóculo de Quintana Roo (4) y Puebla (3). La expresión de síntomas predominó a los 103 ddi, sobre el patrón Volkameriana (13 plantas), las tres plantas sintomáticas restantes fueron aquellas con inóculo proveniente de Jalisco, sobre el patrón de naranjo agrio. Además, seis plantas adicionales expresaron síntomas en un rango de incubación de 121 a 139 ddi, estos ejemplares corresponden a los periodos más tardíos sobre patrón Volkameriana con inóculo de Puebla y Quintana Roo (Figura 5.2, Cuadro 5.7).

Los síntomas observados en cada fuente de inóculo fueron contrastantes. Las plantas con el inóculo de Jalisco presentaron aclaramiento de nervaduras, moteado difusos, moteado albino y clorosis ligera. Para el caso del inóculo de Quintana Roo las plantas presentaron aclaramiento de nervaduras, moteados leves y ligera clorosis; las plantas con el inóculo de Puebla (Asintomáticos en campo) sólo presentaron aclaramiento de nervaduras y clorosis ligera.

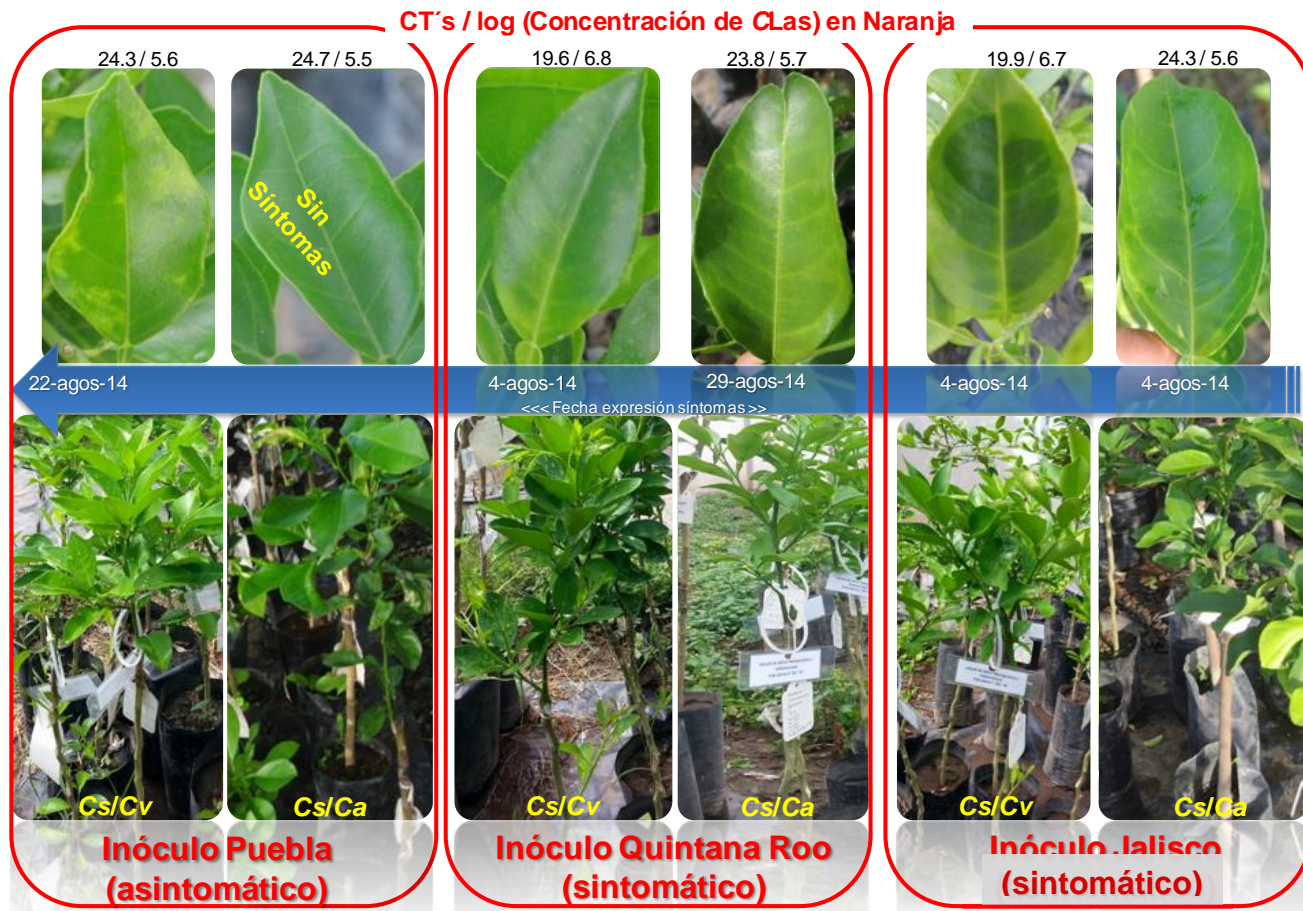


Figura 5.2. Relación naranjo dulce/portainjerto, fecha de expresión de síntomas, tipo de síntomas y concentración bacteriana de CLas por fuente de inóculo.

Cuadro 5.7. Síntomas de HLB en plantas de naranja dulce injertados sobre *C. volcameriana* y *C. aurantium* infectadas con tres fuentes de inóculo de CLas.

Fuente inóculo	Porta-Injerto	#planta	Descripción de síntomas	Expresión de síntomas	PI ¹	[CLas]	
Puebla	<i>Cs/Cv</i>	2	Aclaramiento de nervadura	8-sep-14	138	4.09x10 ⁵	
		9	Punteado clorótico inicio de síntomas	4-ago-14	103	3.15x10 ⁴	
		10	Inicio de síntomas apenas distinguibles	4-ago-14	103	6.32x10 ⁵	
		15	Moteado albino	4-ago-14	103	2.37x10 ⁵	
Jalisco	<i>Cs/Cv</i>	1	Aclaramiento de nervadura apenas apreciable	4-ago-14	103	1.1 x10 ⁶	
		2	Moteado y clorosis	22-ago-14	121	4.4x10 ⁵	
		4	Aclaramiento fuerte en nervadura	4-ago-14	103	2.3x10 ⁵	
		5	Aclaramiento en nervadura	4-ago-14	103	5.17x10 ⁶	
		6	Aclaramiento en nervadura y moteado leve	4-ago-14	103	5.9 x10 ⁵	
		8	Aclaramiento en nervadura y moteado	4-ago-14	103	1.17x10 ⁵	
		9	Aclaramiento en nervadura apenas apreciable	4-ago-14	103	9.25x10 ⁴	
		10	Moteado y clorosis	22-ago-14	121	7.95x10 ⁵	
		<i>Cs/Ca</i>	18	Aclaramiento en nervadura y moteado	4-ago-14	103	4.16x10 ⁵
			19	Aclaramiento en nervadura y moteado leve	4-ago-14	103	6.5x10 ⁵
	23		Aclaramiento en nervadura	4-ago-14	103	3.09x10 ⁶	
	24		Punteado clorótico	22-ago-14	121	2.5x10 ³	
	Quintana Roo	<i>Cs/Cv</i>	1	Aclaramiento de nervadura	4-ago-14	103	6.23x10 ⁶
			2	Punteado clorótico inicio de síntomas	4-ago-14	103	8.31x10 ⁴
3			Moteado	22-ago-14	121	5.82x10 ⁵	
5			Moteado solo un par de hojas	4-ago-14	103	8.62x10 ⁴	
6			Moteado y aclaramiento de nervaduras	9-sep-14	139	2.06x10 ⁵	
9			Moteado	4-ago-14	103	7.72x10 ⁴	
<i>Cs/Ca</i>		18	Moteado y aclaramiento de nervaduras	29-ago-14		5.19x10 ⁵	

¹Periodo de incubación a partir de la fecha de inoculación el 23 de abril, 2013.

La incidencia de plantas con síntomas fue mayor para el inóculo de Jalisco, reportando 12 plantas (8 de *Cs/Cv* y 4 de *Cs/CA*) (Figura 5.3) con un rango de expresión de síntomas de 103-121 ddi. Para el inóculo de Quintana Roo, se reportaron 7 plantas sintomáticas (6 de *Cs/Cv* y 1 de *Cs/CA*) (Figura 5.4) con un rango de 101-136 ddi; mientras que para el inóculo de Puebla las únicas plantas en expresar síntomas son aquellas injertadas sobre el patrón *Cv* (4 plantas) con un rango de expresión de síntomas de 101-135 ddi. Cabe mencionar que la condición asintomática que presenta en campo del inóculo de Puebla (*Cs/CA*) (Figura 5.5) se mantiene bajo las condiciones de invernadero establecidas en este experimento (20 plantas); y las plantas de *Cs/Cv* con síntomas solo presentaron aclaramiento de nervaduras y ligera clorosis, no se observaron moteados típicos de la enfermedad (16 plantas).

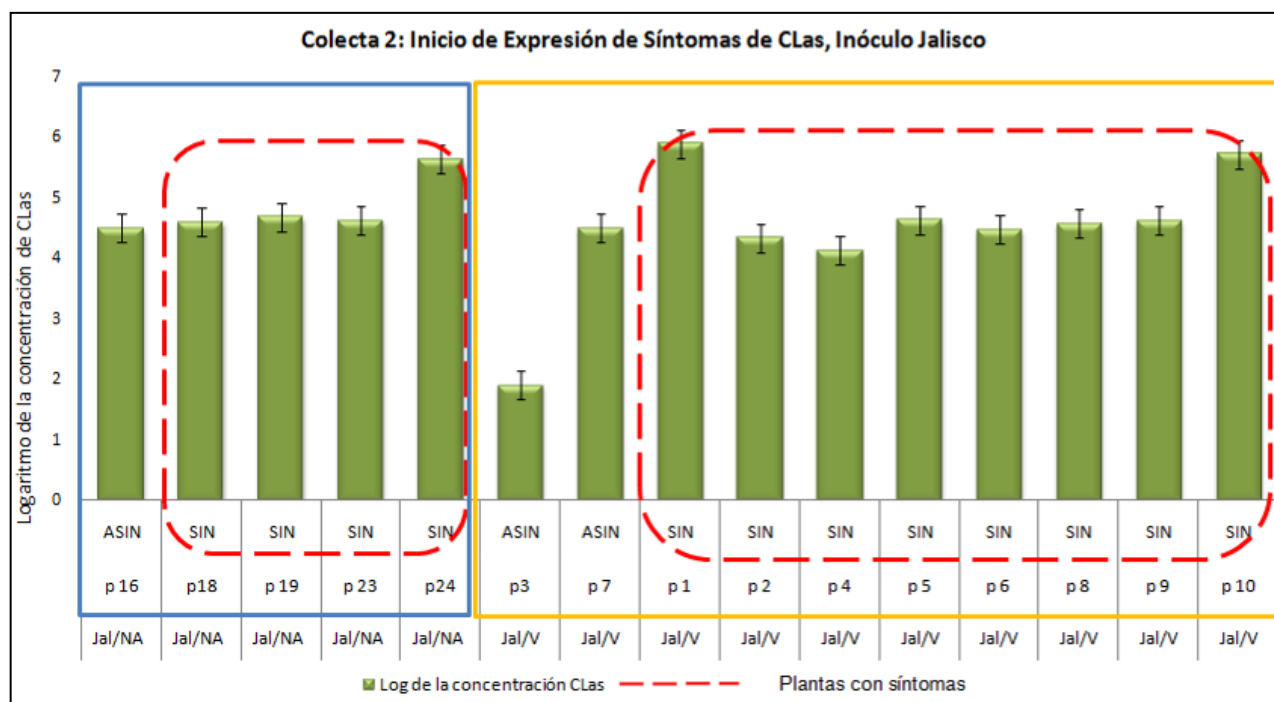


Figura 5.3. Cuantificación de CLas en plantas de naranja dulce con inóculo proveniente de Jalisco. 8 plantas de *Cs/Cv* (V) sintomáticas, 4 *Cs/CA* (NA) sintomáticas.

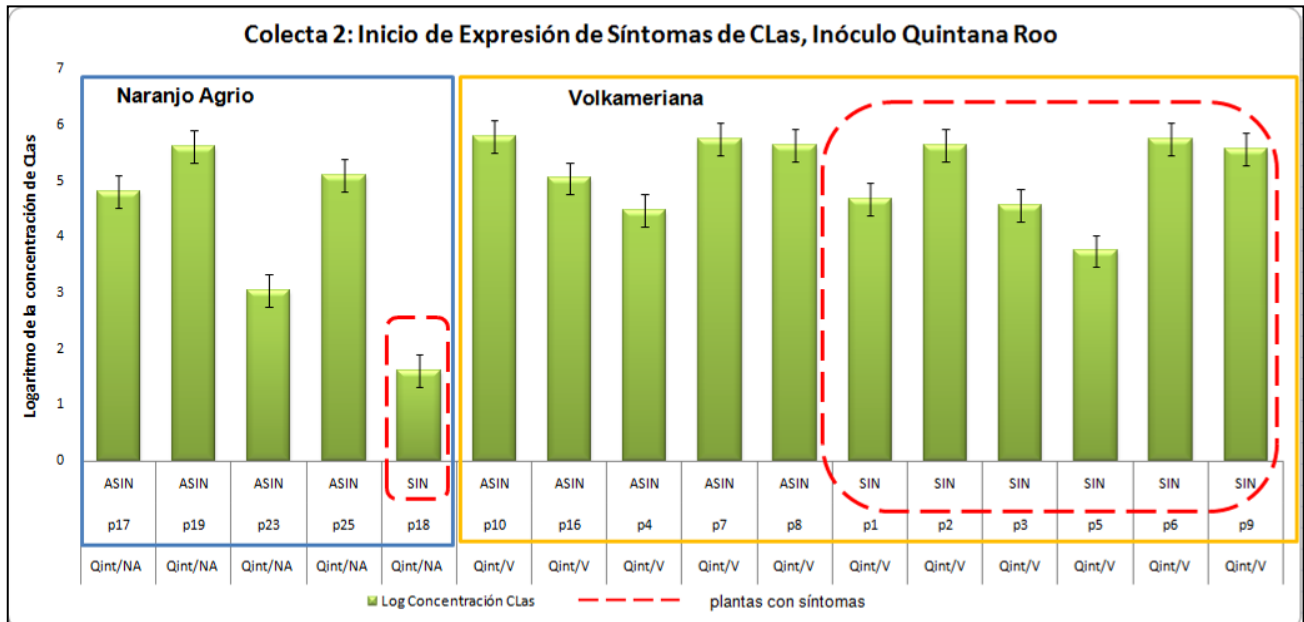


Figura 5.4. Cuantificación de CLas por qPCR en plantas sintomáticas y asintomáticas, relación injerto portainjerto con inóculo proveniente de Quintana Roo.

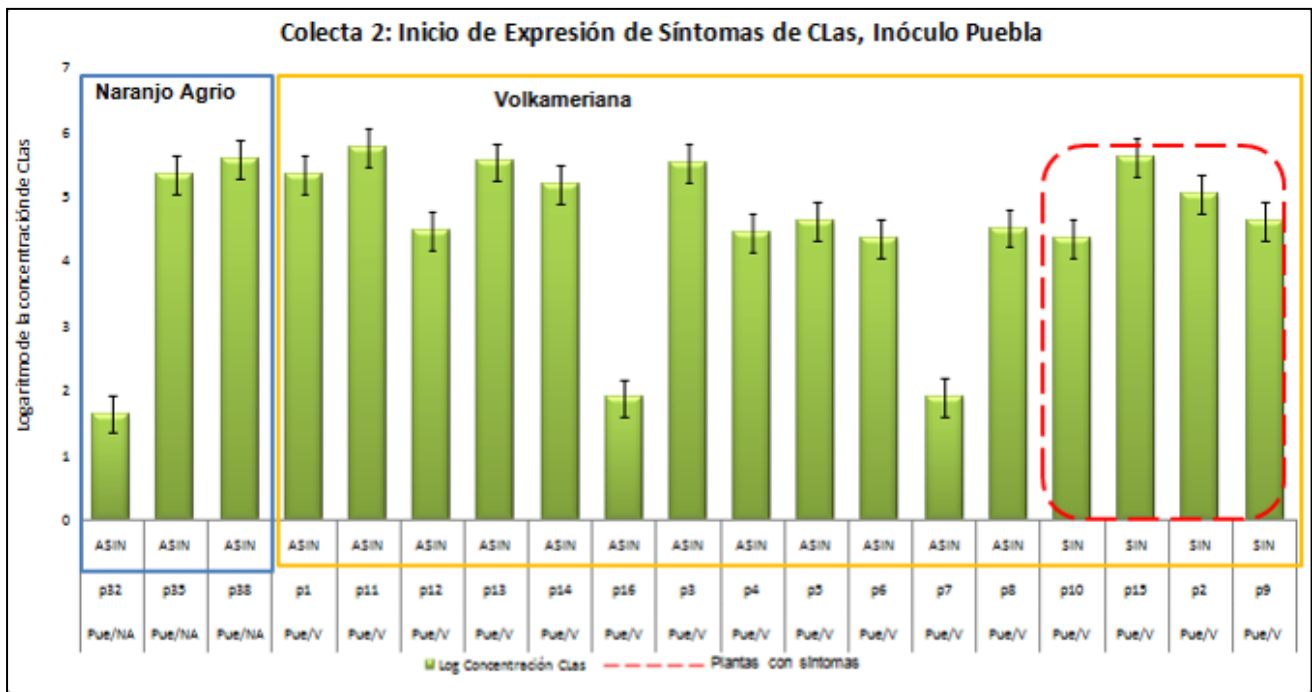


Figura 5.5. Cuantificación de CLas por qPCR en plantas sintomáticas y asintomáticas, relación injerto portainjerto con inóculo proveniente de Puebla.

La concentración bacteriana presentó fluctuaciones en las diferentes fechas de muestreo (Cuadro 5.8 y Figura 5.6). Pero se observó una tendencia incremento o decremento similar en las tres fuentes de inóculo evaluadas, en las diferentes fechas (Figura 5.7). La máxima concentración se detectó en la tercera evaluación a los 122 ddi. Las concentraciones más bajas de CLas se detectaron en el inóculo proveniente de Puebla, pero aun en bajas concentraciones se observaron síntomas en la combinación con *C. volcameriana* y su incremento fue gradual en las tres primeras fechas de evaluación para las dos combinaciones de esta fuente de inóculo.

El inóculo de Jalisco fue el que indujo mayor concentración de CLas independientemente del tipo de portainjerto.

Cuadro 5.8. Número de copias del gen 16S rDNA de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de naranja dulce sobre dos portainjertos.

DDI	Jalisco				Puebla				Quintana Roo			
	CV		Ca		CV		Ca		CV		Ca	
	CLas	CT	CLas	CT	CLas	CT	CLas	CT	CLas	CT	CLas	CT
81	312430.93	25.5	155242.28	27.5	156.61	33.3	47.41	34.5	7477.06	31.6	82.96	33.9
102	156969.95	26.6	119130.42	25.9	146721.74	-	193742.09	28.6	245354.71	26.0	121165.21	28.6
122	998877.12	23.3	1115813.50	23.0	481491.88	24.6	386722.67	24.5	711892.38	25.4	185377.78	25.9
142	472300.68	24.6	349485.70	24.2	-	-	-	-	204886.87	26.3	168392.07	30.1
162	301649.67	26.2	98514.08	25.3	89.19	34.5	69.22	34.6	520271.04	27.5	17693.12	31.9

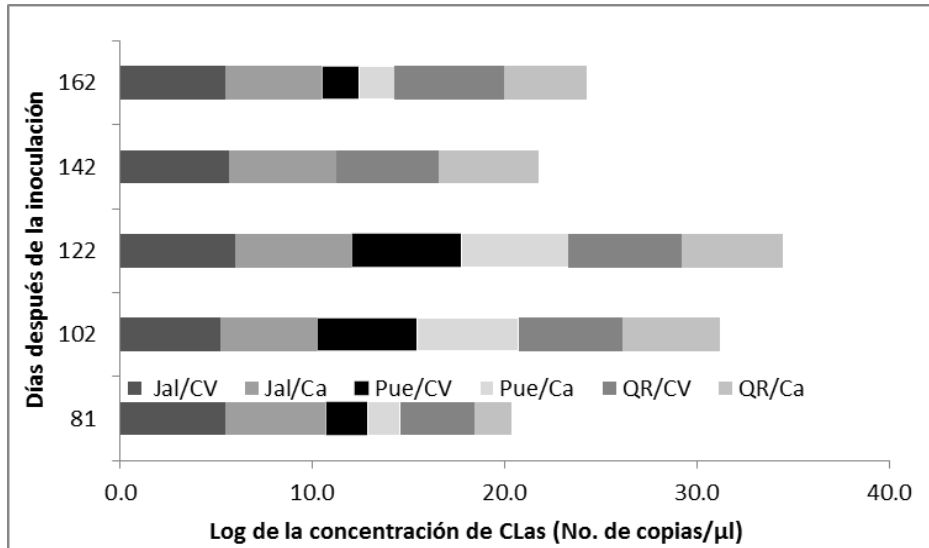


Figura 5.6. Cuantificación temporal de CLas, 81 días después de la inoculación en naranja dulce y su relación injerto/portainjerto de tres fuentes de inóculo. Jal/Cv=Jalisco/*C. volkameriana*, Jal/Ca=Jalisco/*C. aurantium*; Pue/Cm= Puebla/*C. macrophylla*, Pue/Ca= Puebla/*C. aurantium*; QR/Cm= Quintana Roo/*C. macrophylla*, QR/Ca= Quintana Roo/*C. aurantium*.

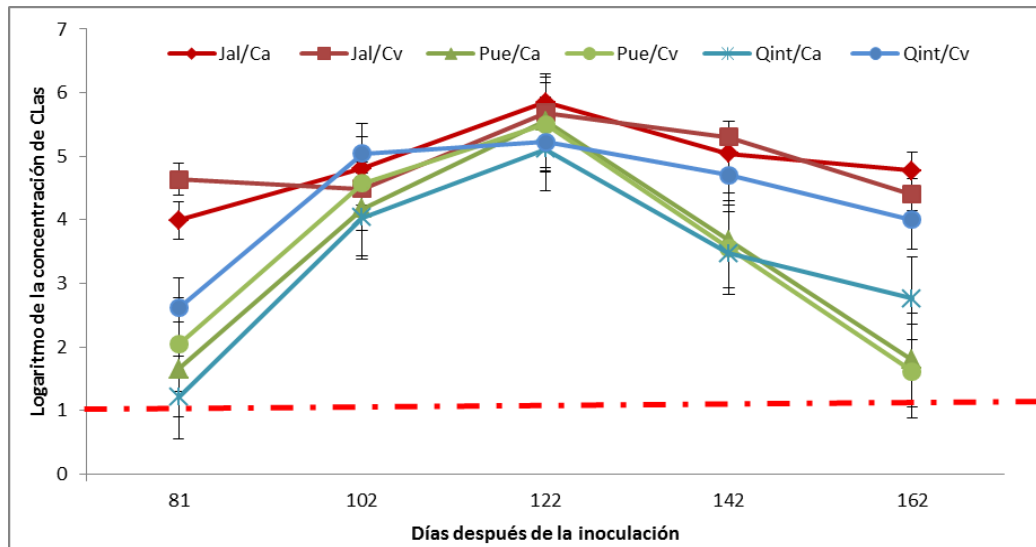


Figura 5.7. Fluctuación temporal de la concentración de CLas, de los tres meses hasta los 6 meses después de la inoculación en naranja dulce y su relación injerto/portainjerto de tres fuentes de inóculo. Jal/Cv=Jalisco/*C. volkameriana*, Jal/Ca=Jalisco/*C. aurantium*; Pue/Cm= Puebla/*C. macrophylla*, Pue/Ca= Puebla/*C. aurantium*; QR/Cm= Quintana Roo/*C. macrophylla*, QR/Ca= Quintana Roo/*C. aurantium*.

5.4.3. Detección de PP2

Como pruebas de estandarización del protocolo para el gen que codifica para la proteína PP2 se utilizaron muestras de Colima y Puebla, de las cuales solo en tres muestras de Colima se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 300 pb (Figura 5.8). Sin embargo, los resultados de la secuenciación arrojaron una similitud del 99 % con *Citrus sinensis* histone-lysine N-methyltransferase (mRNA). Por lo anterior, este objetivo no fue concluido será necesario probar diferentes set de primers y muestras, para lograr amplificar el mRNA que codifica para el gen PP2.



Figura 5.8. Gel de agarosa al 1.5% mostrando fragmentos amplificados de 300 pb aproximadamente de muestras provenientes de Colima con diferentes síntomas. Marcador de peso molecular (MPM), control negativo (-), muestras provenientes de Puebla (P1, P2, P3 y P4), muestras de Colima (C1, C2, C3 y C4).

5.4.4 Análisis histológico

A partir de la hiperplasia inducida por CLas en las células acompañantes del floema, se realizaron mediciones de anchura del floema en todas las muestras procesadas para histología. Las plantas de naranja dulce positivas a CLas, presentaron un incremento en la anchura del floema con respecto al tejido sano (Figuras 5.9 y 5.11). Se observó un efecto

diferencial en la hiperplasia inducida por CLas según la fuente de inóculo. Cabe resaltar que la mayor alteración se observó en el inóculo de Jalisco (Figura 5.9), en las dos combinaciones analizadas, el grado de alteración observado se relación directamente con la expresión de síntomas registrado a nivel de campo (Figura 5.10). Las mayores alteraciones histológicas observadas con el inóculo de Jalisco, independientemente del tipo de patrón, fueron congruentes con la mayor concentración de CLas en el mismo material experimental.

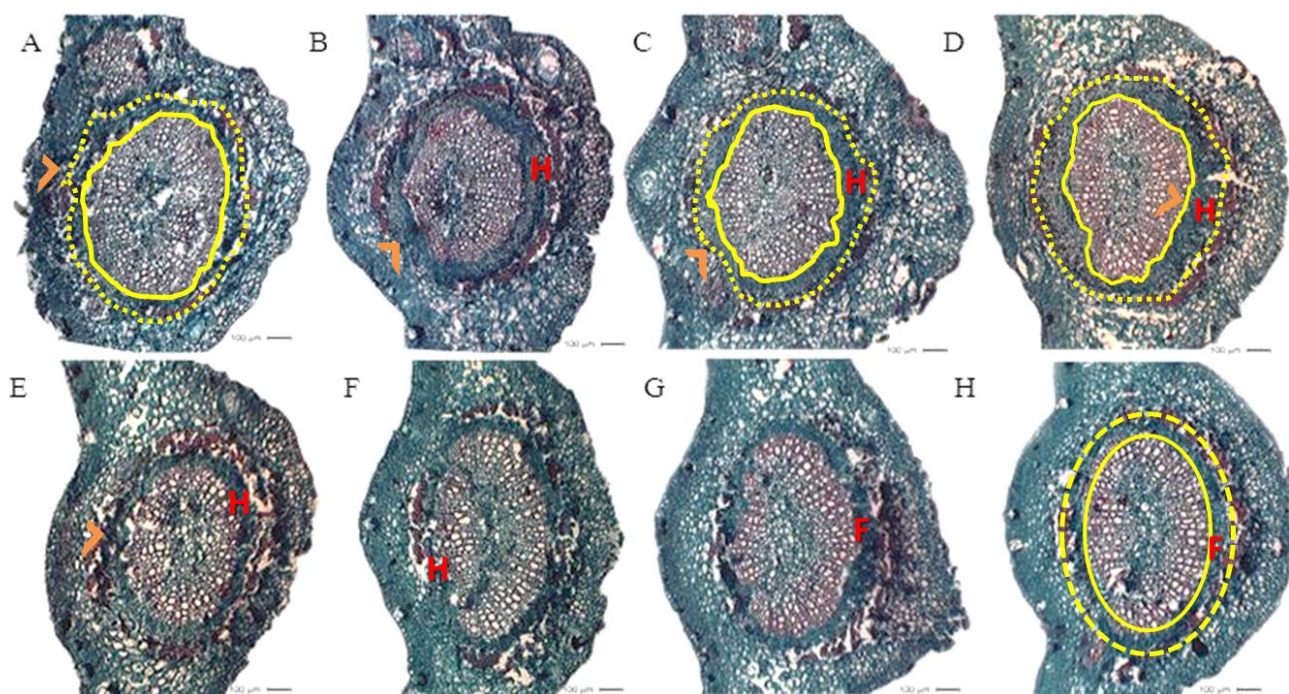


Figura 5.9. Micrografía de cortes transversales en la base de la nervadura principal de hojas de naranja dulce injertado sobre naranjo agrio (A, C, E y G) y Volkameriano (B, D, F y H), respectivamente. A y B) Inóculo Quintana Roo; C y D) Inóculo Jalisco; E y F) Inóculo Puebla; G y H) testigos sanos.

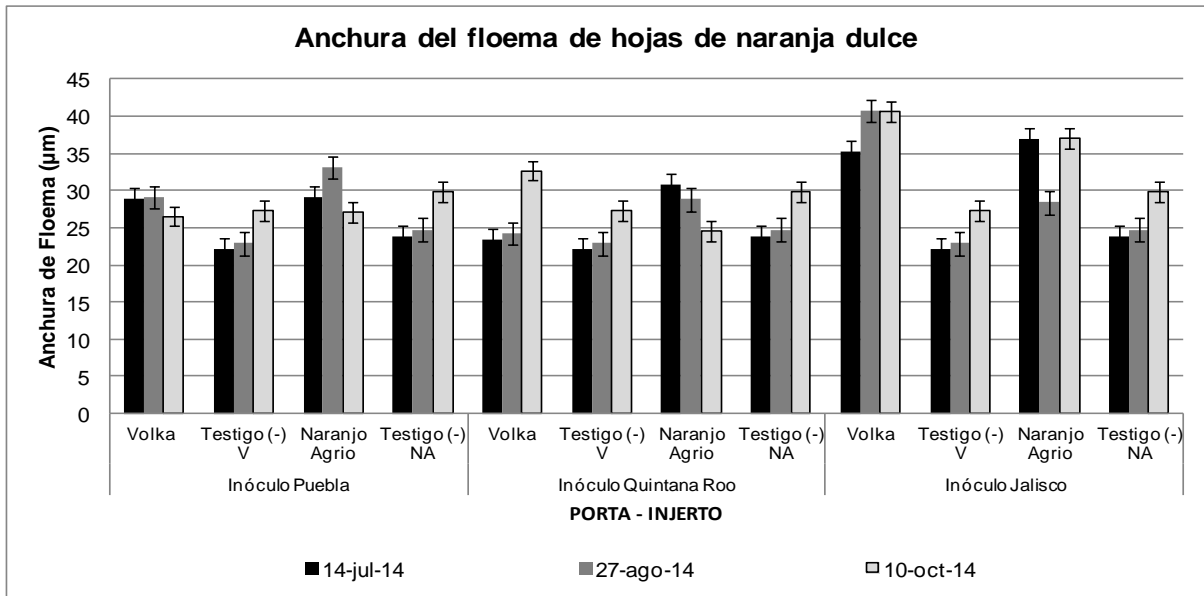


Figura 5.10. Desarrollo en el tiempo del efecto de la anchura del floema (hiperplasia) de la base de la nervadura central de hojas de naranja dulce en relación a tres fuentes de inóculo de CLas.

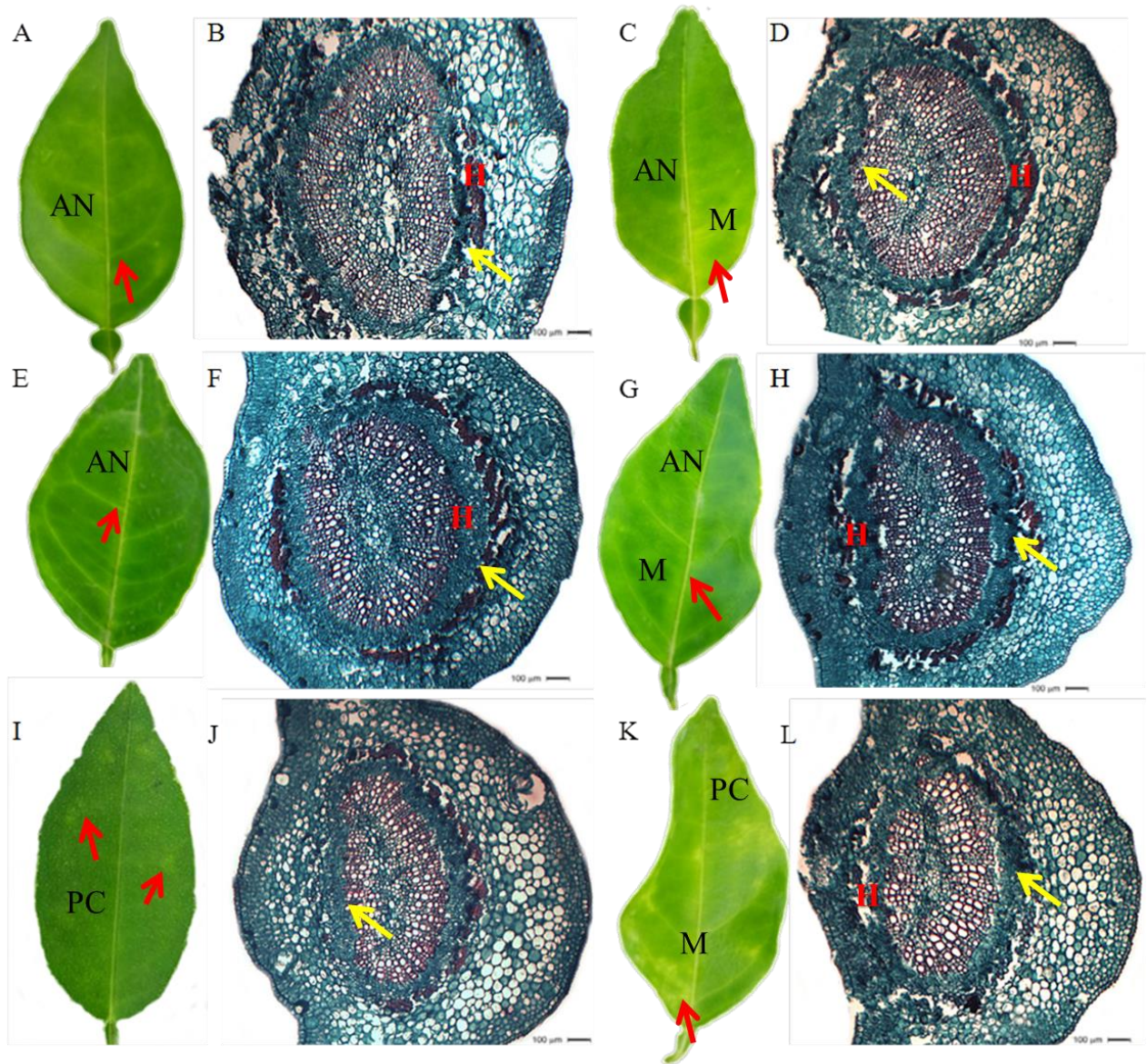


Figura 5.11. Síntomas macro y micro inducidos por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en naranja dulce. Sobre naranjo agrio(A, C, E, F, I y J) y Volkameriano (C, D, G, H, K y L) y Volkameriano, respectivamente. A, B, C y D) Inóculo Quintana Roo; E, F, G y H) Inóculo Jalisco; I, J, K y L) Inóculo Puebla. Las flechas indican síntomas: M=moteado, AN=aclaramiento de nervaduras, PC=punteado clorótico y H=hiperplasia.

Las plantas infectadas con el inóculo proveniente de plantas positivas a CLas y asintomáticas de Puebla presentaron un incremento progresivo en la anchura del floema ($33.5 \pm 2 \mu\text{m}$) a los 83 y 127 ddi con respecto al testigo sano ($23.5 \pm 2 \mu\text{m}$). Sin embargo, a los 171 ddi se registró un decremento del área con hiperplasia en el tejido enfermo y la anchura del floema fue similar al tejido sano (Figura 5.12).

En las plantas infectadas con el inóculo proveniente de Quintana Roo la combinación de *Cs/Ca* presentaron mayor incremento en la anchura del floema ($32 \pm 2 \mu\text{m}$ y $30 \pm 2 \mu\text{m}$) en comparación con los testigos a los 83 y 127 ddi. Pero esta combinación presentó la misma tendencia que para el inóculo proveniente de Puebla a los 171 ddi. La combinación de *Cs/Cv* presentó en la última fecha (171 ddi) esta combinación presentó un incremento en el área del floema en relación a las fechas anteriores siendo diferente a los testigos sanos (Figura 5.13).

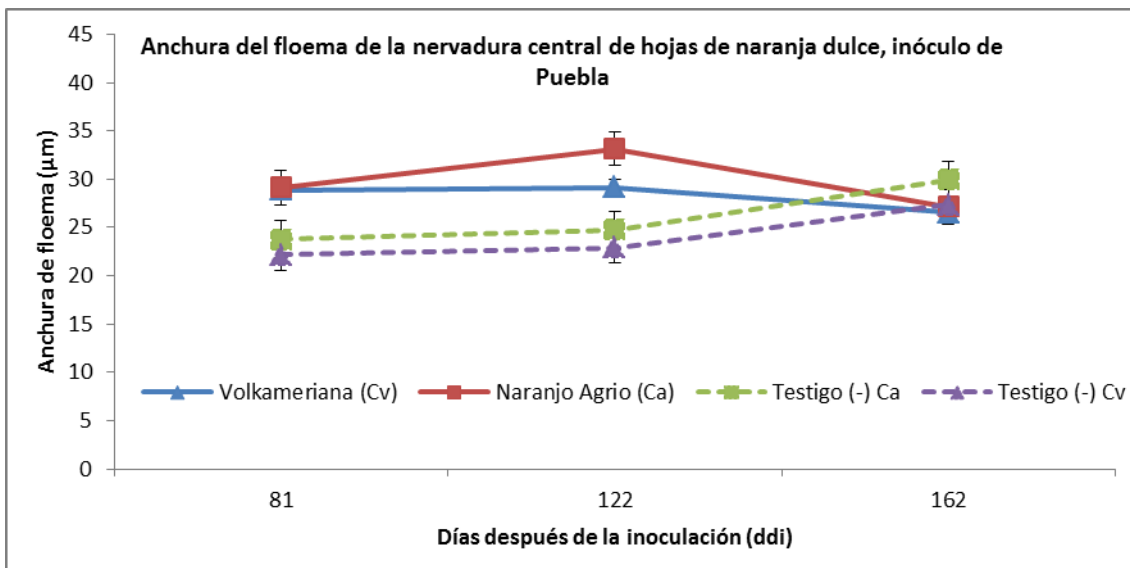


Figura 5.12. Efecto de la hiperplasia en floema de la nervadura central de hojas de naranja dulce inducida por la infección de CLas en relación a la fuente de inóculo proveniente de plantas positivas asintomáticos de Acateno, Puebla.

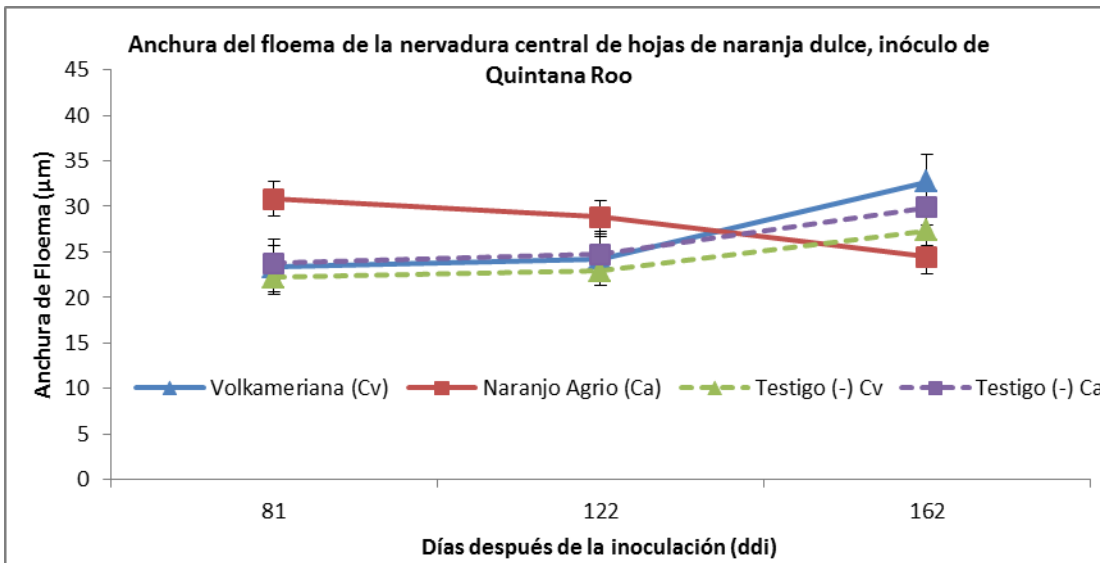


Figura 5.13. Efecto de la hiperplasia en floema de la nervadura central de hojas de naranja dulce inducida por la infección de CLas en relación a la fuente de inóculo proveniente de plantas positivas asintomáticos de, Quintana Roo.

En el caso del inóculo proveniente de Jalisco las plantas se comportaron diferentes a las otras combinaciones siendo claro el efecto de hiperplasia con respecto a los testigos. Presentaron un incremento progresivo en la anchura del floema inducida por la presencia de CLas en los tejidos. La mayor alteración se presentó en naranja dulce sobre volkamerina ($42 \pm 2 \mu\text{m}$) en las últimas dos fechas significativamente diferente con respecto a la combinación de naranja dulce con *C. aurantium*; El tamaño de la anchura del floema en las plantas testigo se mantuvo claramente por debajo de las plantas infectadas (Figura 5.14).

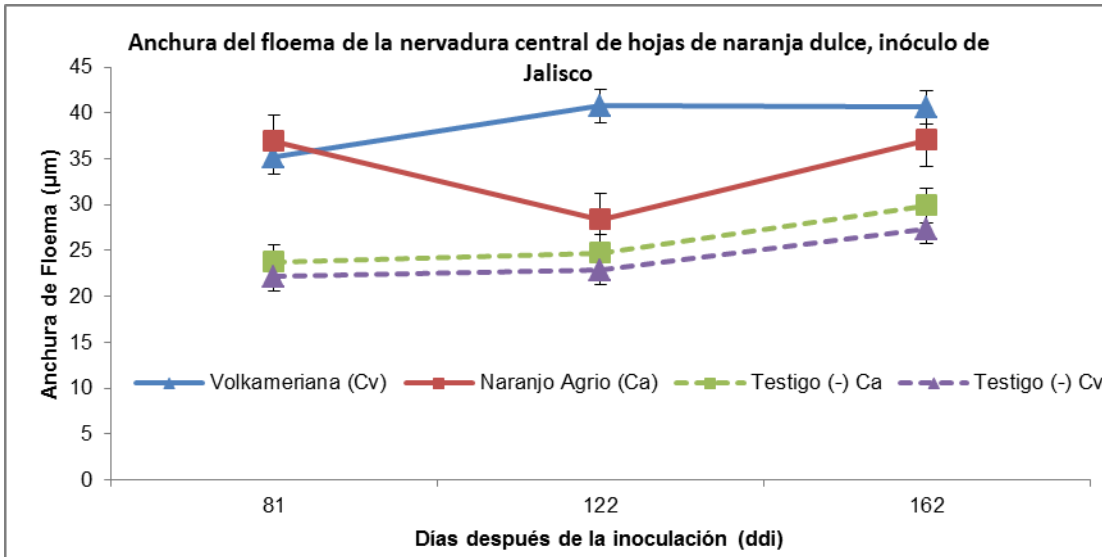


Figura 5.14. Efecto de la hiperplasia en floema de la nervadura central de hojas de naranja dulce inducida por la infección de CLas en relación a la fuente de inóculo proveniente de plantas positivas asintomáticos de, Jalisco.

5.5. Discusión

CLas es una bacteria que infecta sistémicamente las distintas especies de cítricos produciendo síntomas visibles a nivel de hojas y frutos. Este trabajo reporta una nueva condición asintomática en la combinación naranja dulce/naranja agrio. Aparentemente no detectada en otras regiones cítricas del mundo. Considerando que actualmente el naranja agrio no es un patrón de amplio uso comercial a nivel mundial y que el HLB ha tenido efectos epidémicos como Brasil y Florida (Folimonova *et al.*, 2009; Coletta-Filho *et al.*, 2010; Albrecht y Bowman, 2011), este trabajo se enfocó a probar el efecto de patrón en la condición asintomática para lo cual se comparó con *C. volkameriana*, un patrón de amplio uso en la citricultura. Probar esto implicó también evaluar el efecto del inóculo por lo que se seleccionaron plantas de naranja dulce positivas y sintomáticas visualmente proveniente de Quintana Roo y Jalisco, regiones con un antecedente epidémico bajo y moderado

respectivamente (Mora *et al.*, 2014). Quintana Roo fue también la región donde se detectó por primera vez a CLas en México en 2009.

Aunque el cien por ciento de las plantas de ambas combinaciones *Cs/Ca* y *Cs/Cv* se infectaron por CLAS a los 102 ddi y algunas fueron positivas a CLas desde los 81 ddi de las tres fuentes de inóculo. Una observación que contradice las tasas de infección reportadas por Coletta-Filho y colaboradores (2010). Aunque, las plantas se detectaron como positivas la mayoría de estas seguían siendo asintomáticas.

Algunas plantas se mantuvieron asintomáticas. Esta condición, hasta el periodo de evaluación del experimento, se observó independientemente de la fuente de inóculo y tipo de patrón. Sin embargo, todas las plantas de *Cs/Ca* y el 75 % de la combinación *Cs/Cv* fueron asintomáticas hasta los 162 ddi con el inóculo proveniente de Puebla. La condición asintomática fue menor en las combinaciones con la fuente de inóculo proveniente de Jalisco para ambas combinaciones (20 %). Los síntomas presentaron variaciones en cuanto a la fuente de inóculo. La mayor expresión sintomática se observó en el inóculo de Jalisco en su combinación con *C. volkameriana* y en su combinación con naranjo agrio solo se observó aclaramiento de nervaduras.

Estos datos sugieren un efecto de interacción del patrón con la fuente de inóculo, siendo la combinación naranjo agrio con el inóculo proveniente de Puebla la menos inductiva a la expresión de síntomas. El análisis a nivel de concentración del inóculo y de hiperplasia verificó claramente que estas variables tuvieron sus valores más altos con el inóculo procedente de Jalisco. En este caso la concentración bacteriana fue similar en ambas combinaciones sin embargo a nivel histológico el daño fue mayor en la combinación *Cs/Cv*.

Interesantemente, el inóculo procedente de Quintana Roo y Puebla fueron similares es estas variables, aunque la condición asintomática fue mayor para el segundo.

Aunque la fase de multiplicación de CLas no se puede determinar en las plantas ya que las bacterias en fase de crecimiento logarítmico pueden albergar múltiples copias de su genoma, el crecimiento de la colonia bacteriana en planta para este experimento sugiere una acumulación temporal de bacterias en el tejido de naranja dulce. Sin embargo, la estrategia de análisis de cuantificación bacteriana mediante un muestreo repetitivo en la misma planta a través del tiempo, se consideró adecuado. Durante los primeros cien días después de la inoculación, se observaron síntomas asociados con el HLB en los árboles infectados con los más altos valores de Ct, correspondiente a una concentración de CLas de 1.5×10^5 copias por μl de ADN. Los síntomas de HLB son la aparición de punteados cloróticos seguidos de moteados difusos (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Estos síntomas se observaron por primera vez a los 120 días después de la inoculación.

En este estudio, se demostró que CLas se puede transmitir fácilmente a nuevas plantas de cítricos mediante el injerto de varetas infectadas pero asintomáticas, y que dependiendo de la combinación con el patrón se pueden observar síntomas a partir de los 103 días después de la inoculación.

Estos resultados sugieren que CLas está expresando su variabilidad, previamente reportada en México (Alanís *et al.*, 2013) a nivel sintomatológico visual e histológico. El efecto del ambiente no se descarta dado que la fisiología de los cítricos de Puebla, una condición más húmeda y de menor estrés que los de la península, puede coadyuvar a la expresión asintomática. Sin embargo, puede explicar los niveles epidémicos de baja

intensidad en Yucatán y Quintana Roo (Mora *et al.*, 2014) y donde la condición asintomática también pudiera existir en campo.

5.6. Conclusiones

Las evidencias en condiciones controladas de invernadero, y con base en cuantificación de CLas, cambios histológicos y expresión de síntomas, sugieren un efecto diferencial en la combinación de los patrones *Citrus aurantium* (Ca) y *C. volkamerina* (Cv) con *C. sinensis* (Cs) de los inóculos provenientes de Jalisco, Quintana Roo y Puebla. La combinación de Cs/Ca, la cual simula la condición de campo de los árboles asintomáticos de Acateno, tuvo una concentración bacteriana menor en plantas con inóculo de Puebla.

En general, para este ensayo, se observó menor expresión de síntomas en naranjo agrio en relación a las tres fuentes de inóculo analizadas. La combinación de naranja dulce con este patrón se puede asociar con cierta tolerancia a CLas con relación a títulos altos de la bacteria. Sin embargo, los intentos de probar la expresión de ciertas proteínas asociadas a este proceso resultaron inconclusos. Estas evidencias sugieren que existe un efecto del portainjerto en la expresión de síntomas, pero además una menor agresividad del aislado de Puebla, por lo menos con respecto a las fuentes de inóculo alternativas evaluadas.

5.7. Literatura Citada

- Albrecht, U. and Bowman, K.D. 2008. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science* 175: 291–306.
- Albrecht, U., and Bowman, K.D. 2011. Tolerance of the trifoliate citrus hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *Hortscience* 46(1): 16-22.
- Coletta-Filho, H. D., Carlos, E. F., Alves, K. C. S., Pereira, M. A. R., Boscariol-Camargo, R. L., de Souza, A. A. and Machado, M. A. 2010. In plant multiplication and graft transmission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by Real-Time PCR. *European Journal of Plant Pathology* 126:53–60.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Esquivel-Chávez F., Valdovinos-Ponce G., Mora-Aguilera G., Gómez-Jaimes R., Velázquez-Monreal J. J., Manzanilla-Ramírez M. Á., Flores-Sánchez J. L., López-Arroyo J. I. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782.
- 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.
- Folimonova S.Y., C. J. Robertson, S. M. Gamsey, S. Gowda, and W.O. Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99:1346-1354.
- Freitas-Astúa J., E. C. Locali, R. Antoniollo, V. Rodríguez, E. W. Kitajima, and M. A. Machado. 2003. Detection of Citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. *Virus Review Research* 8:190-196.

- Li W., J. S. Hartung, and L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66:104-115.
- López C., L., G. J. Márquez, y S. G. Murguía. 2005. Técnicas para el Estudio del Desarrollo en Angiospermas. Editorial Las Prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM. 178 p.
- 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. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32(2): 106-119.
- Salcedo B, D., Hinojosa, R., Mora, A. G., Covarrubias, G. I., DePaolis, F., Cíntora, G. C., y Mora, F. S. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p.
- Stover E., K. Bowman, G. McCollum, R. Niedz, R. Shatters, Jr. and D. Hall. 2001. Breeding citrus for HLB resistance at the USDA/ARS, U. S. Horticultural Research Laboratory, 34-45 pp.
- Velázquez-Monreal J. J., Manzanilla-Ramírez M. A., Manzo-Sánchez G., Robles-González M. M., Orozco-Santos M., Carrillo-Medrano S. H. 2012. Reacción del limón mexicano a *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediante inoculación por injerto. In: *Memorias de congreso Nacional de Fitopatología*. Nuevo Vallarta, Nay. Méx. 171 pp.

6. Conclusiones Generales

Las evidencias en condiciones controladas de invernadero, y con base en cuantificación de CLas, cambios histológicos y expresión de síntomas, sugieren un efecto diferencial en la combinación de los patrones *Ca*, *Cv* y *Cm* con los tres cítricos analizados independientemente de la fuente de inóculo. Los patrones son un factor que influye en la variación de la expresión de síntomas y de las diferencias en la concentración de CLas en limón mexicano.

Fase 1. *Nd/Cv* tuvo consistentemente la concentración más baja en un promedio del 57% y 28% con respecto a *Lm/Cm* y *Lp/Cm*, respectivamente. Histológicamente, en *Lm/Cm* la anchura de floema presentó el mayor incremento ($93.5\pm 2\mu\text{m}$) respecto a la combinación de *Nd/Cv* ($82.5\pm 2\mu\text{m}$) a los 32mdi, aunque no hubo diferencia estadística.

Fase 2. La combinación *Lm/Ca* se asoció con cierta tolerancia a CLas debido a que tuvo los títulos más altos de la bacteria ($P=0.001$) en cinco de nueve fechas pero una menor expresión de síntomas severos.

Este trabajo también es el primero que revisa naranjo agrio como patrón de *Lm*, en el que se detectó, moderada severidad de síntomas ($<30\%$) respecto a una alta concentración (1.99×10^5 copias/ μl) de CLas, estos resultados pueden explicar por qué las epidemias en regiones de México han sido de baja intensidad en combinaciones de naranjo dulce sobre agrio y expresión asintomáticas en otros casos.

A nivel histológico la anchura promedio del floema fue menor en *Lm/Ca* ($74\pm 2\mu\text{m}$) con respecto a *Lm/Cv* $80\pm 2\mu\text{m}$ y *Lm/Cm* $84\pm 2\mu\text{m}$, aunque no hubo diferencias estadísticas. En *Lm/Ca* el promedio de hiperplasia fue similar en las regiones proximal y distal de las ramas

(76 ± 2 μm), en contraste con las otras combinaciones de *Lm/Cv* y *Lm/Cm* donde el incremento de la hiperplasia fue mayor en la sección proximal (82 ± 2 μm), lo que sugiere un efecto histológico restrictivo de movilidad del inóculo.

Fase 3. La combinación *Nd/Ca* se asoció con cierta tolerancia a CLAs debido a títulos altos de la bacteria (1.1×10^6 copias CLAs/ μl a los 4 mdi) con nula expresión de síntomas (CLAs-P) o baja expresión de síntomas en CLAs-J y CLAs-Q (<25%).

En general, las evidencias experimentales de este trabajo demuestran que existe un efecto del portainjerto en la expresión de síntomas, pero además una agresividad de CLAs en términos histológicos y multiplicativos dependiendo de la fuente de inóculo, siendo CLAs-J el más agresivo. La secuenciación molecular de muestras iniciales y finales del experimento 2 confirmó la invariabilidad de la fuente de inóculo provenientes de Colima (Número de accesión registrada en GenBank: KU159087 publicada el 10 mayo 2016).

Anexos

Anexo 1

Protocolo de PCR Tiempo Real tipo Cuantitativo (CLas)

Tejido vegetal

1. Desinfectar la campana de qPCR con RNASE-away, hipoclorito de sodio 1.5%, etanol 70% y someter material de ensayo (Micropipetas, rack de Tubos de PCR, Rack para placas, puntas, apresor de tubos, etc.) a luz ultravioleta durante 25 minutos previos a la preparación de mix.
2. Descongelar los reactivos sobre hielo o en el refrigerador de 4°C (colocando los reactivos dentro de una gradilla o caja de **preferencia para uso exclusivo**)

La preparación de la sonda y los primers se debe de realizar dentro de la campana de qPCR con el fin de evitar contaminaciones.

 - a) **Sonda:** Tomar 10ul de stock de sonda y adicionar 990ul de H₂O libre de nucleasas, colocarlos en un tubo de 1.5 ml cubierto con papel aluminio (para evitar el contacto de la luz y se degrade la sonda). Mezclar por pipeteo y marcar en la tapa o un costado como **SONDA -----** con un marcador indeleble.
 - b) **Primers:** Tomar 20ul de stock del primer Forward (HLB as) y adicionar 980ul de H₂O para libre de nucleasas, colocar en un tubo de 1.5 ml, mezclar por pipeteo. etiquetar en la tapa o a un costado con el nombre del primers. repetir el procedimiento con el primer Reverse.
3. Calcular la cantidad de reactivos necesarios con base al número de muestras a procesar; no olvidar contemplar las 12 reacciones extra necesarias para la curva estándar y 4 más empleadas en los controles positivos que se deben de agregar en cada corrida. Ej. para una placa de 48 (dos controles negativos y dos controles positivos requeridos en el ensayo, 32 muestras problema y 12 reacciones requeridas para las dos repeticiones de cada punto de la curva estandar).

Reactivo	1x	49x
Bio-Rad Universal Master Mix	10 µL	490
HLBas	2.5µL	122.5
HLBp	2.5 µL	122.5
Sonda	4 µL	196
Total	19 µL	931
ADN	1 µL	

4. Para ensayos de PCR cuantitativo se deberán preparar 5 diluciones seriadas 1:10 para utilizarse como puntos de referencia en la curva estándar: Tomar muestra inicial (clona con concentración 0.005ng/ul determinada de inserto de CLas con **1109500 copias/uL**) obteniendo 6 puntos de referencia para la curva estándar

Dilución	Concentración (copias /ul)
D0 (0.005 ng/ul)	1109500
D1	110950
D2	11095
D3	1109.5
D4	110.95
D5	11.95

5. Preparar la mezcla de reacción en tubos de 1.5mL cubiertos con papel aluminio para evitar contacto de la sonda a la luz. Asegurarse de mezclar adecuadamente la solución, pipeteando consecutivamente hasta que se homogenice. El orden de preparación es el siguiente:

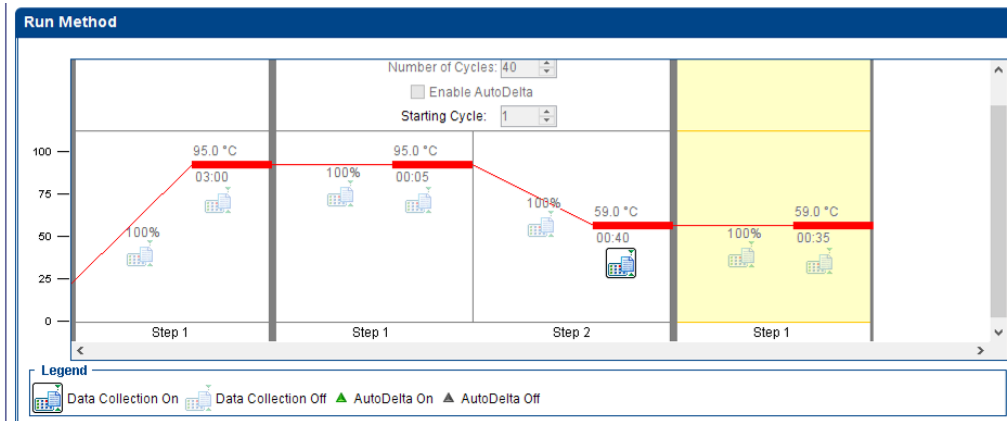
- i. Bio-Rad Universal SuperMix
- ii. HLBp
- iii. HLBas
- iv. Sonda

4. Una vez preparada la reacción, dejarla reposar en hielo mientras se acomoda la placa de 48 pozos (AppliedBiosystems) teniendo cuidado de **NO** tocar el fondo de los tubos o la placa, ya que puede afectar la lectura emitida por el termociclador.
5. Repartir 19uL de la mezcla de reacción en cada pozo, asegurándose de que la misma llegue al fondo del tubo. Una vez completado, verificar que no haya burbujas de aire en el fondo, en evento que hubiese dar un ligero golpe al borde del rack para que las mismas disipen.
6. Agregar 1uL de muestra de ADN del pozo A3-E2 (dos primeros pozos son controles negativos) y los pozos E3-E4 los controles positivos.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N HLB Ct: Undete	N HLB Ct: Undete	U HLB 3.89E4	U HLB 139.18	U HLB 1.09E5	U HLB 143.82	U HLB 61.24	U HLB 4.61E5
B	U HLB 2.36E5	U HLB 270.23	U HLB 8.86E3	U HLB 148.27	U HLB 1.58E5	U HLB 163.65	U HLB 133.38	U HLB 104.6
C	U HLB 55.41	U HLB 166.03	U HLB 284.15	U HLB 336.49	U HLB 170.5	U HLB 336.82	U HLB 63.11	U HLB 124.1
D	U HLB 6.27E4	U HLB 406.33	U HLB 226.95	U HLB 226.07	U HLB 95.3	U HLB 363.33	U HLB 165.13	U HLB 224.32
E	U HLB 402.09	U HLB 212.63	U HLB 1.88E4	U HLB 1.8E4	S HLB 1.11E6	S HLB 1.11E6	S HLB 1.11E6	S HLB 1.11E6
F	S HLB 1.11E4	S HLB 1.11E4	S HLB 1.11E3	S HLB 1.11E3	S HLB 110.95	S HLB 110.95	S HLB 11.1	S HLB 11.1

Wells: U 34 Unknown S 12 Standard N 2 Negative Control 0 Empty

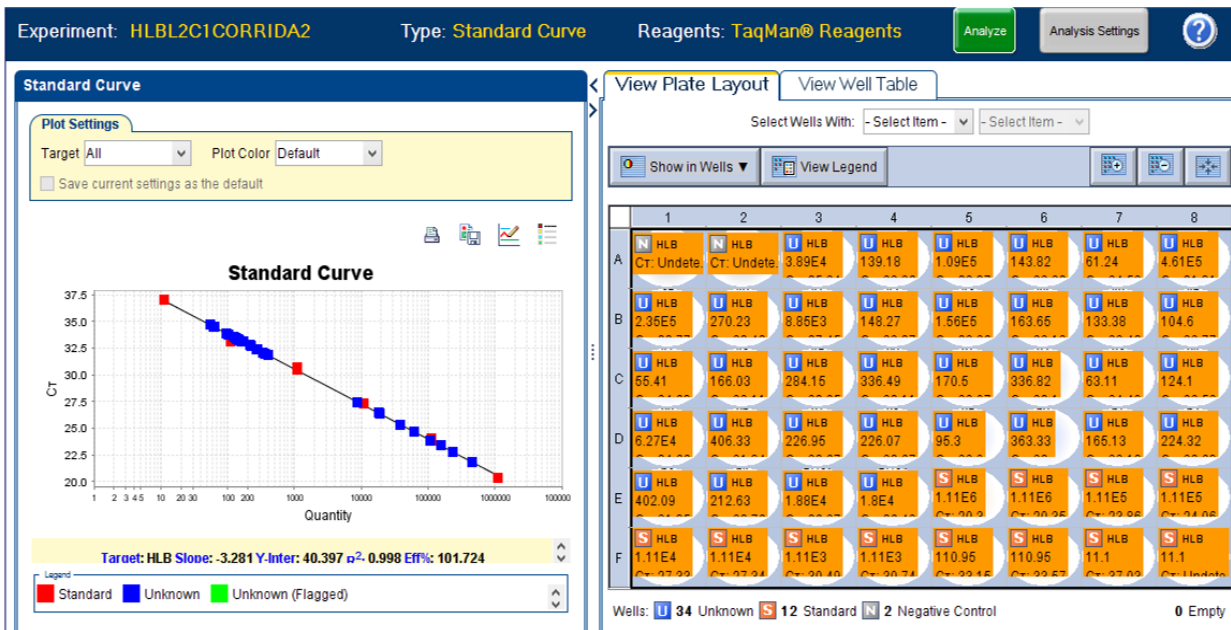
7. Agregar 1uL de las diluciones D0-D5 con su respectiva repetición, las cuales ocupan del pozos E5-F8 (El orden de las diluciones debe ser de manera descendiente, por lo que la dilución de menor concentración siempre deberá ser la última, al igual, es imperativo que se respete el orden de factor y las repeticiones sean adyacentes)
8. Cubrir las muestras utilizando tiras de tapas (FastOpticalAppliedBiosystems) teniendo nuevamente cuidado de no tocar las tapas directamente ajustar la tapa utilizando los apresores, para evitar contaminación. evitar movimientos bruscos para no salpicar la tapa



9. Programa de termociclaje para CLas

10.- Seleccionar la opción de Starrun. Automáticamente aparecerá la opción de donde desea guardar el ensayo y una vez completado iniciara la corrida.

11.- Análisis de resultados.



Anexo 2

Protocolo análisis histológico

1. **Fijación.** Las muestras se someten en una mezcla de formaldehído, ácido acético glacial y alcohol etílico al 96% (FAA) durante 48 horas (en este paso, las muestras pueden mantenerse un lapso de tiempo indefinido).
2. **Lavado.** Las muestras se lavaron con agua de la llave durante 30 minutos.
3. **Deshidratación.** En este procedimiento se someten las muestras en una serie gradual de alcohol etílico (50, 70, 85, 96 y 100%) durante 3 horas en cada cambio. Posteriormente se retira el alcohol y se adiciona a las muestras una mezcla de alcohol absoluto: xilol 100% en proporción 1:1 y en dos cambios de xilol al 100% con intervalos de 1.5 horas en cada uno de los cambios.
4. **Inclusión.** Se someten las muestras en parafina, realizando tres cambios de paraplast. El primero en una mezcla de xilol:paraplast (1:1), el segundo en una mezcla xilol:paraplast (1:2), con intervalos de 1.5 horas en cada uno de los cambios y el tercero en paraplast al 100%, durante 48 horas.
5. **Montaje de los cubos de parafina.** Se introducen las muestras en cajitas de papel con paraplast (retirando el exceso de aire de la muestra con ayuda de una aguja de disección caliente) (Figura 1), con el fin de dar soporte a la muestra y poder realizar los cortes. Se dejan solidificar toda la noche y posteriormente se montan en bloques de madera de 1 cm² aproximadamente (Figura 2).



Figura 1. Muestras incluidas en paraplast.

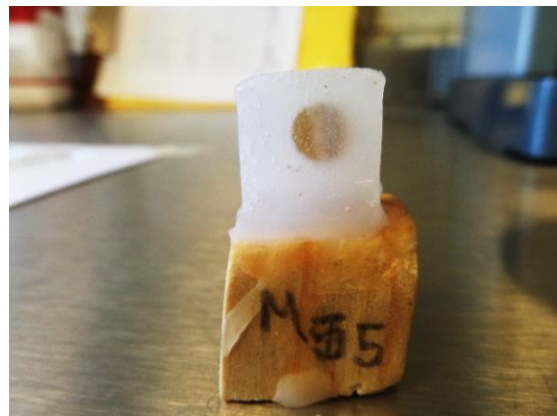


Figura 2. Muestra montada en un bloque de madera.

6. **Cortes.** Con ayuda de un microtomo rotatorio se realizan cortes transversales de 10 μ m de grosor a las muestras seleccionadas (Figura 3).
7. **Montaje de los cortes en el portaobjetos.** Se colocan los cortes en un baño de flotación con una pizca de grenetina a una temperatura de 45 a 50°C (Figura 4), para facilitar el montaje en el portaobjetos (laminillas). Cabe mencionar que de cada muestra se obtienen 5 laminillas.



Figura 3. Microtomo rotatorio.



Figura 4. Cortes en el baño de flotación.

8. **Desparafinación.** Los cortes ya montados se meten en una estufa a 40°C durante dos horas para ser sometidas en tres cambios de xilol absoluto durante 3 minutos cada cambio, esto con el fin de retirar el exceso de parafina, enseguida se hidratan en alcohol etílico al 100 y 96 % durante 3 minutos cada cambio.
9. **Tinción safranina.** Se colocan los cortes en un colorante a base de safranina/OH 96% por 24 horas. Este colorante tiñe células compuestas de lignina. Una vez pasado el tiempo, se enjuagan los cortes con agua común por 1 hora, esto con el fin de retirar el exceso del colorante.
10. **Tinción y Sellado.** Se procede a la tinción con verde rápido, con el fin de teñir las células que contienen celulosa, posteriormente el sellado permanente en resina sintética del total de muestras.

Las observaciones se realizan en un microscopio compuesto con cámara digital para microscopía.