



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**  
POSTGRADO EN FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

**ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y  
EPIDEMIOLOGICO DEL LIMÓN MEXICANO Y  
LIMÓN PERSA ASOCIADOS A SÍNTOMAS DEL  
HLB (Huanglongbing)**

**FABIOLA ESQUIVEL CHÁVEZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

**2011**



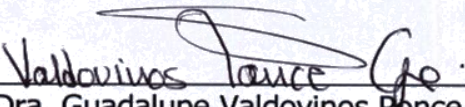
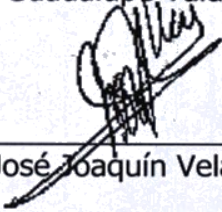
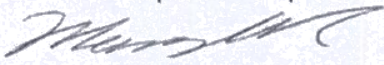
La presente tesis, titulada: **Análisis histológico y epidemiológico del limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing)**, realizada por la alumna: **FABIOLA ESQUIVEL CHÁVEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO	 _____ Dr. Gustavo Mora Aguilera
ASESOR	 _____ Dr. Rafael Gómez Jaimes
ASESOR	 _____ Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce
ASESOR	 _____ Dr. José Joaquín Velázquez Monreal
ASESOR	 _____ M.C. Miguel Ángel Manzanilla Ramírez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre de 2011

## **AGRADECIMIENTOS**

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

A mi comité particular: A la Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, al Dr. Gustavo Mora Aguilera, Dr. Rafael Gómez Jaimes, Dr. José Joaquín Velázquez Monreal, M.C. Miguel Ángel Manzanilla Ramírez, por el apoyo, esfuerzo, dedicación, consejos y por todas las horas que me brindaron para la conclusión de mi investigación.

A todos y cada uno de los docentes e investigadores del Colegio de Posgraduados por los conocimientos y experiencias que compartieron conmigo.

A la institución financiadora del proyecto FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591.

A los Comités Estatales de Nayarit, Colima y Yucatán por el apoyo logístico brindado.

A todos los miembros del GIIC por su apoyo en la planeación.

## RESUMEN

A partir de julio 2010 se iniciaron estudios para caracterizar los procesos histológicos asociados a síntomas de HLB en limón persa (Lp), limón mexicano (Lm) y naranja dulce (Nd) con el propósito de asociar cambios anatómicos con la expresión del síntoma foliar. En tres huertos de Nayarit, Colima y Yucatán, se seleccionaron árboles sintomáticos y asintomáticos, marcando un brote por árbol, para su evaluación mensual durante seis meses. Así mismo, en el mismo periodo, huertos bajo diferentes condiciones de manejo agronómico, ubicados en Colima (1 Lm) y Nayarit (3 Lp), fueron evaluados con respecto a incidencia y severidad del HLB a intervalos de 20 días. Los resultados a nivel celular se analizaron por parcelas subdivididas con las variables: área y anchura del floema, área del sistema vascular y área con almidón y proteínas. En Lm, los síntomas de HLB se presentaron con mayor rapidez y generalización que en Lp y Nd, los cuales progresaron desde un punteado clorótico hasta amarillamiento y abscisión foliar. Adicionalmente, presentó mayor concentración de almidón en mesófilo ( $2519.1 \mu\text{m}^2$ ). Las hojas asintomáticas también exhibieron almidón pero en menor concentración. En Nd la mayor concentración fue en parénquima empalizada pero en menor cantidad que Lp y Lm ( $988.2 \mu\text{m}^2$ ). El área de floema en nervadura central de hojas sintomáticas mostró un aumento en el número de estratos ocasionando hiperplasia en Lm, Lp y Nd (Tukey,  $p=0.05$ ). Lp y Nd presentaron un incremento en tiempo en área del floema en tejido sintomático y asintomático. En Lm el incremento fue solo en sintomático ( $556366 \mu\text{m}^2$ ) manteniéndose aproximadamente constante en tejido sano ( $8720 \mu\text{m}^2$ ). Adicionalmente, en floema de hojas sintomáticas y asintomáticas de Lm, Lp y Nd se detectó la acumulación de proteínas, siendo estadísticamente contrastante entre síntomas pero no entre cítricos (Tukey,  $p=0.05$ ). Los índices de variables en la relación asintomático: sintomático indicaron diferencias entre cítricos. Lm (1:63.8, área del floema, 1:2.5, anchura del floema y

1:1.9, acumulación de almidón) es más susceptible a CLas que Lp y Nd. El comportamiento epidemiológico intenso de la enfermedad en Lm ( $Y_f=100\%$ ) con respecto al Lp ( $Y_f=48\%$ ) es congruente con los fuertes cambios anatómicos inducidos por CLas en Lm.

**Palabras clave:** cítricos agrios, colapso, carbohidratos, P-proteína, epidemia.

## I. Contenido

I.	INTRODUCCIÓN .....	12
II.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	14
	Producción de cítricos en México .....	14
	Enfermedades en cítricos.....	15
	Alteraciones histológicas ocasionadas por diferentes enfermedades en cítricos .....	16
	Antecedentes del Huanglongbing (HLB).....	18
	Anatomía y fisiología de la hoja de los cítricos .....	19
	Hoja .....	20
	Fisiología.....	23
	Movilidad y traslocación.....	23
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
	Muestreo de material vegetal.....	25
	Análisis histológico .....	25
	Pruebas histoquímicas .....	27
	Análisis estadístico .....	28
	Selección de huertas para el estudio epidemiológico.....	28
	Análisis del estudio epidemiológico.....	29
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
	Síntomas.....	30
	Estructura foliar.....	33
	Lamina foliar.....	33
	Nervadura central de la hoja.....	33
	Histoquímica foliar .....	38
	Lámina foliar.....	38
	Proteínas.....	39
	Análisis epidemiológico.....	41
V.	CONCLUSIONES .....	47
VI.	LITERATURA CITADA.....	49

VII. ANEXOS..... 54

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Síntomas visuales y alteraciones histológicas de los principales patógenos que afectan a los cítricos.....	17
<b>Cuadro 2.</b> Efecto de Clas en hiperplasia, estimada con área de floema de nervadura central de hojas, en seis evaluaciones mensuales de brotes marcados de limón mexicano, limón persa y naranja dulces asintomático y sintomático.....	35
<b>Cuadro 3.</b> Incidencia acumulada de agosto 2010 a enero 2011 de árboles con síntomas de HLB en tres huertos comerciales de limón persa y uno de limón mexicano en Nayarit y Colima, respectivamente.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Cuadro 4.</b> Severidad acumulada del HLB de agosto 2010 a enero 2011 evaluada a nivel de árbol en tres huertos comerciales de limón persa en Nayarit.....	43



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Síntomas inducidos por CLas en limón mexicano en hojas procedentes de ramas marcadas al inicio de la aparición de síntomas visuales en un huerto comercial de Tecomán, Colima. A) Punteado clorótico (en círculo) en Agosto 2010; B) Manchas angulares asimétricas en septiembre; C) Moteado difuso en octubre; D) Aclaramiento de nervaduras en noviembre); E) Acorchado de las nervaduras en diciembre); F) Amarillamiento en enero.....31

**Figura 2.** Síntomas inducidos por CLas en limón persa en hojas procedentes de ramas marcadas al inicio de la aparición de síntomas visuales en un huerto comercial de Ahuacatlán, Nayarit. A) Punteado clorótico en Agosto 2010; B) Manchas angulares asimétricas en septiembre; C) Moteado difuso en octubre; D) Aclaramiento de nervaduras en noviembre; E) Acorchado de las nervaduras en diciembre; F) Amarillamiento en enero.....32

**Figura 3.** Síntomas inducidos por CLas en naranja dulce en hojas procedentes de ramas marcadas en Yucatán, México. A) Moteado difuso en noviembre 2010; B) Aclaramiento de nervaduras en diciembre; C) Manchas angulares asimétricas en enero. ....33

**Figura 4.** Síntomas de HLB y micrografías de cortes transversales de la nervadura central de hojas de limón mexicano (Lm), persa (Lp) y naranja dulce (Nd) al quinto mes de la detección de síntomas en brotes de campo. A, D y G) Intensidad de síntomas al quinto mes de su aparición en brotes de Lm, Lp y Nd, respectivamente. B, E y H) Nervadura central de hoja sintomática con hiperplasia en el floema de Lm, Lp y Nd, respectivamente. C, F y I) Nervadura central de hoja asintomática de Lm, Lp y Nd, respectivamente. Las flechas señalan al sistema vascular (SV), hiperplasia (H), floema (F). Escala en micrografías 100µm.....36

**Figura 5.** Progreso temporal del área del sistema vascular (A), área del floema (B) y anchura del floema (C) en hojas de brotes sintomáticos con HLB y asintomáticos de limón mexicano, persa y naranja dulce. Progresiones sintomáticas y asintomáticas dentro de cada cítrico con al menos una misma letra en común son estadísticamente iguales (Tukey,  $p=0.05$ ). .....37

**Figura 6.** Progreso temporal del área del mesófilo con acumulación de almidón en hojas de brotes sintomáticos con HLB y asintomáticos de limón mexicano, limón persa y naranja dulce. Progresiones sintomáticas y asintomáticas dentro de cada cítrico con al menos una misma letra en común son estadísticamente iguales (Tukey,  $p=0.05$ ). .....39

**Figura 7.** Micrografías de microscopía de luz de cortes transversales de hojas de limón mexicano (Lm), persa (Lp) y naranja dulce (Nd) al quinto mes de la detección de síntomas en campo. A, C y E) Hoja asintomática de Lm, Lp y Nd, respectivamente. B, D y F) Hoja sintomática de Lm, Lp y Nd, respectivamente. Las flechas y letras señalan la ubicación del parénquima empalizada (PE) y parénquima esponjoso (PES). El color oscuro en celular indica acumulación de almidón. ....40

**Figura 8.** Área del floema con acumulación de proteínas en hojas de limón mexicano, limón persa y naranja dulce al sexto mes de la detección de síntomas en brotes de campo. En cada cítrico, barras con al menos una letra en común son iguales (Tukey,  $p=0.5$ ). .....41

**Figura 9.** Incidencia acumulada de agosto 2010 a enero 2011 de árboles con síntomas de HLB en tres huertos comerciales de limón persa, bajo manejos agronómicos contrastantes. Ahuacatlán, Nayarit. ....44

**Figura 10.** Mapa tridimensional de dispersión geoestadísticamente interpolada de la severidad del HLB a nivel de un huerto con manejo altamente tecnificado de limón persa. Ahuacatlán,

Nayarit. A) Incidencia inicial del 11% correspondiente a agosto 2010. B) Incidencia final del 18% correspondiente a enero 2011. Las flechas indican la severidad en el foco (s) más intenso. 44

**Figura 11.** Mapa tridimensional de dispersión geoestadísticamente interpolada de la severidad del HLB a nivel de un huerto con manejo medianamente tecnificado de limón persa. Ahuacatlán, Nayarit. A) Incidencia inicial del 7% correspondiente a agosto 2010. B) Incidencia final del 85% correspondiente a enero 2011. Las flechas indican la severidad en el foco (s) más intenso.....45

**Figura 12.** Mapa tridimensional de dispersión geoestadísticamente interpolada de la severidad del HLB a nivel de un huerto con manejo convencional de limón persa en Ahuacatlán, Nayarit. A) Incidencia inicial 15% correspondiente a agosto 2010. B) Incidencia final 34% correspondiente a enero 2011. Las flechas indican la severidad en el foco (s) más intenso.....46

## I. INTRODUCCIÓN

El huanglongbing (HLB) se reportó en Nayarit (Limón persa *-Citrus latifolia-*) y Colima (Limón mexicano *-Citrus aurantifolia-*) en diciembre 2009 y abril del 2010, respectivamente (Trujillo, 2010). Previamente, el primer reporte en México fue en el Cuyo, Yucatán en julio 2009. En estos estados la expresión de síntomas en cítricos agrios ha sido aparentemente más evidente y generalizada en el dosel del árbol que en cítricos similares de la Península de Yucatán (Robles *et al.*, 2010; Loeza-Kuket *al.*, 2010). Uno de los principales síntomas macroscópicos inducidos en naranja dulce (*Citrus sinensis*) es el moteado clorótico asimétrico en la lámina foliar. Las hojas también pueden engrosarse y mostrar venas dilatadas y de apariencia corchosa (Bové, 2006; Da Graça, 2008). Anatómicamente se ha observado acumulación masiva de almidón en tejidos epidérmico fundamental y vascular (floema), con la consecuente obstrucción y degeneración del floema (Schneider, 1968; Etxeberria *et al.*, 2009; Achoret *al.*, 2010; FolimonovayAchor, 2010). El contenido de este carbohidrato en hojas sintomáticas con HLB puede ser 20 veces mayor que en los árboles asintomáticos de naranja dulce (Takushi *et al.*, 2007). Adicionalmente, se ha reportado taponamiento de los tubos cribosos del floema con calosa y P-proteína (Folimonova y Achor, 2010). Koh (2011) reportó que el taponamiento con calosa inhibe el transporte de los fotoasimilados lo que contribuye al desarrollo de los síntomas de HLB. Debido a que los trabajos histológicos se han realizado en cítricos dulces se ha asumido que la enfermedad es más severa en estos cítricos, sin que a la fecha esta idea sea soportada por estudios en las zonas productoras de México, donde el HLB aparentemente ha tenido mayor prevalencia en cítricos agrios. En Brasil y Florida, regiones donde el HLB se presenta principalmente en naranja dulce las epidemias son en efecto de alta intensidad dependiendo de la abundancia del vector (*Diaphorina*

*citri*), edad de los huertos, estacionalidad, y presión de inoculo de CLas (Bové, 2006; Da Graça, 2008).

Considerando que se carece de reportes formales sobre la respuesta histológica que presentan los cítricos infectados con *Candidatus Liberibacter asiaticus* en las condiciones de México, el objetivo del presente trabajo fue comparar los cambios anatómicos asociados a síntomas de HLB en limón persa y limón mexicano con relación a naranja dulce y establecer la relación de intensidad de síntomas con el progreso espacio-temporal de la enfermedad bajo condiciones de campo con el fin de explicar el posible impacto productivo citrícola inducido por CLas.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Importancia de los cítricos**

De los árboles frutales más importantes del mundo, destacan los cítricos con una superficie de más de 7 millones de hectáreas distribuidas en cerca de 100 países, principalmente en zonas tropicales y subtropicales. Este cultivo representa una importante fuente de empleos y de ingresos para México con un valor de 5, 242 MDP (millones de pesos) (SIAP, 2009) y del que dependen cerca de 90,000 familias. A nivel mundial México ocupa el cuarto lugar en importancia como productor de cítricos, sólo atrás de Brasil, Estados Unidos y China con una superficie de 525,914 ha y una producción de 6, 925,889 ton de fruta (SIAP, 2009). Dicha producción se obtiene de las regiones tropicales y subtropicales de 28 estados de la República dentro de los que destacan Veracruz con cerca del 47%, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas y Tabasco que juntos concentran más del 45% de la superficie sembrada y cosechada con estos cultivos (Mora *et al.*, 1998). De la superficie establecida, el 68.5% corresponde a naranja, 20.5% a limón mexicano, 5.2% a limón persa, y el resto a toronjas, mandarinas y tangerinas (SIAP, 2009).

### **Producción de cítricos en México**

A nivel nacional, los cítricos que más se cultivan son naranja dulce (*Citrus sinensis*, limón mexicano (*C. aurantifolia*), pomelo (*C. grandis*), mandarina (*C. reticulata*) y limón persa (*C. latifolia*), siendo México, desde hace 15 años, el principal productor de esta última especie y de limón mexicano a nivel mundial y el cuatro en producción de naranja (Curti *et al.*, 2000). En los últimos años, el cultivo de limón persa en México se ha expandido debido a los beneficios económicos generados por la exportación de la fruta en fresco. Actualmente, existen en el país poco más de 32,089 ha cultivadas con esta especie (Cerón *et al.*, 1998).

En la Vertiente del Océano Pacífico de México se cuenta con aproximadamente 92,000 ha cultivadas con cítricos ácidos, principalmente limón mexicano y limón persa. Los principales estados productores son Michoacán (40,541 ha), Colima (21,000 ha), Oaxaca (17,495 ha) y Guerrero (6,906 ha). En Nayarit y Jalisco el cultivo de limón persa se ha venido incrementando en los últimos años alcanzando para este año las 4,078 y 2,125 ha, respectivamente. La producción anual de fruta de limón mexicano supera el millón 300 mil toneladas con un valor cercano a los tres mil MDP (SAGARPA-SIACON, 2009). Cerca de un 50% de la fruta se destina al mercado nacional para su consumo en fresco, el resto se envía a la industria para la extracción de subproductos como el aceite esencial, producto del que nuestro país es el mayor exportador. Esta agroindustria genera una gran cantidad de empleos para diversas actividades que se desarrollan desde la producción de plantas en viveros, la producción en huertas comerciales, el empaque, la industria, el transporte y comercialización de fruta o subproductos, además de los proveedores de insumos para los distintos eslabones de esta cadena productiva.

### **Enfermedades en cítricos**

La mencionada riqueza citrícola se encuentra amenazada por plagas y enfermedades de interés cuarentenario. Diversos trabajos enlistan o describen a muchos de ellos en el contexto de México (Palacios 2001; Mora *et al.*, 1998), en dichos trabajos se describen las enfermedades más comunes inducidas por virus, viroides, bacterias y fitoplasmas, estas enfermedades han sido analizadas por medio de estudios histopatológicos, y en algunas se han descrito las alteraciones inducidas a nivel celular por los patógenos (Cuadro 1).

## **Alteraciones histológicas ocasionadas por diferentes enfermedades en cítricos**

Las alteraciones histológicas en cítricos provocadas por bacterias, fitoplasmas, virus y viroides son muchas y variadas. Así por ejemplo el virus de la tristeza (VTC) provoca la muerte de las plantas afectadas debido al taponamiento de los vasos conductores de la savia y el colapso rápido ocasionado por variantes severas del VTC (Cambra y Moreno, 2000). El citrus psorosis (CPsV) ocasiona la formación de concavidades en la madera que provocan rompimientos en la corteza y acumulación de capas de goma en el xilema cercano al cambium (Wallace, 1978). El citrus exocortis viroid (CEVd) provoca oscurecimiento de las células del parénquima, hipertrofia, hiperplasia, granulación de contenidos celulares y muerte de células (El-Shafy *et al.*, 1971). El citrus cachexia viroid (CCaVd) ocasiona depósitos de goma, decoloración en el floema y escamación en la corteza (Calavan *et al.*, 1961). La clorosis variegada de los cítricos (CVC) provoca un bloqueo crónico del sistema de transporte en el xilema por la oclusión de los elementos traqueales ya que se forman tílides, gomitas o masas bacterianas en los tejidos afectados (Berisha *et al.*, 1996). Los fitoplasmas, por su tendencia a acumularse en nervaduras pequeñas y disminuir en los tubos cribosos del floema secundario, ocasionan alteraciones histológicas que se observan como lesiones en las nervaduras, necrosis y en ocasiones hiperplasia e hipertrofia en los tubos cribosos del floema secundario (Schneider, 1977).



Cuadro 1. Síntomas visuales y alteraciones histológicas de los principales patógenos que afectan a los cítricos.

<b>Patógeno</b>	<b>Síntoma</b>	<b>Alteraciones histológicas</b>	<b>Referencia</b>
<b>Citrus Tristeza Virus</b>	Colapso rápido, picado del tallo, amarillamiento de plántulas	Formación de goma en los vasos conductores.	Loeza-kuk, 2005.
<b>Leprosis de los cítricos</b>	Debilitamiento de la planta, caída prematura de la fruta y, cuando la planta presenta una infección intensa, la enfermedad puede conducir a la muerte de la planta	Hiperplasia e hipertrofia en células del parénquima esponjoso	Márquez <i>et al.</i> , 2010
<b>Huanglongbing (HLB)</b>	Moteado difuso de forma irregular en el dosel del árbol, hojas y frutos pequeños, amargos y madurez irregular.	Deformación del floema, actividad cambial anormal y acumulación de almidones en las células con actividad parenquimatosas.	Etxeberria <i>et al.</i> , 2009
<b>Amarillamiento letal de la lima persa</b>	Aclaramiento de nervaduras, amarillamiento foliar, enanismo.	Alta concentración de cristales y polifenoles en parénquima cortical, hiperplasia y colapso en floema.	Uc-Varguez <i>et al.</i> , 2001.
<b>Blight de los cítricos</b>	Marchitez permanente, hojas y frutos pequeños, floración tardía.	Tapones de calosa y goma en el xilema de forma filamentosa y amorfa.	Lindbeck y Brlansky, 2000.
<b>Citrus Exocortis Viroid</b>	Escamación y rajaduras en la corteza del tronco y enanismo.	Oscurecimiento de las células del parénquima, hiperplasia e hipertrofia, muerte celular en nervadura de las hojas.	Alvarado, 1998; Garnsey 1993.
<b>Citrus Cachexia Viroid</b>	Enanismo, picado del tallo, clorosis foliar intensa.	Depósitos de goma y decoloración en el floema.	Duran, 2000. Alvarado, 1998;
<b>Clorosis Variegada de los Cítricos</b>	Clorosis foliar, manchas color café claro en el envés, frutos de tamaño pequeño	Formación de tñlides, gomas y masas bacterianas en los tejidos afectados.	Rosetti <i>et al.</i> , 1997.
<b>Fitoplasmas</b>	Amarillamiento, filodia, virescencia, enanismo.	Hiperplasia e hipertrofia en tubos cribosos,	Siddiqui <i>et al.</i> , 1998.

---

<b>Citrus Psorosis</b>	Descortezamiento del tronco y ramas, manchas anulares en las hojas.	disminución de almidón en el floema. Acumulación de goma en el xilema cercano al cámbium vascular.	Wallace, 1978.
<b>Ophiovirus</b>			

---

Dentro de las enfermedades ocasionadas por bacterias y fitoplasmas, se consideraron dos enfermedades importantes, la clorosis variegada de los cítricos y el Huanglongbing, que por los síntomas que ocasionan están estrechamente relacionadas.

### **Antecedentes del Huanglongbing (HLB)**

El HLB, enfermedad de origen bacteriano (*Candidatus Liberibacter* spp), se encuentra presente en Brasil (San Pablo), Estados Unidos de Norteamérica (Florida), Cuba y desde finales del 2009, en México (SENASICA-DGSV, 2010a). El HLB es considerada la enfermedad más destructiva de los cítricos, ya que ha causado la muerte de más de 50 millones de plantas en Asia, 3 millones en Indonesia y 10 millones en África, lo que ha ocasionado un daño severo a la industria citrícola de esas regiones del mundo (Trujillo-Arriaga *et al.*, 2008).

El riesgo para los cítricos de México se incrementa debido a que desde el año 2002 se detectó la presencia del vector de la bacteria, el psílido asiático *Diaphorina citri*; actualmente, dicho vector está presente en todas las regiones citrícolas del país (Trujillo-Arriaga *et al.*, 2008). Cabe señalar que un estudio realizado en diferentes regiones citrícolas del país por parte del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) en Control Biológico, mostró que el psílido está siendo parasitado por *Tamarixia* sp. en porcentajes que fluctúan del 12 al 31%. El vector también se disemina mediante material propagativo, por lo que se hace necesario producir las yemas y plantas bajo malla antiáfidos. La enfermedad ocasiona la disminución del vigor de los árboles, amarillamiento de las hojas, disminución del tamaño y deformación de frutos, y la muerte de

árboles en 5 a 8 años (SENASICA, 2010b). Los árboles con infección crónica tienen follaje disperso, abierto y muestran bastantes ramas y brotes muertos (Garnsey, 1993). Los árboles muy afectados por la enfermedad también presentan excesiva caída de fruta. En los árboles con síntomas avanzados, las frutas son pequeñas, deformes y al madurar la punta estilar permanece verde, de ahí el nombre de "greening" y tienen un sabor amargo (Gottwald *et al.*, 2007).

El Huanglongbing (HLB) se reportó en Nayarit y Colima en diciembre del 2009 y abril del 2010, respectivamente (Trujillo, 2010). En estos estados la expresión de síntomas en cítricos agrios ha sido aparentemente más evidente y generalizada en el dosel del árbol que en cítricos similares de la Península de Yucatán (Loeza-Kuk *et al.*, 2010). Uno de los principales síntomas macroscópicos inducidos en naranja dulce es el moteado clorótico asimétrico en la lámina foliar, mientras que anatómicamente se ha observado la acumulación de almidón en los tejidos epidérmico fundamental y vascular (floema) de los órganos aéreos de la planta hospedante, con la consecuente obstrucción y degeneración del floema (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010).

### **Anatomía y fisiología de la hoja de los cítricos**

El naranjo agrio es un árbol de ramas espinosas, de hasta 5 metros de altura, con hojas verde oscuras, ovales y puntiagudas, ligeramente rugosas y con numerosas glándulas de esencia. Las flores, que nacen en primavera en los ápices de las axilas de las hojas, o directamente de las ramas, son hermafroditas y de color blanco. El fruto es anaranjado, rugoso y esférico; la pulpa es agria (Agustí, 2003).

Los árboles de cítricos son seres vivos en constante cambio. Su parte aérea, sus raíces y los tejidos vasculares que las unen, experimentan cambios anatómicos periódicos. La constancia y regularidad en la formación de novo de tejidos depende, en gran medida, de la latitud y altitud en

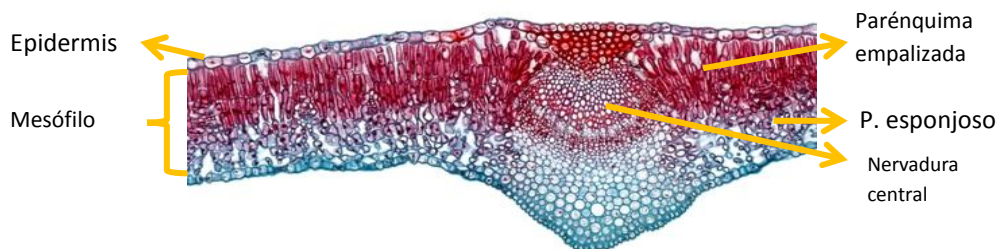
las que crecen las plantas; así en áreas de clima templado la floración y fructificación tiene lugar anualmente, mientras que en las áreas tropicales estos procesos suceden continuamente. La aparición y desarrollo de nuevos brotes se producen en ciclos definidos, que pueden variar de dos a cinco anualmente. La brotación no se produce en fecha fija, varía de un año a otro y en un mismo año, según la variedad, existiendo variaciones de carácter individual, determinadas por las condiciones climáticas (Cañizares, 2007; Agustí, 2003)

## **Hoja**

La hoja de los cítricos es unifoliada y de nerviación reticulada. En muchas especies los peciolos son alados. El limbo es oval u oblongo, de color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés. Su duración es de dos periodos vegetativos. Este se desprende por las zonas de abscisión, situadas en los puntos de unión del limbo al peciolo y de éste al tallo (Agustí, 2003; González-Sicilia, 1968).

Su sistema vascular está formado por un nervio central prominente que se va bifurcando y adelgazando hasta alcanzar el ápice. Los nervios primarios, procedentes de aquél, originan nuevas bifurcaciones en forma de Y en las proximidades de los bordes de la hoja, y cada ramal se anastomosa con ramales de otros nervios. De este modo, el mesófilo de la hoja queda dividido en áreas limitadas por los nervios secundarios. Estas áreas están recorridas por los nervios terciarios, originados por ramificaciones de los secundarios, que también se anastomosan entre sí y forman áreas más pequeñas a manera de isletas de mesófilo en el interior de las cuales los nervios más finos acaban ciegos. El final de éstos consiste en una simple traqueida o en un grupo de células parenquimáticas en estrecho contacto con un pequeño haz vascular (Agustí, 2003; Esau, 1976; Gonzalez–Sicilia, 1968).

La epidermis del haz está formada por células parenquimáticas rectangulares, muy próximas entre sí, sin espacios entre ellas, y cubiertas por una fina lámina cuticular. La epidermis del envés también está formada por células semejantes a las de la epidermis del haz, pero en ésta se hallan intercalados. El parénquima en empalizada está formado por un número variable de filas de células cilíndricas y estrechamente empaquetadas entre sí. El parénquima esponjoso consta aproximadamente de 8 filas de células que dejan entre sí grandes espacios como se muestra en la figura de abajo (Agustí, 2003; Esau, 1976; Gonzalez–Sicilia, 1968).



Aunque las células de los tejidos meristemáticos se hallan generalmente formando una masa compacta durante la diferenciación del tejido, esta íntima conexión entre las membranas de las células adyacentes puede quedar parcialmente rotas a causa de la aparición de espacios intercelulares el más común de los espacios intercelulares se origina por la separación de las membranas celulares a lo largo de una porción más o menos extensa de su área de contacto (Esau, 1976; Gonzalez–Sicilia, 1968).

Algunos de los espacios intercelulares forman estructuras especializadas (los conductos secretores). Las células de los cítricos tienen espacios intercelulares lisígenos esto quiere decir que los espacios se forma por disolución de las células enteras. Ejemplo de éstos son los grandes espacios en las raíces, así como las cavidades secretoras. En estas últimas, las células que se deshacen vierten el producto de secreción en el espacio intercelular, quedando ellas parcialmente desintegradas alrededor de la periferia de la cavidad (Esau, 1976; Gonzalez–Sicilia, 1968).

Las células secretoras están más o menos bien diferenciadas de las células del parénquima fundamental y contienen diversas sustancias: bálsamos, resinas, aceites, taninos, mucílagos, gomas y cristales. Las células de los cítricos secretan aceites (células oleíferas) y cristales. Se denominan idioblastos secretores y difieren considerablemente de las células vecinas entre las cuales se encuentran dispersos. Las células pueden ser isodiamétricas, o más o menos alargadas formando sacos. Las células secretoras son clasificadas normalmente por su contenido. La secreción oleosa tiene lugar en compartimientos intracelulares esféricos que tienen una potente membrana limitante, posiblemente una membrana de celulosa, y está sujeta a la membrana celular por un pedúnculo de celulosa (Esau, 1976).

Las células cristalíferas son a menudo consideradas como idioblastos secretores. Los cristales pueden encontrarse en células del parénquima que no difieren de las otras de este tejido, pero pueden también estar considerablemente modificadas. Las células formadoras de cristales pueden morir después de que la deposición del cristal ha concluido, o bien el cristal puede ser rodeado por la membrana y quedar fuera de la parte viva del protoplasto (Esau, 1976).

Los espacios secretores en forma de cavidades o canales se han formado por esquizogénesis o por lisigénesis, y a veces por ambos fenómenos combinados. Los espacios lisigénicos están rodeados por células más o menos desintegradas, cuya descomposición conduce a la formación de este espacio. Los espacios secretores pueden encontrarse en cualquier parte de la planta. En los espacios lisígenos las excreciones se originan en las células antes de que éstas se desintegren. La disolución empieza en unas cuantas células y luego se extiende a las células vecinas. En *Ruta graveolens* la excreción se presenta primero en células intactas, y luego comienza la disolución de las células. Los espacios lisígenos también pueden resultar como respuestas a lesiones (Esau, 1976).

## **Fisiología**

Los cítricos agrios tienen tres épocas claramente diferenciadas en que se producen las brotaciones: abril, junio y septiembre. La brotación es más intensa y precoz si se produce sobre madera de otoño y dentro de esta precocidad, los brotes situados en la zona más apical del tallo. De cada nudo pueden desarrollarse varios brotes (según la variedad) y es también la madera de otoño la que es capaz de desarrollar mayor número de brotes por nudo (Amorós, 2003).

Se conoce que la falta de temperatura en el suelo o la sequía predisponen a la planta a entrar en un periodo de latencia, pero si estas condiciones son alteradas de manera favorable se inicia de inmediato una nueva brotación. En los trópicos, las brotaciones son más intensas y de mayor longitud las procedentes de la brotación de verano, consecuencia de la mayor temperatura del suelo, además de la temperatura del ambiente sostenida en un mayor número de horas (Amoros, 2003).

## **Movilidad y traslocación**

La mayoría del carbono asimilado se traslada de los sitios de fijación a otros órganos donde se utiliza para el mantenimiento o crecimiento. Este movimiento tiene lugar a través de los elementos cribosos del floema. El carbono se transloca por lo común bajo la forma de sacarosa, pero en ciertas especies la forma móvil más común es la rafinosa o la estaquiosa. Este transporte de di y trisacáridos, con prioridad a los monosacáridos, evita probablemente una pérdida respiratoria excesiva durante la translocación. La tasa de translocación así como la densidad del flujo a través de los elementos cribosos, se encuentra relacionada a la velocidad con que el carbono ingresa al floema, pero no siempre hay una relación con la tasa de la fotosíntesis. En la mayoría de las situaciones, la tasa de la fotosíntesis es mayor que la de translocación, apareciendo una acumulación neta de carbono en las hojas, por lo común bajo la forma de almidón. Este

carbono almacenado se renueva permanentemente, puesto que mantiene el suministro al sistema de translocación durante los periodos en que la tasa de fotosíntesis desciende por debajo de la translocación o durante la noche. Esto puede ser solo temporal y hay una fluctuación diurna en la tasa de translocación (Díaz- Montenegro, 2002; Milthorpe *et al.*, 1985).

Este almacenamiento temporal del carbono que ocurre en la hoja también se observa a lo largo del recorrido de traslado, habiendo un intercambio permanente del carbono entre los elementos cribosos y los tejidos circundantes. En ciertos casos, este almacenamiento es solo por pocas horas; en otros, especialmente cuando la senectud de las hojas conduce a que se reduzca la producción de compuestos orgánicos, el material almacenado en el tallo durante las primeras etapas de crecimiento se transfiere a los órganos de reserva en desarrollo. Los principales lugares de recepción para los compuestos fotosintetizados son la raíz y los ápices caulinares, así como los órganos de reserva (frutos). No obstante, puede invertirse el transporte que iba hacia estos últimos si el crecimiento se detiene por alguna razón. Por consiguiente, el patrón de distribución de sustancias en la planta está cambiando permanentemente a medida que las hojas crecen y pasan de ser importadoras netas de carbono a ser exportadoras netas, y también a medida que surgen otros lugares de recepción o de utilización (Díaz- Montenegro, 2002; Milthorpe *et al.*, 1985).



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Muestreo de material vegetal**

En agosto 2010 en Tecomán, Colima, se seleccionó una superficie de la plantación del Rancho Lucy y se aisló con una estructura cubierta con malla antiáfidos. Dicha plantación tiene 48 árboles de limón mexicano (Lm) plantados en 2006 sobre Volkameriana. Los árboles se establecieron en un sistema de siembra de 6X8 altamente tecnificado. En el mismo año, en Ahuacatlán, Nayarit, se seleccionaron 100 árboles de un huerto comercial de limón persa (Lp) plantados en 2005 sobre Volkameriana. Los árboles se establecieron en un sistema de siembra de 5X5 altamente tecnificado. De ambos huertos se seleccionaron cinco árboles asintomáticos y cinco con síntomas de HLB.

En noviembre 2010 se seleccionó un árbol de naranja dulce (Nd) con manejo convencional, ubicado en Tizimin, Yucatán procedente de los primeros reportes del HLB en México. Las evaluaciones fueron mensuales hasta enero. No fue posible la selección de otros árboles debido a que no existían naranjos adicionales enfermos. En cada árbol seleccionado se marcó un brote de aproximadamente 15 cm de longitud con una cinta plástica a fin de hacer observaciones del progreso de la enfermedad. Dichas observaciones se hicieron mensualmente a partir de agosto del 2010 a enero del 2011. De cada brote seleccionado se tomaron dos hojas (lámina y peciolo) a intervalos mensuales.

#### **Análisis histológico**

**Fijación, deshidratación e inclusión en paraplast.** De las dos hojas colectadas en cada árbol, se obtuvieron los peciolo y cinco fragmentos de la lámina foliar de aproximadamente un centímetro cuadrado tomando como referencia a la nervadura central de la hoja. El material

vegetal se fijó en una mezcla de formaldehído, ácido acético glacial y alcohol etílico al 96% (FAA) durante 48 horas. Después de este tiempo las muestras se lavaron con agua corriente durante 15 minutos. La deshidratación e inclusión del material vegetal se realizó en un procesador automático de tejidos (C.O. Sakura Finetechnical Mod. 4640-B). Las muestras fueron deshidratadas en una serie gradual de alcohol etílico (30, 50, 70, 85, 96 y 100%), luego se pasaron por una mezcla 1:1 de alcohol absoluto: xilol absoluto y por dos mezclas de xilol al 100% a intervalos de 5 horas en cada uno de los cambios. Para la inclusión en parafina se realizaron dos cambios de paraplast (SIGMA 76258) durante 48 horas.

**Corte y montaje.** Las muestras incluidas en parafina se cortaron longitudinal y transversalmente a 10 µm de grosor con un micrótopo rotatorio (A. O. Company mod. Spencer 820).

**Desparafinación y tinción.** Las secciones obtenidas se mantuvieron en una estufa a 40°C durante dos horas y se colocaron en tres cambios de xilol absoluto durante 3 minutos cada uno. Posteriormente, las muestras se hidrataron en alcohol etílico al 100 y 96 % durante tres minutos en cada cambio, se colocaron en safranina (SIGMA) durante 24 horas y se enjuagaron con agua de llave durante una hora. Enseguida, las secciones se lavaron con alcohol etílico al 96% más ácido pícrico y con etanol al 96 % más amoniaco durante 10 segundos, se deshidrataron con etanol absoluto y se tiñeron con verde rápido durante 10 segundos. Las muestras se lavaron con aceite de clavo para retirar el exceso de colorante y se aclararon con una mezcla de aceite de clavo, xilol y etanol absoluto. Finalmente, las muestras se colocaron en xilol al 100% para montarse en resina sintética (López *et al.*, 2005). Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico marca VELAB, en un microscopio compuesto master Olympus con cámara Infynitum y en un fotomicroscopio III Carl Zeiss con cámara digital para microscopía Paxcam 3.

Para la medición de variables se tomaron imágenes de las muestras vegetales sintomáticas y asintomáticas a 10 X aumentos. Las mediciones en las imágenes digitales fueron realizadas con el analizador de imágenes Image Tool ver. 3.0.

**Mediciones de áreas con hiperplasia.** De los cortes obtenidos se eligieron cinco laminillas sintomáticas y cinco asintomáticas de Lp, Lm y Nd por cada fecha de evaluación (6 evaluaciones para Lp y Lm, y 3 evaluaciones para Nd). De cada laminilla fueron seleccionados el quinto y el décimo corte, analizando un total de 20 cortes por fecha. Finalmente, se analizaron un total de 120 cortes por cítrico agrio, y 60 para naranja dulce. Las variables evaluadas fueron área y anchura del anillo del floema y área total del sistema vascular.

### **Pruebas histoquímicas**

**Almidones.** Cortes transversales y longitudinales de las tres especies cítricas se desparafinaron e hidrataron hasta agua corriente. El tejido rehidratado se tiñó Yodo-yoduro de potasio durante 15 minutos, se montó en el mismo colorante y se observó en un microscopio compuesto master olympus con cámara infynitum (Curtis-Patiño, 1986). De dos laminillas sintomáticas y asintomáticas de Lp y Lm se seleccionaron el quinto y el décimo corte para analizar un total de 8 cortes por fecha de evaluación de ambos cítricos agrios. A partir de la cuarta fecha se incluyeron 8 cortes de Nd. Se analizaron un total de 48 cortes por cítrico agrio y 24 para naranja dulce. Para la medición de la superficie del mesófilo con acumulación de almidones, se tomaron imágenes de muestras sintomáticas y asintomáticas, las cuales fueron analizadas con el procesador de imágenes Image Tool ver. 3.0. Se comparó el área del mesófilo sano versus el enfermo.

**Proteína.** Cortes longitudinales de Lm, Lp y Nd se desparafinaron y hidrataron hasta etanol al 96%. Posteriormente se colocaron en una solución de azul mercúrico de bromofenol durante 30

minutos, se enjuagaron con ácido acético al 0.5 % durante 20 minutos y se lavaron con agua de la llave por tres minutos. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en alcohol etílico al 70 % hasta alcohol al 100% durante tres minutos por cambio y se colocaron en xilol absoluto durante tres minutos y se montaron en bálsamo de Canadá.

**Mediciones de áreas con proteínas.** En 10 cortes sintomáticos y 10 asintomáticos de LP, LM y ND, se seleccionaron el quinto y el décimo corte de cada laminilla para medir las áreas que contenían proteínas. Imágenes de muestras sintomáticas y asintomáticas se midieron con el procesador de imágenes Image Tool ver. 3.0. Las muestras analizadas correspondieron a la última fecha de evaluación.

### **Análisis estadístico**

Las variables área y anchura del anillo del floema, área de sistema vascular, área del mesófilo con almidón y área del floema con proteínas fueron procesadas individualmente mediante un diseño estadístico de parcelas subdivididas (ANOVA), utilizando el programa SAS ver. 9.0, con fecha, especie citrícola y condición de enfermedad (+ o -) asociadas a la parcela grande, mediana y chica, respectivamente. La comparación de medias se efectuó con Tukey ( $p=0.05$ ).

### **Selección de huertas para el estudio epidemiológico**

Para el estudio epidemiológico, se seleccionaron tres huertos de limón persa en el municipio de Ahuacatlán, Nayarit bajo condiciones contrastantes de manejo agronómico (Altamente tecnificado, medianamente tecnificado y manejo convencional) (Anexo 1). En cada huerto se evaluaron 100 árboles cada 20 días a partir de agosto 2010 a enero 2011. En Tecomán, Colima se evaluó el huerto de limón mexicano protegido con malla antiáfidos por el INIFAP (Rancho Lucy)

con manejo agronómico tecnificado con un total de 48 árboles. Este huerto se describió previamente.

### **Análisis del estudio epidemiológico**

En cada una de las huertas la incidencia del HLB se calculó contando el número de árboles con síntomas de la enfermedad en relación al número total de árboles por huerto. Para el registro de la incidencia se consideraron como árboles enfermos aquellos que presentaron los síntomas típicos de la enfermedad en uno o más brotes vegetativos por cada orientación cardinal del dosel. Se usó la fórmula:

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\# \text{ Árboles con síntomas}}{\text{Total de árboles}} \times 100$$

Adicionalmente se evaluó la severidad de síntomas del HLB. Esto se realizó mediante la división del dosel del árbol en cuatro secciones asociados a cada punto cardinal (norte, sur, este y oeste), y se asignó el 25% a cada sección, formando así el 100% del dosel de cada árbol. Esta estimación fue hecha de manera aditiva de acuerdo con las secciones enfermas y con una escala de severidad (Anexo 2). La severidad total (Sevt) por árbol fue la suma del porcentaje de cada sección (s).  $Sevt = \sum(Sevs)$ . Donde  $s=1-4$ .

Los datos generados por huerto se emplearon para construir curvas de progreso de la enfermedad partir de evaluaciones a intervalos de 20 días. Con estas curvas se estimaron parámetros de localización como incidencia inicial ( $Y_0$ ) y la incidencia final ( $Y_f$ ). Adicionalmente, se realizaron mapas bidimensionales y tridimensionales con el propósito de visualizar la dispersión de la enfermedad a nivel parcela. Esto se realizó con Surfer ver. 6.2.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntomas

*Candidatus Liberibacter asiaticus* indujo diferentes síntomas según el tiempo de infección de los brotes marcados y la concentración bacteriana. En limón mexicano se observó un punteado clorótico disperso en toda la lámina foliar en síntomas iniciales de la primera evaluación (agosto 2010) (Figura 1A). En septiembre se apreciaron algunas manchas angulares en la lámina foliar (Figura 1B). A partir de la tercera fecha de evaluación (octubre) se notó el característico moteado difuso (Figura 1C) y el engrosamiento de nervaduras. Eventualmente se observó un amarillamiento generalizado en el dosel del árbol y el acorchado de la nervadura central en las hojas (Figura 1E y F) con la consecuente abscisión de hojas. Dichas observaciones coincide con lo señalado por Robles *et al.* (2010), el cual además reporta deformación de frutos y caída.

En limón persa el síntoma inicial también fue un punteado clorótico disperso (Figura 2A). En septiembre se observaron hojas con presencia de manchas angulares (Figura 2B) y en octubre se detectaron diferentes tipos de síntomas incluyendo moteado difuso, engrosamiento de nervaduras y clorosis (Figura 1C, D, E, F). En los 6 meses de evaluación de los brotes no se detectó defoliación. En naranja dulce se observó moteado difuso (Figura 3A y 3C), aclaramiento de nervaduras (Figura 3B), y amarillamiento tenue generalizado de hojas sin defoliación.

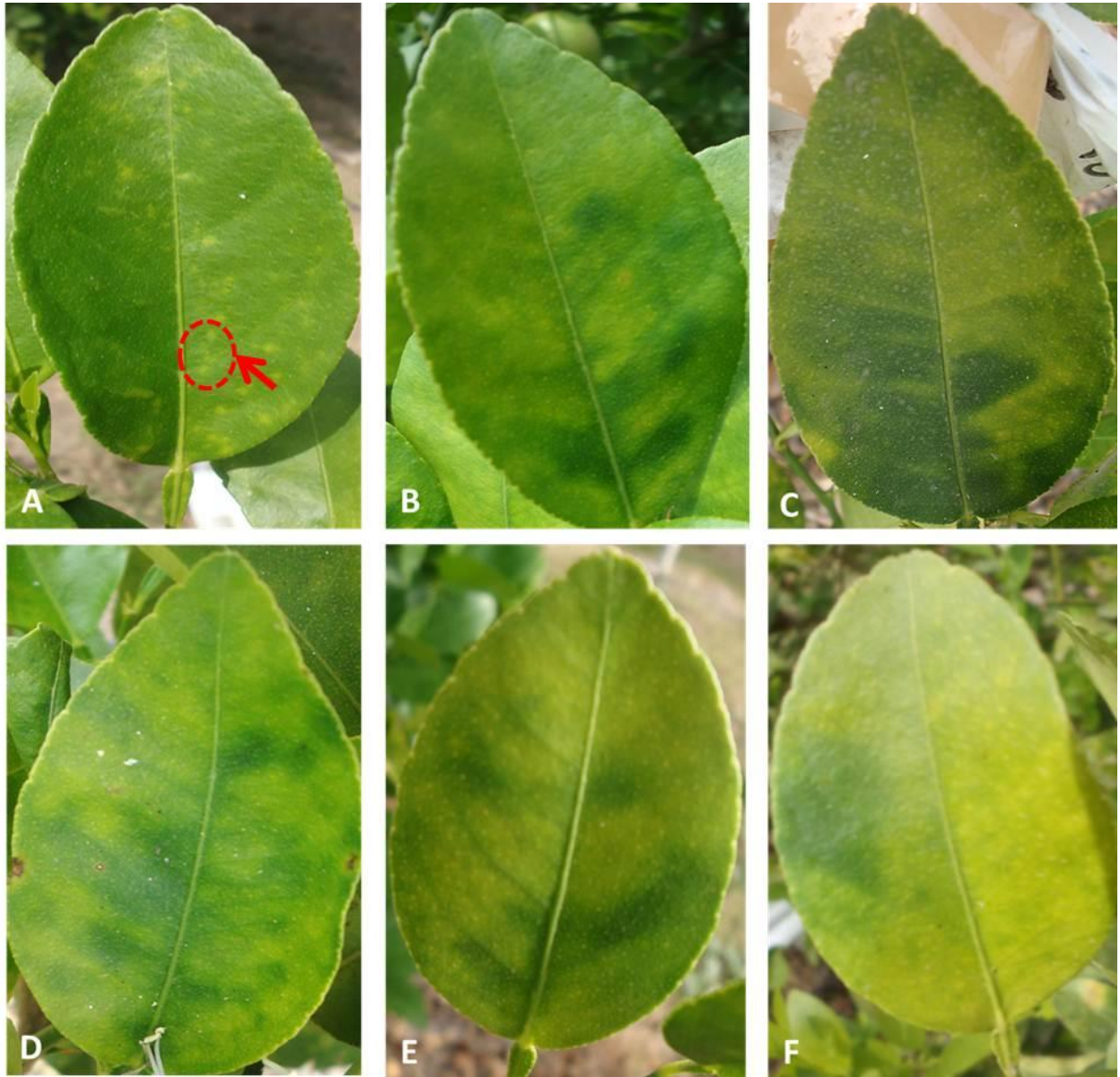


Figura 1. Síntomas inducidos por CLAs en limón mexicano en hojas procedentes de ramas marcadas al inicio de la aparición de síntomas visuales en un huerto comercial de Tecomán, Colima. A) Punteado clorótico (en círculo) en Agosto 2010; B) Manchas angulares asimétricas en septiembre; C) Moteado difuso en octubre); D) Aclaramiento de nervaduras en noviembre); E) Acorchado de las nervaduras en diciembre); F) Amarillamiento en enero.

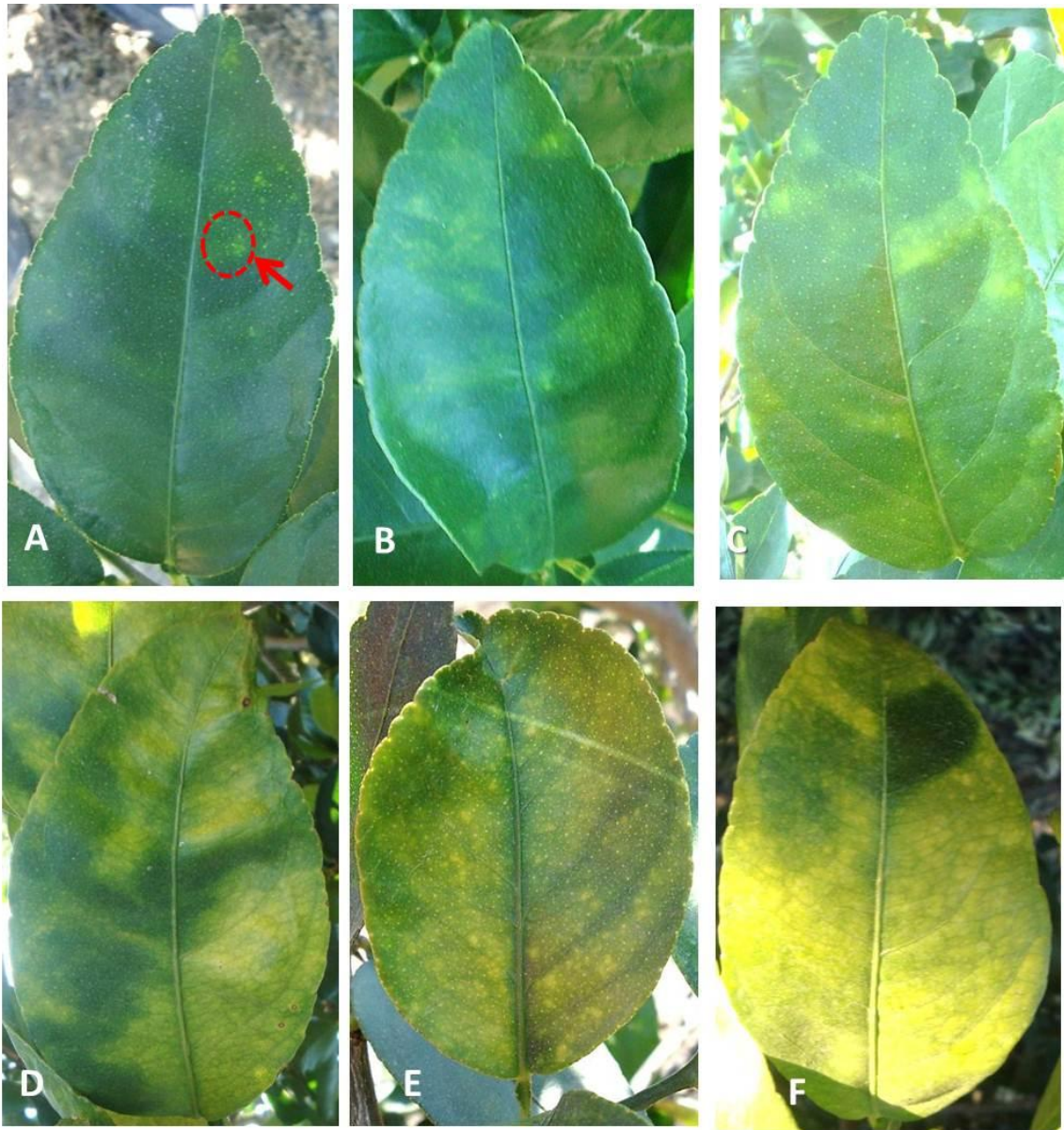


Figura 2. Síntomas inducidos por CLas en limón persa en hojas procedentes de ramas marcadas al inicio de la aparición de síntomas visuales en un huerto comercial de Ahuacatlán, Nayarit. A) Punteado clorótico en Agosto 2010; B) Manchas angulares asimétricas en septiembre; C) Moteado difuso en octubre; D) Aclaramiento de nervaduras en noviembre; E) Acorchado de las nervaduras en diciembre; F) Amarillamiento en enero.



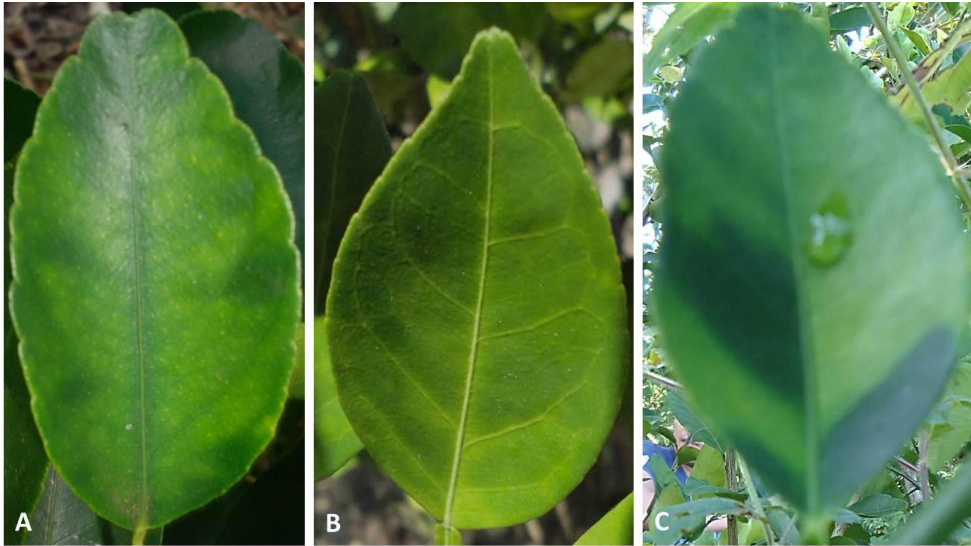


Figura 3. Síntomas inducidos por CLAs en naranja dulce en hojas procedentes de ramas marcadas en Yucatán, México. A) Moteado difuso en noviembre 2010; B) Aclaramiento de nervaduras en diciembre; C) Manchas angulares asimétricas en enero.

## **Estructura foliar**

### **Lamina foliar**

No se observan diferencias estructurales en la lámina foliar de hojas sintomáticas y asintomáticas de los cítricos evaluados. En limón persa, limón mexicano y naranja dulce el mesófilo está formado por una capa de dos a tres estratos de células cuyo eje mayor es perpendicular a la superficie de la hoja, mientras que el parénquima esponjoso está formado por varios estratos de células isodiamétricas y espacios de aire, lo que da al tejido una apariencia laxa (Figuras 7A, C y E).

### **Nervadura central de la hoja**

El floema de la nervadura central de hojas sintomáticas y asintomáticas de limón persa y naranja dulce presento un incremento durante las fechas de evaluación de la enfermedad (Figuras

4 y 5B), aunque en las muestras sintomáticas el incremento fue mayor (Tukey,  $p=0.05$ ). Dicho incremento se asocia directamente con un aumento en el área del sistema vascular (Figura 4B). Con base en estas observaciones, y aun cuando la tasa de hiperplasia fue mayor en los materiales sintomáticos, es posible señalar que el incremento en el número de células que constituyen el floema no tiene una asociación exclusiva con la presencia de CLas en los tejidos foliares. Es posible que el incremento en el área del floema ocurra como parte del crecimiento y diferenciación del tejido vascular debido a que las muestras evaluadas se obtuvieron de brotes vegetativos en crecimiento.

A diferencia del limón persa y naranja dulce, el área del floema de la nervadura central de hojas asintomáticas de limón mexicano se mantuvo relativamente constante, mientras que en hojas sintomáticas hubo un incremento significativo en la hiperplasia del tejido conductor. La proporción del tejido dañado (incremento en el área del floema) con respecto al tejido asintomático fue significativamente mayor en limón mexicano durante las tres últimas fechas de evaluación (1:48.5, 1:101.1 y 1:63.8) (Tukey,  $p=0.05$ ) (Cuadro 2). Dichos índices sugirieron que el limón mexicano es más susceptible a CLas en comparación al limón persa y naranja dulce. Sin embargo, es importante mencionar que las condiciones edáficas, climáticas y de manejo, las cuales tienen un efecto sobre la intensidad de la enfermedad, son diferentes en las tres regiones en donde se realizaron las evaluaciones del progreso de la enfermedad y análisis histológicos.

De manera similar a lo reportado en el floema de hojas, peciolo, y tallos de naranja valencia (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor, *et al.*, 2010; Folimonova y Achor, 2010), el floema de las hojas sintomáticas de los materiales evaluados en la presente investigación se colapsó y no se observó taponamiento de los tubos y células cribosas en 3050 campos microscópicos revisados.

Cuadro 2. Efecto de Clas en hiperplasia, estimada con área de floema de nervadura central de hojas, en seis evaluaciones mensuales de brotes marcados de limón mexicano, limón persa y naranja dulces asintomático y sintomático.

Fecha	Condición de enfermedad	Área Floema ( $\mu\text{m}^2 \times 1000$ )							
		Limón Mexicano		Limón persa		Naranja Dulce			
		Área	Índice <sup>1</sup>	Área	Índice	Área	Índice		
ago-10	Sinto <sup>x</sup>	7,4 B	1,5	261,5 A	1,5	-	-		
	Asinto	5,1 B		174,7 A					
sep-10	Sinto	15,2 B	1,6	399,9 A	1,5	-	-		
	Asinto	9,6 B		272,4 A					
oct-10	Sinto	3,7 B	1,4	877,6 A	4,7	-	-		
	Asinto	2,7 B		188,3 A					
nov-10	Sinto	229,0 C	48,5	1211,8 A	1,9	561,9 B	31,2		
	Asinto	4,7 C		650,2 A		18,0 B			
dic-10	Sinto	541,6 B	101,1	1207,8 A	1,3	534,8 B	1,4		
	Asinto	5,4 C		928,7 A		393,0 B			
ene-11	Sinto	556,4 B	63,8	1200,8 A	2,0	957,2 A	2,7		
	Asinto	8,7 C		600,0 A		358,1 B			

<sup>x</sup>Medidas con distinta letra en una fila son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p=0.05$ ).

Sinto=sintomático asinto=asintomático.

<sup>y</sup>Índice hiperplasia ( $I = \text{valor área floema sinto}/\text{valor área floema asinto}$ ).

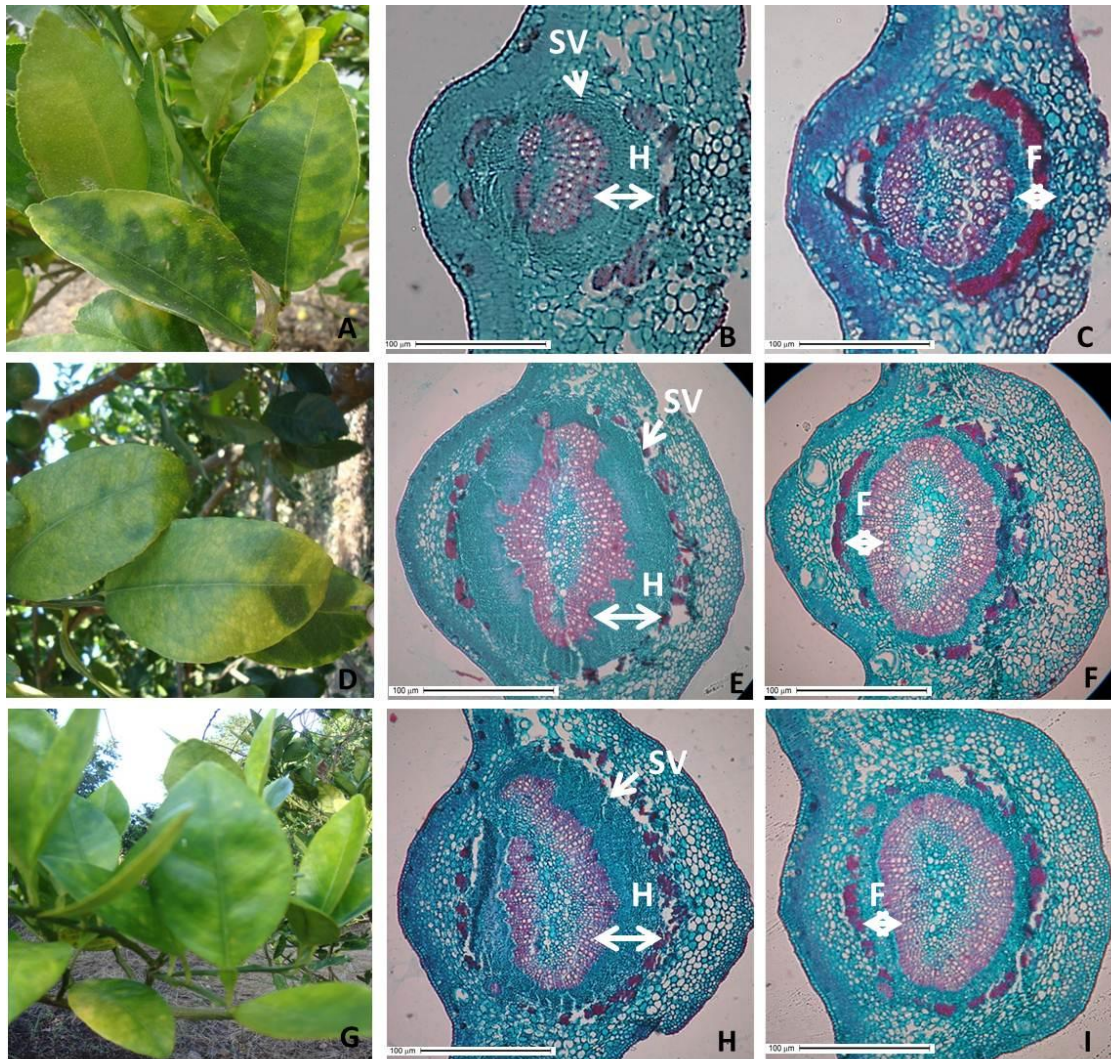


Figura 4. Síntomas de HLB y micrografías de cortes transversales de la nervadura central de hojas de limón mexicano (Lm), persa (Lp) y naranja dulce (Nd) al quinto mes de la detección de síntomas en brotes de campo. A, D y G) Intensidad de síntomas al quinto mes de su aparición en brotes de Lm, Lp y Nd, respectivamente. B, E y H) Nervadura central de hoja sintomática con hiperplasia en el floema de Lm, Lp y Nd, respectivamente. C, F y I) Nervadura central de hoja asintomática de Lm, Lp y Nd, respectivamente. Las flechas señalan al sistema vascular (SV), hiperplasia (H), floema (F). Escala en micrografías 100µm.

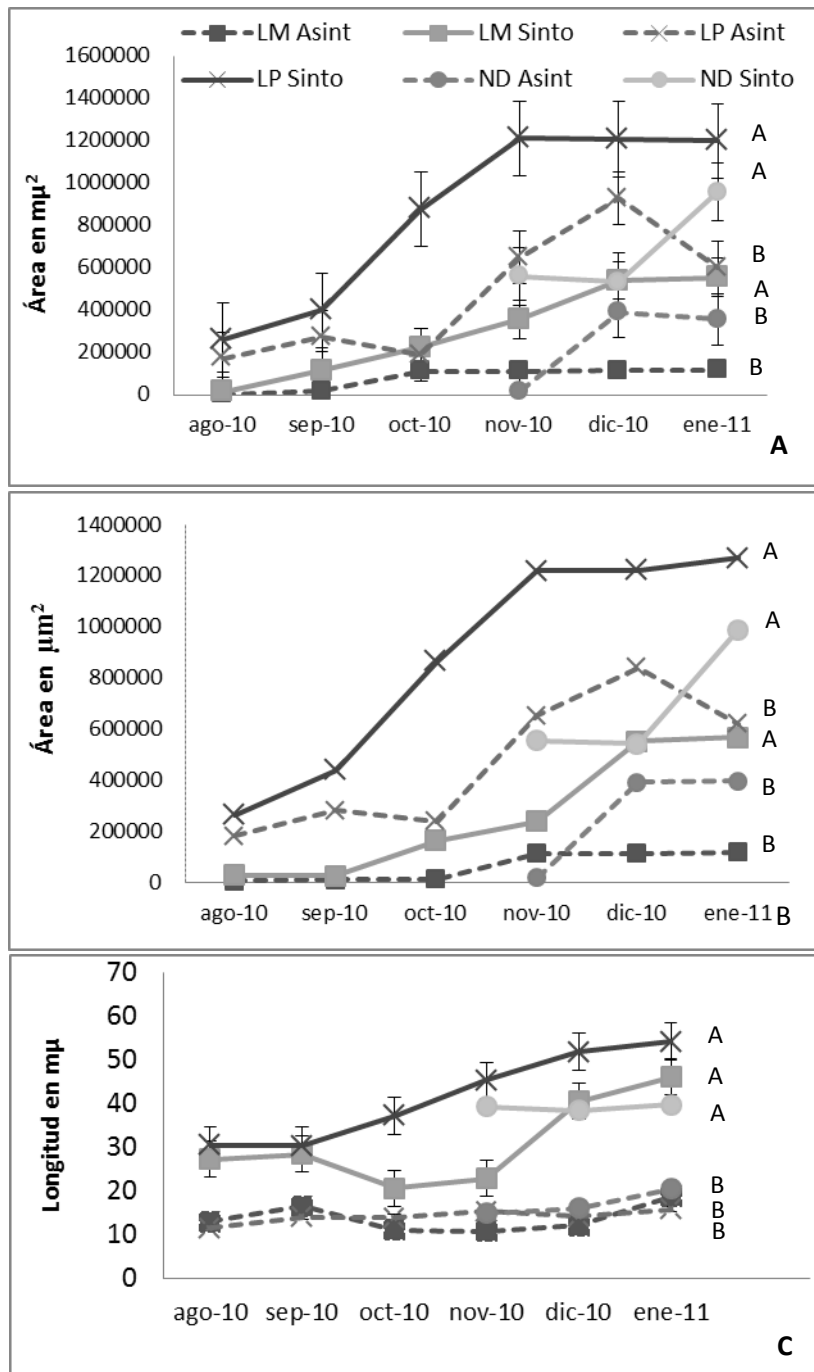


Figura 5. Progreso temporal del área del sistema vascular (A), área del floema (B) y anchura del floema (C) en hojas de brotes sintomáticos con HLB y asintomáticos de limón mexicano, persa y naranja dulce. Progresiones sintomáticas y asintomáticas dentro de cada cítrico con al menos una misma letra en común son estadísticamente iguales (Tukey,  $p=0.05$ ).

## Histoquímica foliar

### Lámina foliar

Los tejidos dérmico, fundamental (mesófilo) y vascular de hojas de limón mexicano, limón persa y naranja dulce con síntomas de CLas presentaron acumulación de almidón de forma análoga a lo reportado en naranja dulce (Schneider, 1968; Etxeberria *et al.*, 2009). Sin embargo, cabe mencionar que en las muestras de naranja dulce analizadas en la presente investigación no se detectó la presencia del carbohidrato en el tejido vascular de la hoja. Es importante mencionar que en el mesófilo de las hojas asintomáticas también hubo reacción positiva a la presencia de almidón. Sin embargo, la superficie del mesófilo con reacción al carbohidrato fue estadísticamente menor con respecto a la superficie del mesófilo con depósitos de almidón en hojas sintomáticas (Tukey,  $p=0.05$ ) (Figuras 6 y 7).

Dentro del mesófilo, la superficie de almidón fue mayor en el parénquima en empalizada y esponjoso de hojas sintomáticas de limón mexicano y limón persa con respecto a naranja dulce, mientras que las hojas sintomáticas de naranja dulce la superficie fue mayor en el parénquima en empalizada. La mayor acumulación de almidón en el mesófilo de limón mexicano (Tukey,  $p=0.05$ ) probablemente esté relacionada con el amarillamiento generalizado del árbol y con la defoliación de los árboles. Los resultados observados en esta investigación coinciden con lo reportado por Takushi *et al.*(2007); Etxeberria *et al.* (2009); Achoret *al.*(2010) y Folimonova y Achor, 2010. La discrepancia en el contenido de almidón entre las hojas de árboles sanos e infectados con CLas refleja una variación significativa en el balance natural de la relación fuente demanda del carbohidrato.

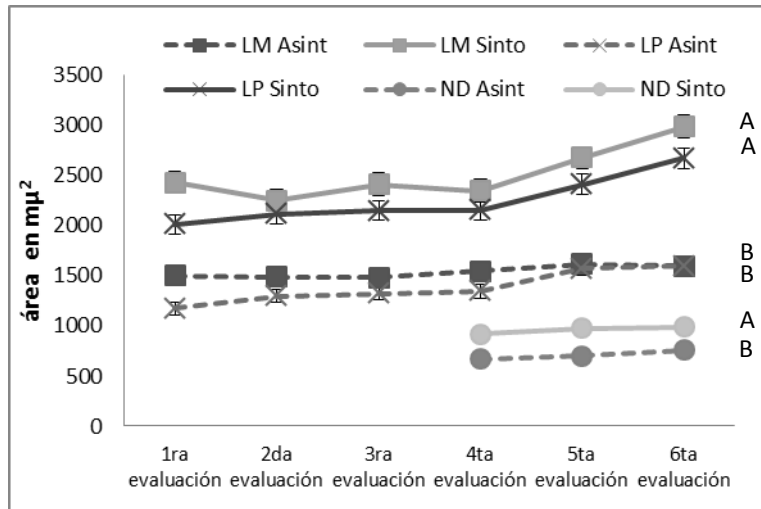


Figura 6. Progreso temporal del área del mesófilo con acumulación de almidón en hojas de brotes sintomáticos con HLB y asintomáticos de limón mexicano, limón persa y naranja dulce. Progresiones sintomáticas y asintomáticas dentro de cada cítrico con al menos una misma letra en común son estadísticamente iguales (Tukey,  $p=0.05$ ).

### Proteínas

El floema de la nervadura central de hojas asintomáticas de limón mexicano, limón persa y naranja dulce dio reacción positiva a la presencia de proteínas. Sin embargo, la superficie del floema con la presencia de dichas moléculas fue estadísticamente mayor (Tukey,  $p=0.05$ ) en hojas sintomáticas con respecto a las hojas asintomáticas (Figura. 8). Los resultados presentados en esta investigación no determinan en que tipos celulares del floema se acumulan las proteínas, pero se tienen reportes de la presencia de tapones proteicos (P-proteína) en los poros de los elementos cribosos de hojas maduras de naranja dulce (Folimonova y Achor2010).

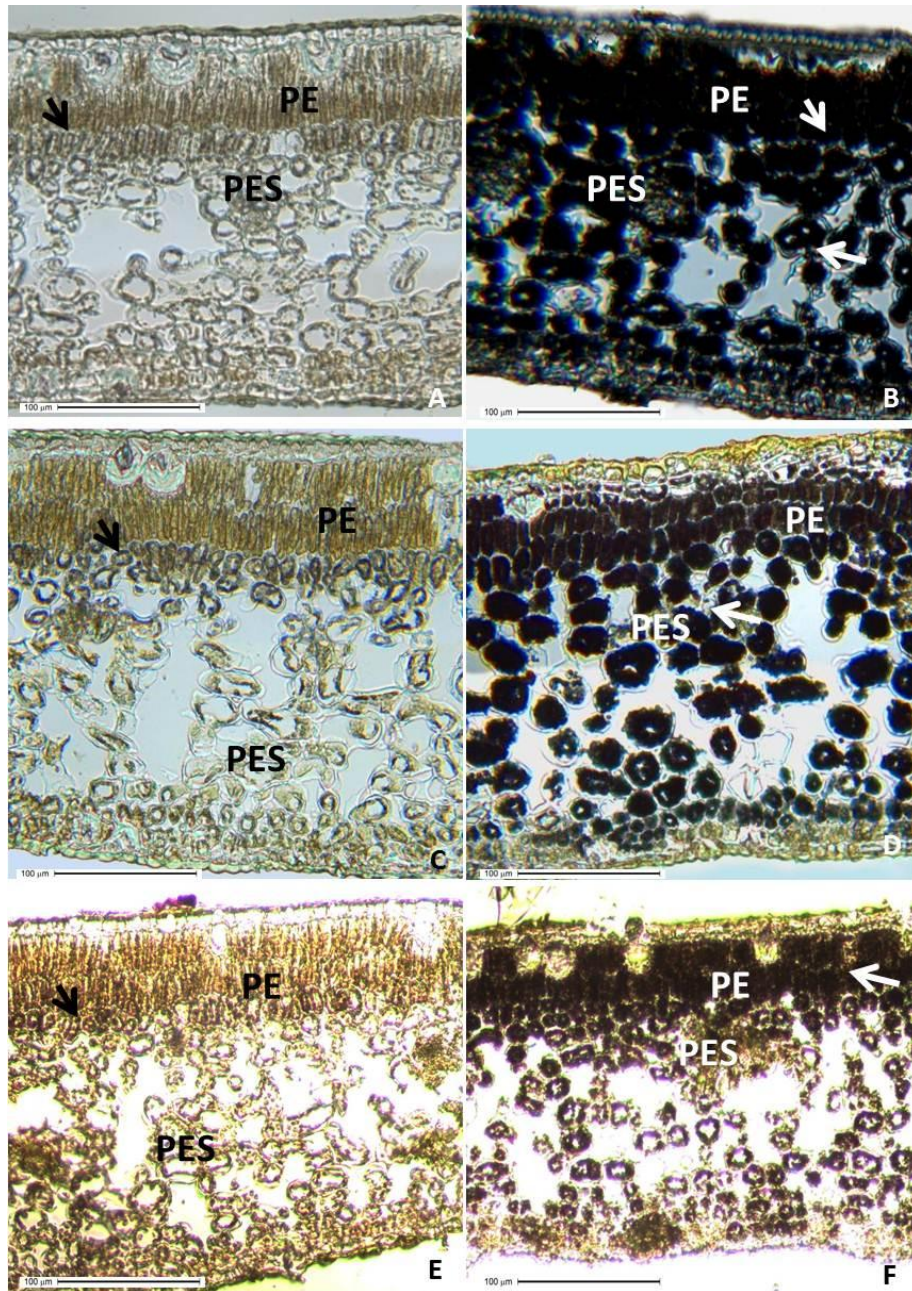


Figura 7. Micrografías de microscopía de luz de cortes transversales de hojas de limón mexicano (Lm), persa (Lp) y naranja dulce (Nd) al quinto mes de la detección de síntomas en campo. A, C y E) Hoja asintomática de Lm, Lp y Nd, respectivamente. B, D y F) Hoja sintomática de Lm, Lp y Nd, respectivamente. Las flechas y letras señalan la ubicación del parénquima empalizada (PE) y parénquima esponjoso (PES). El color oscuro en celular indica acumulación de almidón.



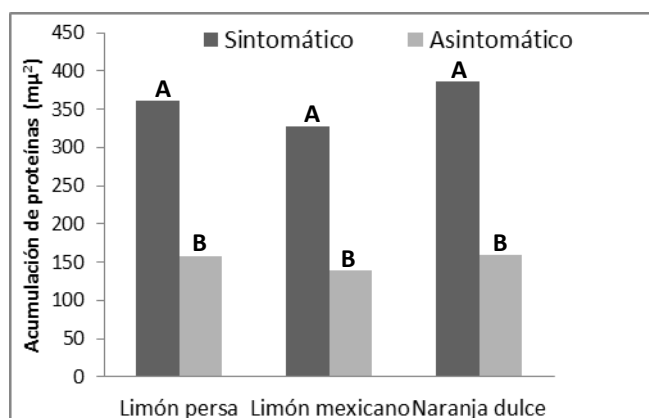


Figura 8. Área del floema con acumulación de proteínas en hojas de limón mexicano, limón persa y naranja dulce al sexto mes de la detección de síntomas en brotes de campo. En cada cítrico, barras con al menos una letra en común son iguales (Tukey,  $p=0.5$ ).

### Análisis epidemiológico

El progreso epidémico del HLB en cítricos agrios en dos regiones del Pacífico mexicano evidenció la eficiencia de la dispersión de CLAs en presencia del vector (Robles et al., 2010). La incidencia final estuvo en el rango 18 al 100% (Cuadro 3, Figura 9). Aparentemente, esta variación fue dependiente del tipo de cítrico y manejo agronómico. También se confirman reportes previos en limón mexicano con respecto a la intensidad del HLB (Robles *et al.*, 2010). Los resultados en limón persa sugieren que la enfermedad puede manejarse con prácticas agronómicas y sanitarias. La experiencia de Brasil constituye una evidencia de esta posibilidad en donde su manejo se fundamenta principalmente en la eliminación de fuentes de inóculo (inóculo primario) vía eliminación de árboles enfermos y la fuerte reducción de poblaciones del vector. Actualmente, en algunas regiones de ese país se aplican estas estrategias a nivel regional (R. Bassenezi, 2011. Fundecitrus. Comunicación Personal). En las huertas estudiadas de Nayarit no se realizó ninguna de estas prácticas aunque su variación en incidencia y severidad sugiere que el solo manejo agronómico puede ser importante en reducir el efecto de HLB (Cuadro 4). La tecnología para producción de agrios se ha generado para algunas regiones de México (Curtí-

Díaz et al., 2010). Esta requiere evaluarse con respecto al progreso del HLB y otras enfermedades potenciales de los cítricos como CVC y Leprosis (Cuadro 1).

Cuadro 3. Incidencia acumulada de agosto 2010 a enero 2011 de árboles con síntomas de HLB en tres huertos comerciales de limón persa y uno de limón mexicano en Nayarit y Colima, respectivamente.

Huerto <sup>1</sup>	Incidencia (%)							
	26-ago	18-sep	8-oct	7-nov	7-dic	22-dic	10-ene	29-ene
N-Tec	11	12	17	17	17	18	18	18
N-Med	7	15	61	83	84	85	85	85
N-Conv	15	15	23	30	30	30	33	34
C-Tec	92	95	95	100	-	-	-	-

<sup>1</sup> Huertos de Nayarit: N-Tec=huerto tecnificado; N-Med=huerto medianamente tecnificado; N-Conv=manejo convencional. Huerto Colima: C-Tec=huerto tecnificado.

La dispersión del HLB en cítricos agrios se presentó con un marcado efecto de orilla en los huertos evaluados (Figuras 10 a 12) y la severidad final presentó variaciones con relación al tipo de manejo agronómico por huerto (Cuadro 4). Sin embargo, también se observó la presencia de focos y agregados dentro del huerto posiblemente por la población relativamente baja de la unidad productiva (100 árboles), particularmente en el huerto con tecnología de mediano manejo (Figura 11) y manejo convencional (Figura 12). En Brasil y Florida con una citricultura extensiva se ha reportado un claro efecto de bordo (Gottwald *et al.*, 2007; S. Aparecido. 2011. Fundecitrus. Comunicación Personal) posiblemente debido a las grandes extensiones y a la

biología del vector en hábitos de migración, colonización y multiplicación. En México, con una citricultura fragmentada esto debe ser considerado para efectos de detección y muestreo.

Cuadro 4. Severidad acumulada del HLB de agosto 2010 a enero 2011 evaluada a nivel de árbol en tres huertos comerciales de limón persa en Nayarit.

Huerto <sup>1</sup>	Severidad (%)							
	26-ago	18-sep	8-oct	25-nov	7-dic	22-dic	10-ene	29-ene
N-Tec	9 ± 5	11 ± 5	13 ± 5	15 ± 5	18 ± 5	20 ± 5	23 ± 5	26 ± 5
N-Med	10 ± 6	25 ± 7	33 ± 7	35 ± 5	37 ± 5	38 ± 5	39 ± 5	46 ± 5
N-Conv	13 ± 4	22 ± 5	35 ± 5	36 ± 5	39 ± 5	40 ± 5	43 ± 5	48 ± 5

<sup>1</sup> Huertos de Nayarit: N-Tec=huerto tecnificado; N-Med=huerto medianamente tecnificado; N-Conv=manejo convencional.

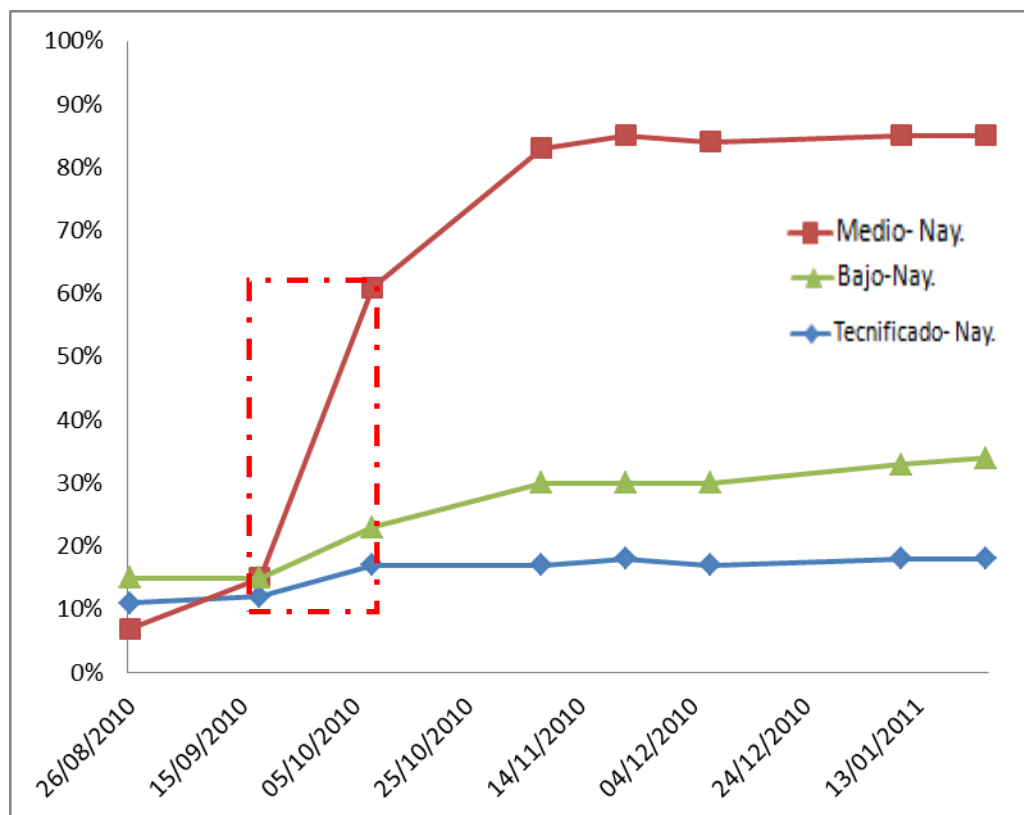


Figura 9. Incidencia acumulada de agosto 2010 a enero 2011 de árboles con síntomas de HLB en tres huertos comerciales de limón persa, bajo manejos agronómicos contrastantes. Ahuacatlán, Nayarit.

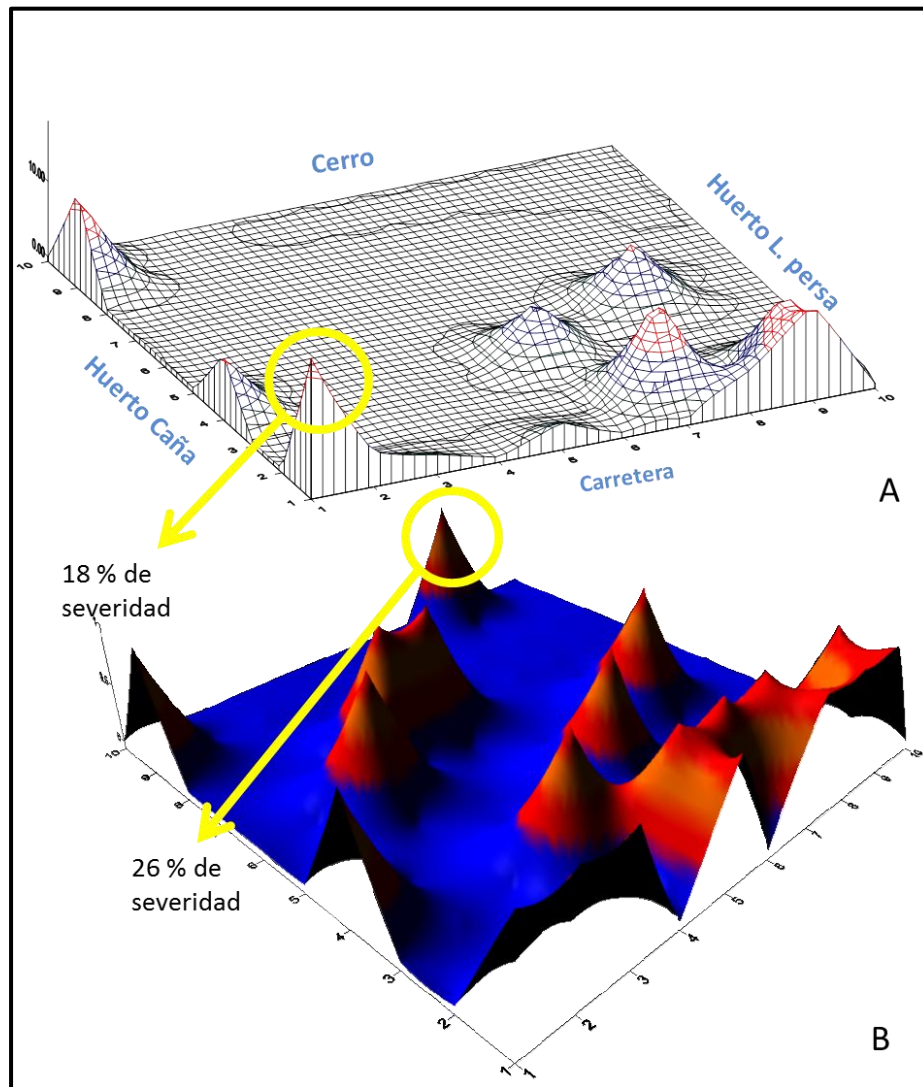


Figura 10. Mapa tridimensional de dispersión geostatísticamente interpolada de la severidad del HLB a nivel de un huerto con manejo altamente tecnificado de limón persa. Ahuacatlán, Nayarit. A) Incidencia inicial del 11% correspondiente a agosto 2010. B) Incidencia final del 18% correspondiente a enero 2011. Las flechas indican la severidad en el foco (s) más intenso.

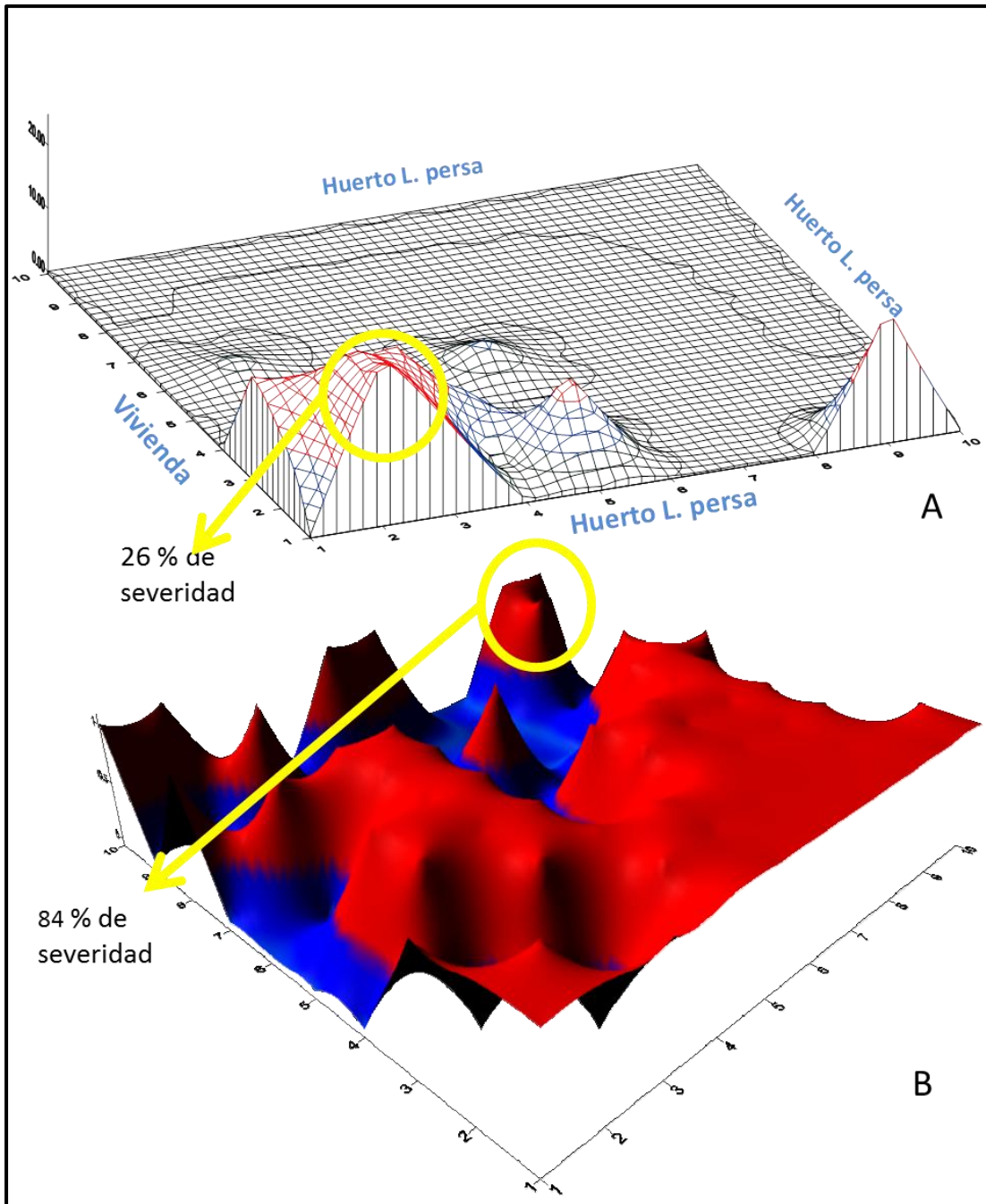


Figura 11. Mapa tridimensional de dispersión geostatísticamente interpolada de la severidad del HLB a nivel de un huerto con manejo medianamente tecnificado de limón persa. Ahuacatlán, Nayarit. A) Incidencia inicial del 7% correspondiente a agosto 2010. B) Incidencia final del 85% correspondiente a enero 2011. Las flechas indican la severidad en el foco (s) más intenso.

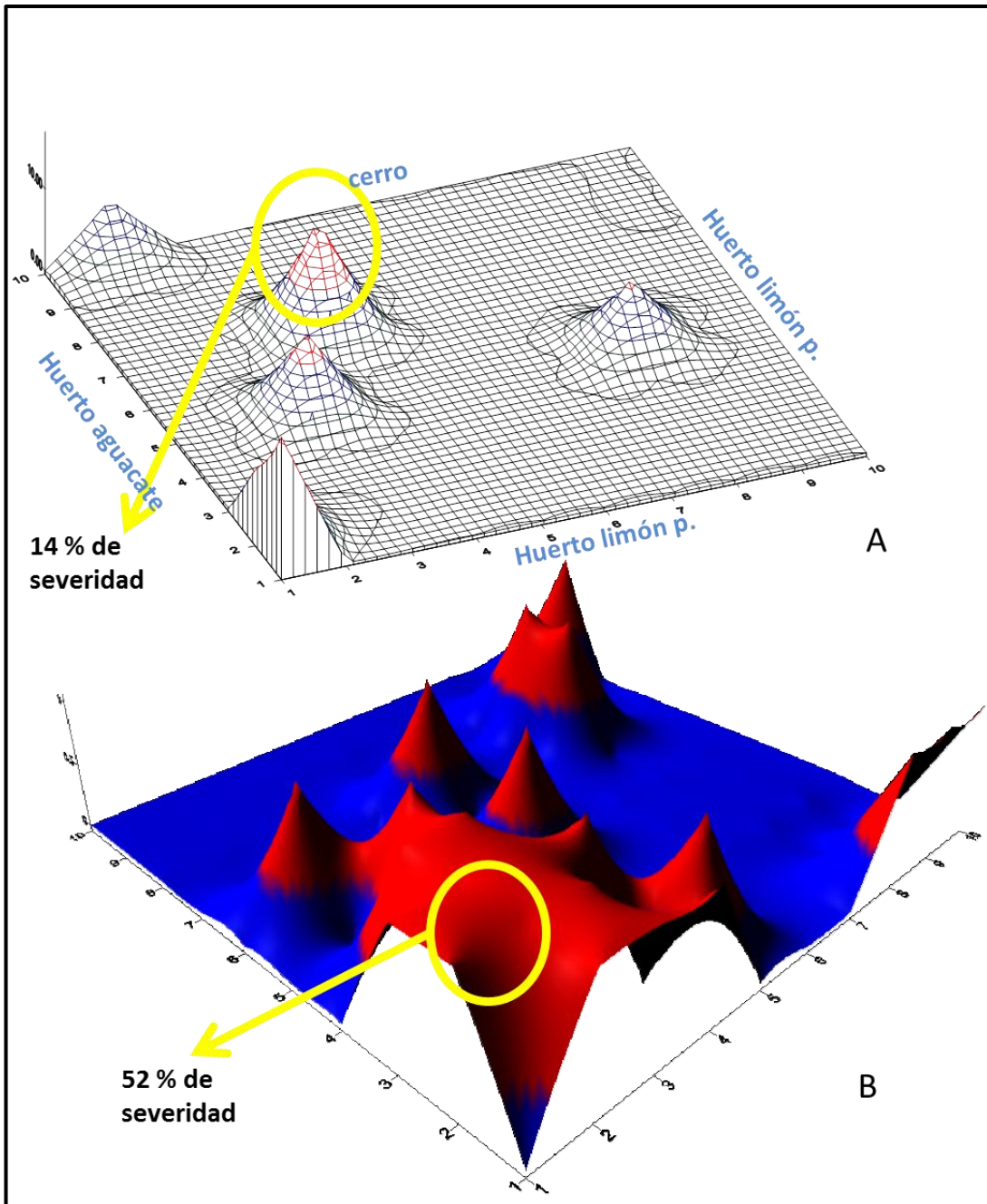


Figura 12. Mapa tridimensional de dispersión geostatísticamente interpolada de la severidad del HLB a nivel de un huerto con manejo convencional de limón persa en Ahuacatlán, Nayarit. A) Incidencia inicial 15% correspondiente a agosto 2010. B) Incidencia final 34% correspondiente a enero 2011. Las flechas indican la severidad en el foco (s) más intenso.

## V. CONCLUSIONES

Los síntomas de CLas en limón mexicano son más severos iniciando con un punteado clorótico foliar hasta un amarillamiento generalizado en hojas y dosel con la consecuente abscisión de hojas. En limón persa la progresión de síntomas fue similar pero no se observó defoliación. En naranja dulce no se presentó punteado clorótico, amarillamiento intenso, ni defoliación. A nivel microscopia fotónica, no se encontraron diferencias estructurales en la lámina foliar de hojas sintomáticas y asintomáticas de los cítricos evaluados. Los materiales sintomáticos y asintomáticos de limón persa y naranja dulce presentaron un incremento significativo en el área del floema de la nervadura central de la hoja con respecto a las diferentes durante los seis meses de la progresión de síntomas (Tukey,  $p=0.05$ ). El limón mexicano fue significativamente diferente al limón persa y naranja dulce en área y anchura de floema y área vascular (Tukey,  $p= 0.05$ ). Las hojas sintomáticas de limón mexicano y el limón persa presentaron una mayor superficie del mesófilo con acumulación de almidón, siendo significativamente diferente con respecto a la naranja dulce (Tukey,  $p=0.05$ ). Al sexto mes de la detección del síntoma, el floema de la nervadura central de hojas sintomáticas y asintomáticas de los cítricos evaluados tuvo reacción positiva a la presencia de proteínas. La concentración de proteínas fue diferente entre hojas sintomáticas y asintomáticas dentro de cada especie cítrica pero no entre ellas (Tukey,  $p=0.05$ ).

Las epidemias inducidas por CLas fueron contrastantes entre limón persa y limón mexicano y entre manejos agronómicos. En limón mexicano la huerta tuvo una incidencia final ( $Y_f$ ) del 100% mientras que en limón persa el máximo fue 85%. Estos resultados aparentemente confirman los cambios anatómicos en los cítricos agrios, en particular en limón mexicano, el cual exhibió una mayor hiperplasia y acumulación de almidón.

La enfermedad tuvo una dispersión en agregados con un marcado efecto de orilla en los diferentes huertos evaluados de limón persa. En el huerto con manejo altamente tecnificado (N-Tec) la incidencia final fue de 18% (vs 85% de N-Med), mientras que la severidad fue de 26% (46% N-Med). Esto indica que en limón persa árboles enfermos pueden expresar niveles altos de severidad independientemente de la incidencia en campo y que el manejo puede reducir la incidencia más que la expresión de síntomas. Sin embargo, es necesario estudios adicionales con respecto a la integración de prácticas efectivas y verificables. Este es el primer estudio histológico en cítricos agrios respecto al HLB e indican su alto riesgo productivo ante el reciente ingreso de CLas en México.



## VI. 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.
- Agustí F. M. 2003. *Citricultura*. 2da edición. Mundi Prensa. pp 65-88.
- Amorós C. M. 2003. *Producción de agrios*. 3ra edición. Mundi Prensa. 345 p.
- Alvarado, G. O. G. 1998. *Viroide de los cítricos: implementación de técnicas moleculares de detección y determinación de infección natural en el campo tesis de doctorado*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 86 p.
- Berisha, B., Y. D. Chhen, B. Y. Xu, and T. A. Chen. 1996. Isolation of pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. *Phytopatology* 86:119.
- Bove J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
- Calavan, E. C., D. W. Christiansen and L. G. Weathers. 1961. Comparative reactions on Orlando tangelo and Palestina sweet lime to cachexia and xiloporosis. In: *Proceedings of the Second Conference. International Organization Citrus Virologists*. Price, W. C. (ed). University of Florida. Press, Gainesville, Florida. United States. pp. 150-158.
- Cambra, M. y P. Moreno. 2000. Tristeza. In: *Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología No. 2*. Duran, V. y Moreno, P. (eds). Ediciones mundi-Prensa. Madrid España. pp 77-81.
- Cañizares C. A. E., M. E. Sanabria y E. Rojas. 2007. Anatomía del tallo de lima Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka) Stem anatomy of Tahitian lime (*Citrus latifolia* Tanaka). *Revista UDO Agrícola* 7: 221-227.

- Cerón, G. H: C. M. Gómez, y R. R. Schwentesius. 1998. Potencial de exportación de limón persa (*Citrus latifolia*) de Oaxaca. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. México. Chapingo, México. 65p.
- Curti-Díaz, S., X. Loredó – Salazar, U. Díaz – Zorrilla, R. J. A. Sandoval, y A. J. Hernández. 2000. Tecnología para producir limón persa. INIFAP – GIRGOC. Campo experimental Ixtacuaco. Libro Técnico. N° 8. Veracruz. México. 144p.
- Curtis-Patiño J. 1986. Microtecnia Vegetal. Editorial Trillas. 106p.
- Da Graça J.V. 2008. Biology, history and world Status of Huanglongbing. *In: Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido asiático de los Cítricos*. 8 de abril. Hermosillo, Sonora. pp:60-68.
- Díaz-Montenegro H. D. 2002. Fisiología de árboles frutales. Ed. AGT. 390p.
- Durán, V. N. 2000. Exocortis. *In: Enfermedades de los cítricos*. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología no. 2. Duran, V. y Moreno, P. (eds). Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 89- 90.
- El-Shafy, A., E. C. Calavan, and P. R. Desgardins. 1971. Comparative anatomy of healthy and exocortis virus-Infected citron plants. *Phytopathology* 61: 990-993.
- Esau, K. 1976. Anatomía Vegetal. Ediciones Omega, Barcelona. 765p.
- Etxeberria E, González P, Achor D, Albrigo G, 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 76–83.
- Garnsey, M.S. 1993. Other viral agents and diseases. *In: Compendium of Citrus Diseases*. APS. Press. The American Phytopathological Society. 2a edition. St Paul Mn. United States of America. pp. 51 – 52.

- Gonzalez–Sicilia, E. 1968. Morfología y anatomía. *In: El cultivo de los agrios*, Edición Revolucionaria, Instituto del Libro. pp. 235- 297.
- Gottwald, T. R., J. V. Da Graça and R. B. Bassanezi. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2007- 0906-01-RV.
- Folimonova S. Y. and S. D.Achor.2010 Early events of citrus greening (huanglongbin) disease development at the ultrastructural level. *Phytopatology* 100:09-49.
- 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.
- Lindbeck, A. G. C. and R. H. Brlansky. 2000. Cytology of fibrous from citrus blight-affected tree. *Plant Disease* 84: 164-167.
- Loeza-Kuk E. E.C. Palacios-Torres, D.L. Ochoa-Martinez, G. Mora-Aguilera, M.A. Gutierrez-Espinoza, V.J. Febres, G.A. More, and R. Alvares-Ramos. 2005. Molecular Characterization of citrus Tristeza virus isolates from Veracruzand Tamaulipas, Mexico. *In: proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. pp 407-401.
- Loeza-Kuk E., J.Jasso-Argumedo, M. Lozano-Contreras, E. Hernández-Chan. 2010. Dispersión de *CandidatusLiberibacterspp*. En huertas citrícolas de Yucatán, México.*In: 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Críticos y el Huanglongbing en México*.8 y 9 de diciembre. Monterrey, Nuevo Leon. pp: 125-134.
- 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.
- Márquez J. P.R., W. E. Kitajima, J. Freitas-Astúa and B. Appezzato-DA-Glória. 2010. Comparative morpho-anatomical studies of the lesions caused by citrus leprosis virus on sweet orange. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82: 501-511.

- Milthorpe, L. F. 1985. Introducción a la Fisiología de los Cultivos. Ed. Hemisferio Sur S.A. Argentina. 445p
- Mora, A. G., E. M. A. Gutiérrez, A. Téliz. 1998. Recursos Agrícolas del Trópico y Subtrópico Mexicano. INEGI-CP. Aguascalientes, Ags. Mexico. 184 p.
- Palacios, T. E. C. 2001. Transformación genética de pomelo cvs. Marsh y Star Ruby (*Citrus paradisi*) y naranja dulce cv. "Valencia" (*C. sinensis*) con el gen de la capa proteica del citrus tristeza closterovirus. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados, Montecillo Estado de México. 92 p.
- Robles G.M. M., Velázquez M. J. J., Manzanilla R. M. A., Orozco S. M., Flores V. R. y Medina U. V. M. 2010. Síntomas del Huanglongbing en limón mexicano. Primeras observaciones. *In: Memorias del 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México.* 8 y 9 de diciembre. Monterrey, Nuevo León. pp: 141- 149 .
- Rosetti, V., M. A. Gonzalez and L. C. Donadio. 1997. Histórico. *In: clorose variegada dos cítricos.* Donadio. L. C., and Moreira, C. S. (eds). 1ª edición. Bebedouro, Sau Paulo, Brasil. pp 1-21.
- Ruíz, E., J.M. Coronado y S.N. Myartseva. 2005. Plagas de los cítricos y sus enemigos naturales en el estado de Tamaulipas, México. *Entomología. Mex.* 4: 931-936.
- SAGARPA SIACON. 2009. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta. <http://www.limonmexicano.gob.mx/index.php?portal=limon>
- SIAP (Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2009. Anuario Estadístico Agropecuario. SAGARPA. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/arcomanuar.html>
- SENASICA-DGSV. 2010a. Protocolo de actuación para la detección del Huanglongbing. Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing.

- SENASICA-DGSV. 2010b. Situación Fitosanitaria de la Citricultura de México.
- Siddiqui. A. B. M., J.N. Guthrie, K.B. Walsh, D.T. White and P.T. Scott. 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease* 82: 1112-1120.
- Schneider H. 1968. Anatomy of greening-disease sweet orange shots. *Phytopathology* 58:1155-1160.
- Schneider, H. 1977. Indicador hosts for pear decline: symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. *Phytopathology* 67: 592-601.
- Takushi T, T.Toyozato, S. Kawano, S.Taba, A.Ooshiro, M.Numazawa. 2007. Starch method for simple, rapid diagnosis of citrus huanglongbing using iodine to detect high accumulation of starch in citrus leaves. *Annual Phytopathology Society of Japan* 73:3-8.
- Trujillo A. J. 2010. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. *In: 2º Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido Asiático de los cítricos*. Mérida, Yucatán, México. Julio 2010. pp 67-75.
- Trujillo-Arriaga, J., Sánchez-Anguiano, H. M.; Robles-García P. L. 2008. Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos en México. SAGARPA/SENASICA/Dirección General de Sanidad Vegetal.
- Uc-Varguez A., L. D. Ochoa-Martínez, E. Cárdenas-Soriano, Mora-Aguilera G. 2005. Sintomatología e histopatología del amarillamiento letal de la lima persa *Citrus latifolia* Tanaka. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 169- 175.
- Wallace J.M., 1978. Virus and virus like diseases. *The Citrus Industry* 4: 67-184.

## **VII. ANEXOS**

## Anexo 1

Cuadro 1.1. Descripción agronómica de huertos de limón persa bajo diferentes condiciones de manejo empleados para el estudio espacio temporal del HLB. Ahuacatlan, Nayarit 2010-2011.

<b>Manejo</b>	<b>Huerto 1</b>	<b>Huerto 2</b>	<b>Huerto 3</b>
	Altamente tecnificado.	Medianamente tecnificado.	Manejo. Convencional
<b>Tipo de riego</b>	Microaspersión	Goteo	Goteo
<b>Fertilización</b>	Lombricomposta al suelo cada 2 meses y foliar cada 15 días	Fertilización química y uso de estiércol 2 veces al año.	Fertilización química anual.
<b>Manejo de podas</b>	De fructificación y saneamiento (2 veces al año)	Podas de fructificación	Podas de fructificación
<b>Uso de plaguicidas</b>	Moderadamente tóxicos (piretroides), cada mes después de la floración	Altamente tóxicos después de floración	Altamente tóxicos después de floración
<b>Control malezas</b>	de Deshierbe en época de corte de fruta y herbicidas después de la poda	Herbicidas y deshierbe	no
<b>Densidad de plantación</b>	400 árboles por ha. Distancia de 6 X 6 m arreglo en 3 bolillo	400 árboles por ha. Distancia de 5 X 5 m	400 árboles por ha. Distancia de 5 X 5 m
<b>Edad</b>	5 años	2 años	5 años

## Anexo 2



Figura 2.1. Escala diagramática de severidad de síntomas de HLB dividida en ocho clases de sano = 0% a + 60% del dosel del árbol con síntomas visuales. Síntomas en limón persa. Ahuacatlán Nayarit.