

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

PROGRAMA DE POSGRADO EN INNOVACIÓN

AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

**SANEAMIENTO VEGETATIVO DE LIMÓN PERSA (*CITRUS* ×  
*LATIFOLIA*) CON HLB Y CTV MEDIANTE MERISTEMOS  
APICALES Y TERMOTERAPIA *IN VITRO*.**

Gael FRANCISCO GARCÍA MERINO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

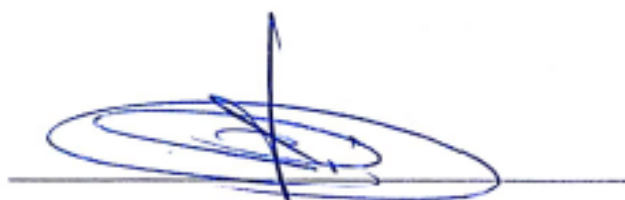
## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe Gael Francisco García Merino, Alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor(a) Dr. Francisco Hernández Rosas, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis SANEAMIENTO VEGETATIVO DE LIMÓN PERSA (*CITRUS × LATIFOLIA*) CON HLB Y CTV MEDIANTE MERISTEMOS APICALES Y TERMOTERAPIA *IN VITRO* y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Profesor Consejero(a) o Director(a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Amatlán de los Reyes, Veracruz a 12 de Julio del 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gael Francisco García Merino", written over a horizontal line. There is a small asterisk-like mark below the signature.

Firma

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a vertical line, written over a horizontal line.

Vo.Bo. del Profesor Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Saneamiento vegetativo de limón persa (*Citrus × latifolia*) con HLB y CTV mediante meristemos apicales y termoterapia *in vitro*** fue realizada por el alumno: **Gael Francisco García Merino** bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE**

CONSEJO PARTICULAR:

CONSEJERO	 _____
	<b>DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS</b>
ASESOR	 _____
	<b>DR. ODÓN CASTAÑEDA CASTRO</b>
ASESOR	 _____
	<b>DR. JOSAFHAT SALINAS RUIZ</b>

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, agosto del 2018

# SANEAMIENTO VEGETATIVO DE LIMÓN PERSA (*CITRUS* × *LATIFOLIA*) CON HLB Y CTV MEDIANTE MERISTEMOS APICALES Y TERMOTERAPIA *IN VITRO*

Gael Francisco García Merino, M.C

Colegio de Postgraduados, 2018

## RESUMEN

El limón Persa (*Citrus* × *latifolia*) presenta características sobresalientes entre las limas ácidas, carece de semillas y se cosecha fácil debido a la poca cantidad de espinas. Este cítrico es el segundo en importancia para México. Sin embargo, la producción se ve limitada por la presencia de enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias y virus. Enfermedades como el Huanglongbing (HLB) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) son descritas en la actualidad como las enfermedades más devastadoras en los cítricos, produciendo fruta de mala calidad, bajos rendimientos en campo y en muchos casos provocan la muerte de los árboles. Los informes sobre la eliminación del HLB y el CTV en limón Persa por métodos de laboratorio son escasos, por ello se propusieron dos métodos *in vitro* (regeneración de meristemos apicales y termoterapia) para el saneamiento vegetativo. Se recolectaron hojas de árboles con síntomas de las enfermedades, se determinó la presencia de HLB y CTV mediante pruebas moleculares, se tomaron segmentos nodales positivos y se regeneraron en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS). La regeneración de meristemos se llevó a cabo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético, luego se incubaron a oscuridad total y se evaluó el crecimiento de brotes y hojas a 15, 30 y 40 días, en la termoterapia se tomaron ápices de 2.5 cm a los cuales se aplicó temperaturas de 33 hasta 45 °C en tiempos de 3, 4, 5 y 6 h. Los resultados demostraron que los meristemos regenerados y los explantes sometidos a la termoterapia dieron negativo a HLB y CTV. En el saneamiento de HLB, se obtuvo en los meristemos una media de 1.5 hojas producidas y 1.19 brotes regenerados en medio MS suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> BAP y 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIA y en la termoterapia se demostró que la mejor temperatura fue de 40 °C donde se pudo generar mayor sobrevivencia, mayor número de brotes y mayor porcentaje de vitroplantas saneadas. En CTV los meristemos apicales regenerados a oscuridad por 15 días obtuvieron mayor número de brotes y hojas. En la termoterapia el tratamiento con mayor éxito fue donde se empleó 37 °C durante 4 h, promoviendo la regeneración de 4.8 brotes y 5.9 hojas por explante.

**Palabras clave:** Limón Persa, HLB, CTV, saneamiento, *in vitro*.

VEGETATIVE SANITATION OF PERSIAN LEMON (*CITRUS* × *LATIFOLIA*) WITH HLB  
AND CTV THROUGH MERITEMOS APICALES AND TERMOTERAPIA *IN VITRO*

Gael Francisco García Merino, M.C

Colegio de Postgraduados, 2018

**ABSTRACT**

Persian lemon (*Citrus* × *latifolia*) presents outstanding characteristics among acidic limes, lacks seeds and is easily harvested due to the small amount of thorns. This citrus is the second in importance for Mexico. However, production is limited by the presence of diseases caused by fungi, bacteria and viruses. Diseases such as Huanglongbing (HLB) and the Citrus Tristeza Virus (CTV) are currently described as the most devastating diseases in citrus fruits, producing fruit of poor quality, low yields in the field and in many cases cause death of the trees. Reports on the elimination of HLB and CTV in Persian lemon by laboratory methods are scarce, so two *in vitro* methods (regeneration of apical meristems and thermotherapy) for vegetative sanitation were proposed. Tree leaves with disease symptoms were collected, the presence of HLB and CTV were determined by molecular tests, positive nodal segments were taken and regenerated in Murashige and Skoog culture medium (MS). The regeneration of meristems was carried out in MS medium supplemented with different concentrations of 6-benzylaminopurine and indoleacetic acid, then incubated in total darkness and the growth of shoots and leaves was evaluated at 15, 30 and 40 days, in the thermotherapy they took apexes of 2.5 cm to which temperatures of 33 to 45 ° C were applied at times of 3, 4, 5 and 6 h. The results showed that regenerated meristems and explants subjected to thermotherapy were negative for HLB and CTV. In the sanitation of HLB, an average of 1.5 leaves produced and 1.19 regenerated shoots in MS medium supplemented with 1 mg L<sup>-1</sup> BAP and 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIA were obtained in the meristems and in thermotherapy it was shown that the best temperature was of 40 ° C where it was possible to generate greater survival, greater number of outbreaks and higher percentage of healthy vitroplants. In CTV the apical meristems regenerated in darkness for 15 days obtained a greater number of buds and leaves. In thermotherapy, the most successful treatment was where 37 ° C was used for 4 h, promoting the regeneration of 4.8 shoots and 5.9 leaves per explant.

**Key words:** Limón Persa, HLB, CTV, saneamiento, *in vitro*.

## DEDICATORIAS

Para mi **DIOS** por darme la hermosa vida que estoy viviendo y brindarme la paz necesaria para seguir llevando a cabo mi proyecto de vida.

De manera especial a mis amados **PADRES**, Elizabeth Merino Domínguez y Francisco García Peralta por darme todo su amor, comprensión y motivación para concluir este proyecto, siendo ellos el principal motor para ser alguien importante en esta vida.

Para toda la Familia **GARCÍA y MERINO** que me brindaron todo su cariño y su alegría a lo largo de este posgrado, en especial a mi hermana América y abuela Amanda que siempre me han brindado palabras de aliento para seguir siempre adelante.

A los millones de **MEXICANOS** que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación profesional.

Para todos mis amigos, en especial a **Alma, Jaime, Celia, Malú, Francisco, Alan, José, Miguel, Luís y Horacio** que me motivaban y que con sonrisas y buenos momentos me ayudaron a disfrutar más esta etapa.

“Solo Dios sabe dónde y cuándo la vida nos dirá, lo has hecho bien”.

## **AGRADECIMIENTOS**

A **CONACYT** por financiar esta investigación y otorgarme una beca para realizar satisfactoriamente mis estudios de postgrado.

Al **COLEGIO DE POSTGRADUADOS, CAMPUS CÓRDOBA** y a la **FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, ORIZABA** de la **UNIVERSIDAD VERACRUZANA** por haberme permitido realizar este proyecto en sus instalaciones y brindarme todos los servicios esenciales para hacer el presente trabajo.

A mi **CONSEJO PARTICULAR**, muchas gracias por su apoyo, sus valiosos conocimientos y experiencia, por el tiempo de calidad, paciencia y disposición que cada uno de ustedes me dedicó, su gran asesoría y aportes al proyecto.

Al **DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS** por asesorarme, escucharme y aconsejarme a lo largo del presente trabajo, así como alentarme a dar más de mí para tener una preparación más completa.

Al **DR. ODÓN CASTAÑEDA CASTRO** por creer en mí para realizar este proyecto y además por el apoyo brindado a lo largo de estos dos años.

Al **DR. JOSAFHAT SALINAS RUÍZ** por orientarme y ser paciente conmigo en la parte estadística del proyecto.

Al grupo de investigación del Dr. Odón por ayudarme a lo largo de este proyecto, a los integrantes de los laboratorios de Biotecnología, Criobiología Vegetal y BIOMA por haberme apoyado de manera ética y profesional con agradables momentos que no olvidare.

A las generaciones de la Maestría en Ciencias en Innovación agroalimentaria Sustentable “2016-2018 y 2017-2019” por ser unos extraordinarios compañeros y amigos.

**Muchas Gracias**

## CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	2
1. Objetivo general .....	4
2. Hipótesis.....	4
3. Revisión de literatura.....	5
4. Literatura citada.....	26
<b>CAPITULO I. SANEAMIENTO VEGETATIVO DE VITROPLANTAS DE <i>CITRUS</i> × <i>LATIFOLIA</i> INFECTADAS CON HUANGLONGBING</b> .....	33
1.1 Resumen .....	33
1.2 Introducción .....	34
1.3 Materiales y métodos .....	36
1.4 Resultados y discusión .....	40
1.5 Conclusión.....	45
1.6 Literatura citada.....	46
<b>CAPITULO II. SANEAMIENTO VEGETATIVO DE VITROPLANTAS DE <i>CITRUS</i> × <i>LATIFOLIA</i> CON PRESENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS..</b> 49	
2.1 Resumen .....	49
2.2 Introducción .....	50
2.3 Materiales y métodos .....	52
2.4 Resultados y discusión .....	55
2.5 Conclusión.....	61
2.6 Literatura citada.....	62
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES</b> .....	65
1. Conclusiones .....	65
2. Recomendaciones generales.....	66
3. Anexos.....	67



## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Composición de los medios de cultivo utilizados para la regeneración de meristemos de limón Persa <i>in vitro</i> .....	38
--	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol de limón Persa ( <i>Citrus × latifolia</i> ). Ubicado en la zona citrícola de Cuitláhuac, Veracruz. ....	5
<b>Figura 2.</b> Evolución anual del comercio exterior (millones de dólares) partiendo del año 2007 hasta el 2016.....	8
<b>Figura 3.</b> Hojas con síntomas de la enfermedad del HLB. Árbol situado en la zona citrícola de Cuitláhuac, Veracruz.....	9
<b>Figura 4.</b> Árbol con síntomas característicos de CTV. Árbol situado en la zona citrícola de Cuitláhuac, Veracruz.....	14
<b>Figura 5.</b> Etapas para la propagación de material vegetativo de limón Persa .....	37
<b>Figura 6.</b> Diagnóstico de la presencia de HLB en arboles de limón Persa de campo,.....	40
<b>Figura 7.</b> Supervivencia de meristemos, vitroplantas libre de HLB, hojas y brotes.....	43
<b>Figura 8.</b> Termoterapia de ápices, vitroplantas libres de HLB y número de brotes. ....	44
<b>Figura 9.</b> Diagnóstico final del HLB utilizando vitroplantas regeneradas a los 30 días después de la termoterapia.....	45
<b>Figura 10.</b> Diagnóstico de la presencia de CTV en arboles de limón Persa de campo.....	55
<b>Figura 11.</b> Supervivencia de meristemos libres de CTV, hojas y brotes a 15, 30 y 45 días.....	57
<b>Figura 12.</b> Diagnóstico final de la presencia de CTV en los meristemos apicales regenerados a los 45 días.....	58
<b>Figura 13.</b> Supervivencia de ápices libres de CTV, hojas y brotes tratados con termoterapia....	61

El presente documento consta de cuatro capítulos principales; el primero de ellos pretende introducir al lector a través de la contextualización de diversos apartados relacionados con el tema de investigación, así como dar a conocer el objetivo general y la hipótesis planteada por un servidor y los profesores investigadores que colaboraron en el proyecto. El segundo capítulo contiene la información pertinente y detallada respecto al saneamiento de la parte vegetativa que se realizó con vitroplantas con HLB. El tercer capítulo incluye la información pertinente y detallada respecto al saneamiento de la parte vegetativa que se realizó con vitroplantas con CTV. Por último, en el cuarto capítulo se encuentran las conclusiones finales, así como las referencias citadas y anexos.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En México la citricultura es una de las actividades más importantes dentro de la fruticultura del país, la producción de limón Persa (*Citrus × latifolia*) representa una importante fuente de empleos e ingresos para más de 90, 000 familias mexicanas (Esquivel, 2011) con una producción de 2, 187, 257 toneladas (SIAP, 2017), este cítrico es el segundo en importancia en el país y su producción es 861, 163.19 toneladas por año que se cultivan en una superficie de 64, 183.67 hectáreas (SIAP, 2017). El limón Persa sobresale entre las limas ácidas por sus características particulares, ya que sus frutos son de mayor tamaño en comparación a otro tipo de limones, carece de semillas por ser un triploide, haciéndolo conveniente para su consumo y además es de fácil recolección en temporada de cosecha debido a que el árbol cuenta con una menor cantidad de espinas. En otro aspecto, se ha observado que la producción de cítricos se ha visto afectada principalmente por enfermedades de importancia cuarentenaria como lo son el Huanglongbing (HLB) y el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) que han acabado con las industrias cítricas de otros países. Los cítricos como limón mexicano y limón Persa son altamente susceptibles a dichas enfermedades (Esquivel *et al.*, 2012) que son catalogadas como las enfermedades más devastadoras presentes en nuestro país, lo que representa un riesgo latente para la sustentabilidad de la citricultura mexicana (SENASICA, 2012). El número de estados cítricos con síntomas de las enfermedades en cada árbol se incrementó en árboles con pobre manejo del vector. Los brotes vegetativos nuevos, emergidos de ramas sintomáticas, crecen con apariencia vigorosa y sana, sin embargo, cuando alcanzan su madurez los síntomas característicos de las enfermedades son expresados (Robles *et al.*, 2013). En México las actividades para el control de enfermedades y plagas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-079-FITO-2000, dicta que los cultivos deben ser sembrados a partir de plantas de vivero que se encuentren certificadas y libres de enfermedades, los árboles sintomáticos así como otras plantas con potencial para ser hospedantes deben ser eliminados aplicando previamente insecticida foliar y las poblaciones de psílidos deben ser reducidas mediante el control biológico o químico (Monzó *et al.*, 2015). Para la aplicación de tecnologías que permitan obtener material vegetal sano, es necesario contar con protocolos eficientes de regeneración de material vegetal *in vitro* que involucra la diferenciación de brotes o raíces a partir de células formadas de *novo*, es decir, de estructuras no preexistentes (Litz y Jarret, 1991). En el presente trabajo se planteó como hipótesis que el uso de la termoterapia y la

regeneración de meristemas apicales, en el primer caso, la termoterapia con diferentes gradientes de temperatura y distintos lapsos de tiempo y, por otra parte, la regeneración de meristemas apicales con diferentes concentraciones de fitohormonas y periodos de tiempo en oscuridad, nos permitirá obtener vitroplantas libres de CTV y HLB. Teniendo como objetivo evaluar la respuesta de ambos experimentos para determinar si el saneamiento ha sido exitoso, es decir, libre de síntomas visuales (sintomático) de la bacteria (HLB) o del virus (CTV) por la presencia del ADN bacteriano o el ARN del virus (asintomáticos), respectivamente; determinar la metodología más eficiente en la producción de brotes y hojas.

## **1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la efectividad del saneamiento vegetativo de limón Persa (*Citrus × latifolia*) con presencia de HLB y CTV mediante técnicas estandarizadas *in vitro* como la termoterapia y regeneración de meristemos apicales.

### **1.2. Objetivos particulares**

1. Realizar el diagnóstico fitosanitario de árboles de limón Persa que presenten sintomatología de HLB y CTV.
2. Estandarizar los métodos de termoterapia y regeneración *in vitro* de meristemos apicales para lograr el saneamiento de vitroplantas de limón Persa.
3. Determinar mediante pruebas moleculares (PCR y RT-PCR) la efectividad del saneamiento en vitroplantas de limón Persa por termoterapia y regeneración de meristemos apicales.
4. Realizar comparación entre los tratamientos de termoterapia y de meristemos apicales para determinar el método más efectivo en la producción de vitroplantas libres de enfermedades (HLB y CTV), supervivencia, número de hojas y brotes.

## **2. HIPÓTESIS**

El uso de la termoterapia y la regeneración de meristemos apicales disminuye la presencia de las enfermedades HLB y CTV en vitroplantas de limón Persa y la estandarización del método permitirá una mayor supervivencia, número de brotes y hojas.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Limón Persa (*Citrus × latifolia*)

El limón Persa pertenece a la familia de las *Rutaceas*, está clasificado dentro del género *citrus*, siendo su nombre científico “*Citrus × latifolia*” y se conoce comúnmente con el nombre de lima Persa, limón Tahití o limón sin semillas. El origen de la lima Tahití es desconocido. Se presume que es un híbrido del limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y el citrón (*Citrus medica*) y es genéticamente un triploide (Morton, 1987). Es un árbol perennifolio de bajo porte y copa abierta, puede alcanzar alturas hasta de 7 metros, regularmente las ramas crecen en varias direcciones, lo cual crea la necesidad de realizar podas de formación, produce abundantes frutos, crece con una altitud máxima de 2200 msnm y posee pocas espinas en cada una de sus yemas laterales (Figura 1). Sus hojas son unifoliadas y tienen un peciolo alado pequeño (Cruz *et al.*, 2003), las inflorescencias son blancas de 5 pétalos y sus frutos se caracterizan por ser de gran tamaño ligeramente ovalados con un diámetro que oscila entre los 5 y 7 cm con cáscara gruesa y un intenso color verde (Agustí, 2003).



**Figura 1.** Árbol de limón Persa (*Citrus × latifolia*). Ubicado en la zona cítrica de Cuitláhuac, Veracruz. Fotografía tomada por Gael Francisco García Merino (2017).

Su sabor es menos ácido y posee un contenido ligeramente mayor de vitamina C comparado con el resto de los cítricos, usualmente sin semillas y raramente con una o algunas semillas, especialmente si se planta entre otras especies de *citrus*. Las flores del limón Persa no tienen polen

viable y su cosecha es más sencilla debido a la escasa cantidad de espinas que presenta (Morton, 1987).

El cultivo del limón Persa requiere de condiciones específicas de suelo y clima que son necesarias para su mejor desarrollo y producción, pero esto no significa que en ausencia de estas no podrá cultivarse, sólo se observará una disminución en la productividad (Vegas y Narrea, 2011). Las condiciones más importantes que se deben considerar son las siguientes:

- **Altitud:** La temperatura disminuye con la altitud a razón de un grado por cada 160 metros, es indispensable considerar que la altitud óptima para este cultivo es de 200 a 900 msnm.
- **Suelo:** A pesar de que existen plantaciones de limón Persa en diversas áreas del país, las condiciones del suelo varían. La formación ecológica idónea bosque húmedo tropical, con tierras ricas en materia orgánica, de textura franca, estructura permeable y de fácil drenaje. También es importante considerar que un suelo con alta concentración de pedregosidad alta limita la nutrición, el desarrollo radicular y la mecanización, por último, el limón se desarrolla mejor en suelos con pH entre 5.5 y 8.5, siendo el óptimo de 5.5 a 7.0 (Curti *et al.*, 2000), por ello, el pH se debe mantener controlado en base a la disponibilidad de varios elementos nutritivos como el fósforo, nitrógeno, calcio, potasio, magnesio, azufre y molibdeno.
- **Temperatura:** La temperatura puede influir directamente haciendo variar el periodo de floración hasta la maduración, donde se acorta en zonas de clima cálido y se alarga en regiones de climas más frescos o fríos. La temperatura óptima del cultivo es de 22 a 28 °C, con una temperatura mínima de 17.6 °C y una máxima de 38.6 °C (Curti *et al.*, 2000).
- **Precipitación:** La precipitación de las zonas en donde se encuentren el cultivo juega un papel muy importante, para tener un desarrollo adecuado en la plantación sin presentar problemas hídricos deben tenerse entre 1200 y 2000 milímetros de agua por año (Vegas y Narrea, 2011).
- **Humedad Relativa:** La humedad relativa influye en el desarrollo de la planta y en la calidad de la fruta, a mayor humedad relativa la planta transpira menos (Curti *et al.*, 2000). El efecto de la humedad relativa alta (80-90 %) se hace visible en los frutos, pues tienden a tener la piel más delgada y suave, conteniendo mayores cantidades de jugo y de mejor



calidad, pero también se tiene como desventaja que se favorece el desarrollo de enfermedades fungosas y algunas plagas.

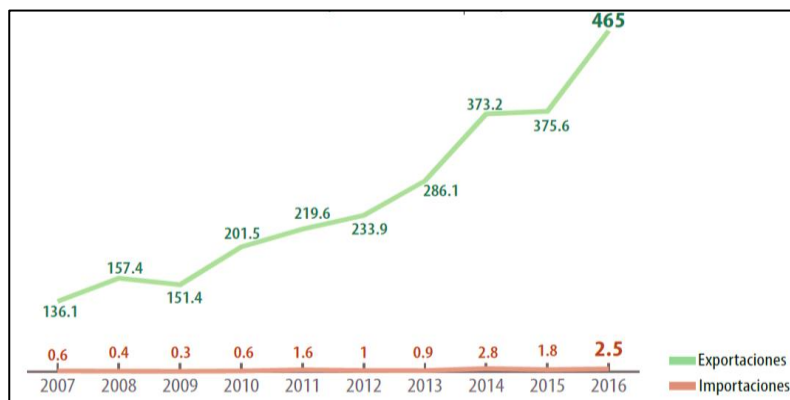
- **Viento:** Generalmente el limón Persa fructifica en las puntas de las ramas exteriores, los vientos tienen una influencia negativa debido a la caída de la flor o fruto, además de que desequilibra la copa, provocando que las ramas se quiebren, dañando su estructura y permitiendo la entrada de enfermedades (Curti *et al.*, 2000).

### 3.2 Importancia del cultivo de limón Persa en México

En la década de 1990 la producción de limas y limones a nivel mundial era de 5, 843, 100 toneladas anualmente, siendo a finales de esta misma década donde se registró una tendencia ascendiente llegando a producir hasta 8, 521, 900 toneladas, dicha tendencia fue en aumento hasta llegar al año 2007 en donde se registró un máximo de producción anual de 12, 520, 000 de toneladas y desde entonces aumenta año con año de manera considerable (FAOSTAT, 2015). Por su parte México a principios de la década de 1990 ocupaba el cuarto lugar produciendo anualmente en promedio 610, 000 toneladas de limón y fue en esta misma década donde la producción aumentó de manera notable.

Actualmente México es el segundo productor a nivel mundial de limas y limones con una producción de 2, 187, 257 toneladas. El limón Persa es el segundo cítrico de importancia en el país y su producción es de 861, 163.19 toneladas por año en una superficie de 64, 183.67 hectáreas (SIAP, 2017). El limón Persa es un frutal de gran importancia económica para el país, cada año aumenta su superficie de cultivo y actualmente se desarrolla en un gran número de estados, destacando Veracruz con el 30.8 % y Michoacán con 25.4 % de la producción, seguidos por Oaxaca con el 12.1 % y Colima con un 11.8 % (SIAP, 2017). Entre la población mexicana existe una gran preferencia por el limón mexicano, por lo que la producción del limón Persa se destina a la exportación (Curti *et al.*, 2000), siendo los principales compradores países como USA, España, Francia y Canadá. Para el mexicano la citricultura representa una de las actividades más importantes dentro de la fruticultura de nuestro país, constituye una gran fuente de empleos e ingresos para más de 90, 000 familias mexicanas, generándose aproximadamente 320 mil empleos (directos e indirectos) siendo entonces una gran actividad agrícola para la economía del país. Los empleos generados engloban todos los eslabones de la cadena productiva, que van desde la producción de plantas en viveros, producción de huertas comerciales, empaque, industria,

transporte y comercialización de la fruta o derivados de la misma (Esquivel, 2012). De acuerdo con el informe dado en el 2017 por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) el limón destaca entre los principales productos agrícolas que México exporta, generando divisas por 465 millones de dólares en 2017 (Figura 2). México en 10 años triplicó las ganancias obtenidas por la exportación de limón de acuerdo a la SAGARPA en 2017 y el estado de Veracruz se colocó como el principal productor de limón, con un volumen anual que superó las 716, 995 toneladas, generando una tercera parte de la producción a nivel nacional (SIAP, 2017).



**Figura 2.** Evolución anual del comercio exterior (millones de dólares) partiendo del año 2007 hasta el 2016. Imagen tomada del Atlas Agroalimentario 2017 (SAGARPA).

### 3.3 Enfermedades y plagas dentro del cultivo de limón Persa

La producción de cítricos se ve afectada por diferentes problemas relacionados con la producción, manejo y comercialización, siendo la producción el aspecto más importante. El limón Persa puede ser sembrado en jardines sin necesidad de un programa para el control de plagas, sin embargo, cuando se habla de su cultivo a nivel comercial se requieren medidas de control de plagas más estrictos. Existen muchas enfermedades que pueden limitar la productividad de una plantación de cítricos. La mayoría de ellas son causadas por hongos y bacterias que pueden controlarse con aplicaciones de productos químicos y atenciones culturales. Sin embargo, el manejo eficaz de estas enfermedades en el vivero hace que su manejo en el campo resulte más fácil al evitarse su diseminación (Hilje *et al.*, 1991). No obstante, es probable que los patógenos transmisibles por injerto estén presentes en todas las propagaciones de manera convencional. Estos patógenos son transmisibles por injerto o por algunos otros medios naturales, comprenden virus, viroides,

procarióticos sistémicos, bacterias, fitoplasmas y espiroplasmas. La infección de los árboles madre con estos patógenos puede ser asintomática y si no se tienen las medidas fitosanitarias adecuadas pueden tornarse destructivos en poco tiempo (Palou, 2017).

### 3.4 El Huanglongbing (HLB)

El HLB es la enfermedad más devastadora para los cítricos mundialmente (Halbert y Manjunath, 2004; Bové, 2006). En la actualidad no se conoce cura para los árboles infectados (Gottwald *et al.*, 2007), los síntomas característicos de la enfermedad se presentan en hojas que pueden confundirse con deficiencias nutricionales o incluso con el daño de plagas y otras enfermedades. No obstante, se presentan características únicas que los distingue (Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007). Al principio los árboles infectados desarrollan uno o más brotes con hojas amarillas (Figura 3), de ahí el nombre de la enfermedad del brote amarillo (Bové, 2006). Si otras ramas del árbol permanecen sanas o asintomáticas, los daños se manifiestan sectorizados. No es sencillo recabar información experimental precisa de las pérdidas de rendimiento que causa la enfermedad HLB, debido a que normalmente los árboles sintomáticos se eliminan tan pronto como dan positivo a dicha enfermedad (Magomere *et al.*, 2009), las ramas infectadas producen poco o nada de fruta comercial y además se pueden registrar pérdidas en rendimiento del 100 %.



**Figura 3.** Hojas con síntomas de la enfermedad del HLB. Árbol situado en la zona citrícola de Cuitláhuac, Veracruz. Fotografía tomada por Gael Francisco García Merino (2017).

Esta enfermedad es causada por bacterias endógenas Gram Negativas, restringidas al tubo del floema, llamadas Liberibacters, que se transmiten de un árbol a otro por insectos vectores como

psílicos de los cítricos: *Diaphorina citri* en Asia y América, y *Trioza erythrae* en África. El agente bacteriano de HLB (Lafèche y Bové, 1970) fue descubierto por microscopía electrónica en el año 1970 y prácticamente todas las especies de cítricos y cultivares comerciales son sensibles, independientemente de los portainjertos (Bové, 2006).

A pesar de que HLB está emergiendo recientemente en gran parte de América, es probablemente una de las enfermedades más antiguas conocidas de los cítricos. Reseñas sobre HLB en Asia y África han sido reportadas por Da Graça y Korsten, (2004) y Halbert y Manjunath, (2004). La enfermedad fue detectada por primera vez en Asia (China), a finales del siglo XIX (Jagoueix *et al.*, 1994) y posteriormente se reportó en África del Sur a principios del siglo XX (Jagoueix *et al.*, 1997), se diseminó a través de los años a varios países de ambos continentes y a muchas regiones citrícolas importantes. Sin embargo, para el HLB, no se conoce ningún control, excepto evitar que los árboles sean infestados por el insecto vector *D. citri* (Deng *et al.*, 2008). El número de sectores con síntomas de la enfermedad en cada árbol se incrementó en árboles con pobre manejo del vector. Los brotes vegetativos nuevos, emergidos de ramillas sintomáticas, crecen con apariencia vigorosa y sana, pero cuando alcanzan su madurez se observa el moteado simétrico característico del HLB. La reducción de rendimiento solo se presenta en ramas afectadas por HLB y cuando la cantidad de brotes vegetativos con síntomas en un árbol cubren más del 75 % de la superficie de la copa, la reducción llega a ser hasta del 50 %. La fruta que se produce en ramas afectadas por HLB, tiene un tamaño ligeramente menor que la que se genera en ramas asintomáticas. No obstante, después de dos años de observaciones no se han detectado síntomas de torcedura de frutos, maduración invertida o aborto de semilla (Robles *et al.*, 2013).

### **3.4.1 Características del insecto vector *Diaphorina citri***

El HLB es transmitido por el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) y se encuentra distribuido en prácticamente todas las zonas citrícolas de México. El psílido invadió México en marzo de 2002 y en un lapso de cuatro años su presencia se extendió por completo en las zonas citrícolas más importantes del país (Diaz *et al.*, 2014). El insecto al alimentarse de la planta es capaz de provocar defoliación y muerte de ramas, al causar daños severos en los brotes en crecimiento, reducción en el tamaño de la fruta y falta de jugo. Infestaciones altas de este insecto también originan abundantes secreciones de mielecilla que favorece la presencia y desarrollo de fumagina que afecta el vigor de los árboles al interferir la

fotosíntesis (Halbert y Manjunath, 2004). El rango de hospedantes de *D. citri* está restringido a cítricos y especies cercanas de la familia *Rutaceae* y los adultos son saltadores activos. Los huevos son de color amarillo brillante y son depositados en los brotes recién emergidos. Las ninfas son verdes o anaranjado opaco, se alimentan en hojas y tallos, y es más probable encontrar estas en brotes nuevos, por lo que frecuentemente se encuentran incrementos poblacionales durante los periodos de crecimiento activo de la planta (Halbert y Manjunath, 2004).

El ciclo de vida de *D. citri* consta de huevo, cinco estadios ninfales y adulto; a 24 °C los huevos eclosionan entre los 4.1 y 4.3 días, y sus cinco instares pueden tener una duración de 12.6 a 13.5 días, de acuerdo al hospedero que utilicen (Tsai y Liu, 2000). Las hembras sólo ovipositan en ramas tiernas y en la ausencia de éstas cesan la oviposición temporalmente. La mayor longevidad de las hembras criadas en su ambiente natural es de 54 días a 25 °C (Tsai y Liu, 2000), el ciclo completo puede variar de 18 a 50 días pudiendo existir hasta 10 generaciones al año, el adulto puede hibernar por más de seis meses y las hembras pueden poner más de 800 huevos en el transcurso de su vida (Halbert y Manjunath, 2004).

### **3.4.2 Impacto económico y situación en México del HLB**

Estimaciones recientes sobre el impacto de la enfermedad en los cítricos de México, anticipan que el HLB puede causar una reducción en el rendimiento del limón que va de 20 hasta 48 % en los primeros tres años, dependiendo del nivel de intensidad del daño; mientras que en un escenario de daño severo por HLB en los cítricos, puede causar la pérdida de 4 millones de jornales frente a un impacto bajo, y hasta 19.3 millones para un impacto alto que provocaría un grave problema en las regiones productoras (Salcedo *et al.*, 2010).

La mayoría de los estudios sobre el HLB se han realizado en regiones de clima subtropical y en otras especies de cítricos, como es el caso de Brasil (Teixeira *et al.*, 2005), Estados Unidos (Halbert y Manjunath, 2004) y China (Jagoueix *et al.*, 1994). La primera detección de HLB en el continente americano se realizó en el año 2004, en el Estado de Sao Paulo, Brasil. Posteriormente, en septiembre de 2005 se confirmó su detección en Florida, EUA; y en 2007 se informó de su presencia en Cuba. Analizando esta situación de riesgo que representaría la enfermedad para la citricultura mexicana, así como la presencia del vector en el país desde el año 2002, el HLB se relaciona al *Candidatus Liberibacter asiaticus*, la primera detección se hizo en julio de 2009, en Tizimín, Yucatán (Trujillo, 2010). Por ello, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo

Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), iniciaron durante el 2008 una campaña fitosanitaria de prioridad nacional operada por los organismos auxiliares de sanidad vegetal en las 23 entidades federativas que cuentan con cítricos de importancia comercial, con el objetivo de detectar oportunamente la enfermedad y proteger las hectáreas de cítricos existentes en el país.

La campaña se fundamentó legalmente en la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO-2009, por la que se establecen las acciones fitosanitarias para mitigar el riesgo de introducción y dispersión del HLB en el territorio nacional (Salcedo *et al.*, 2010). La campaña se fundamenta en conocer las medidas fitosanitarias que deberán aplicarse para el control del HLB y su vector, publicado el 16 de agosto del 2010, en el Diario Oficial de la Federación. La estrategia en México contra esta enfermedad y su vector, contempla la implementación de una serie de actividades fitosanitarias, donde se requirió de la participación de todos los eslabones de la cadena citrícola, principalmente de los productores y viveristas, representados por los sistemas nacionales de cítricos dulces, limón mexicano y limón Persa, donde colaboraron de manera decidida los tres niveles de gobierno, organismos auxiliares de sanidad vegetal e instituciones de investigación y enseñanza del país (Salcedo *et al.*, 2010). Dicha estrategia comprendió las siguientes acciones fundamentales:

- Monitoreo (exploración) para detección de síntomas.
- Muestreo de plantas.
- Muestreo del insecto vector.
- Diagnóstico de muestras.
- Cuarentena de zonas con presencia de HLB.
- Eliminación de plantas enfermas.
- Control del vector en cítricos de huertas comerciales y traspatios.
- Eliminación voluntaria de la limonaria (*Murraya paniculata*).
- Control del vector en limonaria.
- Producción y uso de plantas producidas en viveros certificados.
- Control de la movilización mediante la certificación fitosanitaria.
- Capacitación.
- Divulgación.
- Promoción de la coordinación y organización.

Para la realización de las acciones señaladas, durante el 2008 se destinó un presupuesto de 37.1 millones de pesos para realizar el monitoreo en 10, 670 huertos de naranja, mandarina, toronja, limón Persa y limón mexicano, correspondientes a 50, 157 ha, propiedad de 11, 033 productores, revisando un total de 5.63 millones de plantas; asimismo, se analizaron 275 muestras del vector y 44 muestras de material vegetal, todas con resultados negativos a la enfermedad (SAGARPA, 2009). En 2009, con base en el “Protocolo de actuación para la detección del HLB” y con un presupuesto de 51.4 millones de pesos, se realizaron actividades de detección, que consistieron en la revisión de 19, 623 huertos de naranja, mandarina, toronja, lima, limón Persa y limón mexicano, correspondientes a 70, 517 ha, propiedad de 18, 479 productores, revisándose un total de 10, 851, 716 plantas con base en el monitoreo de la periferia de dichas huertas; asimismo, se analizaron 3, 814 muestras del insecto vector y 166 muestras de material vegetal, además de la impartición de 1, 034 eventos de capacitación a productores, técnicos y público en general, para dar a conocer la importancia de la detección oportuna de esta enfermedad. Por otra parte, con recursos extraordinarios del SENASICA con un monto de 25.6 millones de pesos, se realizó la delimitación y el control de los focos de la enfermedad en los sitios positivos detectados durante ese año (SAGARPA, 2010). Durante el 2010 se destinó un presupuesto de 50.2 millones de pesos para esta campaña, realizando a la fecha con dicho recurso el monitoreo de 15, 374 huertos de limón mexicano, limón Persa, naranja, mandarina, toronja y lima, correspondientes a 62, 047 ha, propiedad de 14, 923 productores, revisándose un total de 7, 885, 409 plantas con base a la periferia de dichas huertas, asimismo, se han colectado y analizado 12, 370 muestras del insecto vector y 1,739 muestras de material vegetal, además de la impartición de 541 eventos de capacitación a productores, técnicos y público en general, para dar a conocer la importancia de la detección oportuna de esta enfermedad. Para la delimitación y el control de los focos detectados, se invirtieron durante ese año recursos extraordinarios del SENASICA por un monto de 77.1 millones de pesos, además de 18.1 millones de pesos para el fortalecimiento de la capacidad de diagnóstico, y 8 millones para la producción y liberación del parasitoide *Tamarixia radiata*, organismo de control biológico contra *D. citri* (SAGARPA, 2011).

### **3.5 El Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV)**

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) pertenece al género *Closterovirus* de la familia *Closteroviridae*, es causante de la “Tristeza de los Cítricos”, así como el agente causal de diversas

enfermedades en los cultivos de cítricos y con distribución en la mayoría de los países citrícolas (Rocha *et al.*, 1995). El CTV ha sido considerada como la virosis más importante y devastadora de la citricultura a escala mundial (Cambra *et al.*, 2000), llegando a causar pérdidas importantes e incluso millonarias a los agricultores. La dispersión del CTV a nuevas regiones se produce principalmente a través del movimiento de plantas infectadas o la propagación de brotes infectados. Se puede propagar por varias especies de áfidos siendo *Toxoptera citricida* su principal insecto vector (Bar-Joseph *et al.*, 1989) y no se ha observado transmisión a través de semillas (Weathers y Calavan, 1957). Dicha enfermedad afecta prácticamente a todos los tipos de cítricos, pero principalmente a la naranja, toronja, limas y limones (Agrios, 1999). La enfermedad de la tristeza produce el colapso y decaimiento de los cítricos mediante desecación y marchitamiento repentino de sus hojas (Figura 4), seguidos por la muerte del árbol o muerte descendente de sus ramas (Agrios, 1999). Aunque la enfermedad afecta a algunos árboles aun cuando se desarrollen sobre sus propias raíces, la tristeza produce daños más severos en árboles que se injertan en los patrones de otras especies, como los árboles del naranjo dulce que se desarrollan en los patrones del naranjo agrio (Agrios, 1999).



**Figura 4.** Árbol con síntomas característicos de CTV. Situado en la zona citrícola de Cuitláhuac, Veracruz. Fotografía tomada por Gael Francisco García Merino (2017).

Los síntomas de la tristeza varían en los diferentes hospedantes e incluso entre los mismos hospedantes en caso de que se desarrollen en diferentes patrones. Los síntomas típicos de esta enfermedad se pueden dividir en tres (Pedraza *et al.*, 2016):



- **Tristeza:** Siendo éste el más importante, donde ocurre un decaimiento rápido o lento; el decaimiento se caracteriza por una clorosis y defoliación de los árboles, asociado a una severa pudrición de raíces y una pérdida de material de reserva a nivel del tejido cortical bajo la zona de unión del injerto.
- **Acanaladuras en la madera:** Se caracteriza por la presencia de estrías o acanaladuras longitudinales a nivel del xilema con proyecciones puntiagudas de la corteza, que calzan perfectamente con las cavidades presentes en la madera.
- **Amarillez de plantas:** Donde ocurre una clorosis intensa y normalmente se da bajo condiciones de invernadero.

### 3.5.1 Características de los Closterovirus y el vector *Toxoptera citricida*

Los *Closterovirus* son conocidos como un grupo viral que infectan plantas de importancia económica y son productores de enfermedades devastadoras como el amarillamiento de la remolacha y la tristeza de los cítricos. Son partículas filamentosas, sin membrana de lípidos y un largo aproximado de 1250-2200 nm de longitud con 10 a 13 nm de diámetro (Agrios, 1999). Pertenecen al grupo 4 de la clasificación de Baltimore, es decir, poseen un ARN de cadena sencilla con polaridad positiva. Los miembros de este género están distribuidos mundialmente y su rango de hospedantes es amplio, afectando a especies cultivadas, tanto herbáceas como leñosas de interés agrícola y ornamental (Agrios, 1999).

Los áfidos como el pulgón café de los cítricos (*T. citricida*) que principalmente transmiten el virus de la tristeza son insectos diminutos de aproximadamente 1.25 mm de largo, pertenecen al grupo de los hemípteros al igual que las chicharras y la mosquita blanca, sus partes bucales forman un pico denominado *rostrum* que está adaptado para perforar y succionar líquidos. Tienen gran importancia en la agricultura, pues todas sus especies son herbívoras y suelen transmitir enfermedades virales (Barrientos, 2003). Tienen el cuerpo blando y su parte posterior es redondeada en forma de pera. Se caracterizan porque en la parte posterior poseen dos estructuras tubulares de color oscuro (O'Farrill, 2005). Normalmente, los áfidos no tienen alas, pero las pueden desarrollar para migrar a nuevas áreas a causa del hacinamiento o la escasez de alimento. Estos insectos se reproducen en grandes números en un tiempo relativamente corto. Pueden completar su ciclo de vida en aproximadamente 10 a 14 días, que consta de tres etapas: huevo, ninfa y adulto (O'Farrill, 2005).

Los áfidos se alimentan de las hojas, los brotes nuevos, las flores, los frutos, las ramas, los tallos y las raíces de una gran diversidad de plantas, árboles y arbustos (Agrios, 1999). También, estas plagas secretan una sustancia azucarada tipo melaza que promueve el crecimiento de un hongo negro conocido como moho de hollín. Este hongo no parasita las plantas, los árboles ni los arbustos, pero les desluce su apariencia y disminuye la acción fotosintética del follaje. Las hormigas también se alimentan de esta secreción azucarada y tienen una relación simbiótica con los áfidos. Esta relación simbiótica consiste en que las hormigas protegen a los áfidos y los transportan de una planta a otra a cambio de la secreción azucarada (O'Farrill, 2005).

### **3.5.2 Impacto económico y situación en México del CTV**

El CTV se dispersa muy fácilmente a través de *T. citricida*, los insectos vectores mayoritarios de CTV son comunes y poco agresivos, pero el virus si no se controla de una manera adecuada, podrá llegar a infectar en un futuro próximo al 100 % de los árboles en España, Israel y Estados Unidos de América (Florida y California) (Cambra *et al.*, 1999). El insecto ha provocado la muerte de más de 116 millones de árboles, establecidos sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), *T. citricida* tiene la facultad de transmitir específicamente las variantes más severas del virus. Las regiones cítricas de Brasil, Argentina, España, Venezuela, EUA (California, Florida) han sido las más afectadas en los últimos años (Patiño *et al.*, 2012). En México, de acuerdo con el reporte de SENASICA de junio del 2012, *T. citricida* se encuentra distribuido en los estados de Yucatán, Tabasco, Veracruz, Chiapas, Puebla e Hidalgo y en algunos municipios de Guerrero, Oaxaca, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Jalisco y Nayarit. A partir del 2012 SENASICA a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal, coordina la campaña contra el virus de la tristeza de los cítricos y su vector con el uso del control biológico como acción principal (Patiño *et al.*, 2012).

### **3.6 Medidas Fitosanitarias y control legal**

SENASICA ha enlistado una serie de acciones correspondientes a la normatividad aplicable al material cítrico en general, para HLB, la campaña se fundamentó legalmente en la Norma Oficial Mexicana NOM-EM-047-FITO-2009 y para CTV se encuentra la Norma Oficial Mexicana NOM-079-FITO-2002 (Pedraza *et al.*, 2016), con la que se establecen acciones fitosanitarias para mitigar el riesgo de introducción y dispersión de ambas enfermedades de los

cítricos en todo el territorio nacional. Al tratarse de plagas con alto potencial de transmisión, se recomienda la pronta acción en el momento de su detección en zonas donde las enfermedades están presentes. En México, una vez que se detectó y confirmó la presencia de insectos vectores se lleva a cabo un programa de Manejo Integrado de Plagas, descrito en la NOM-031-FITO-2000 que incluye especificaciones como las siguientes:

- Confinamiento de la plaga en área afectada y regulación de la movilización, mediante la operación de puntos de verificación interna de los cordones fitozoosanitarios o los interestatales que sean necesarios.
- Aplicación de control químico con productos autorizados por la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST).
- Liberación de insectos u otros organismos benéficos con efectividad biológica comprobada en contra de los insectos vectores.
- Intensificación del muestreo y diagnósticos fitosanitarios.
- Eliminación de plantas positivas.

México, al igual que la mayoría de los países con una amplia biodiversidad, tiene una legislación fitosanitaria conformada por una serie de normas emergentes u oficiales para impedir que lleguen al territorio nacional plagas y/o enfermedades que pondrían en riesgo su diversidad biológica (González y Macías, 2007).

### **3.7 Programas de saneamiento y certificación**

En áreas cítricas con un largo historial de producción, a menudo se seleccionan variedades locales con buen comportamiento. Existe la necesidad de obtener plantas sanas a partir de estas variedades y cultivares locales (Carrillo *et al.*, 2010). El programa de saneamiento brinda el mecanismo para identificar el buen comportamiento de los árboles deseados a partir de fuentes locales y es importante el diagnóstico del germoplasma para garantizar que esté libre de patógenos. Se deben establecerse normas cuantitativas, no subjetivas, para la selección de fuentes locales, someterlas a terapia e incluirlas en el programa de saneamiento, pero esto resulta en ocasiones caro

en términos de tiempo y recursos. Si estas fuentes seleccionadas localmente están libres de patógenos, pueden ser productivas y útiles.

Los programas de saneamiento pueden mantenerse por las instituciones gubernamentales del país, sin embargo, en muchos casos también pueden mantenerse por las universidades e incluso compañías privadas con la debida autoridad delegada por el gobierno. Para el establecimiento de un programa de saneamiento deben seguirse varios pasos:

- Selección de los árboles madres a partir de cultivares locales.
- Pruebas biológicas o moleculares de los árboles madre seleccionados.
- Obtención de plantas libres de patógenos por el método de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* y/o termoterapia.
- Pruebas biológicas o moleculares de plantas obtenidas.
- Evaluación hortícola de plantas sanas.
- Mantenimiento de plantas sanas bajo condiciones protegidas.

La mayoría de estas pruebas de diagnóstico se hacen con plantas indicadoras en condiciones controladas (Roistacher, 1991). El diagnóstico biológico debe suplementarse con procedimientos de laboratorio utilizando serología, PCR y métodos de microscopía (Roistacher 1991). Los patógenos transmisibles por injerto encontrados en árboles locales deben retenerse como colección de virus ya que son controles positivos útiles para futuros diagnósticos de laboratorio. Los árboles madre seleccionados se someten a métodos de saneamiento, bajo un método común, que es el microinjerto de ápices caulinares, pero también se utiliza la termoterapia y los métodos de embrionía nucelar *in vivo* o *in vitro* (Navarro, 1979). Los métodos de microinjerto de ápices caulinares y la termoterapia producen plantas sin caracteres juveniles. La embrionía nucelar es eficaz para eliminar patógenos transmisibles por injerto no transmisibles por semilla. Sin embargo, las plantas de origen nucelar presentan caracteres juveniles como la espinosidad (Navarro, 1986), producción tardía, crecimiento erecto y vigor excesivo. Además, no todas las plantas son idénticas a la planta madre. La evaluación hortícola de las plantas obtenidas es absolutamente indispensable. Aunque no se han encontrado informes de plantas microinjertadas con expresión de características anormales, siempre existe la posibilidad de que ocurra una mutación espontánea o que por error humano se ponga una etiqueta equivocada. Además, si la evaluación hortícola se realiza de forma tal que se incluyan los registros o historiales de campo,

esta información permite a los productores seleccionar los clones más productivos en un período de tiempo (Navarro, 1986).

Un ejemplo adecuado para la propagación de material sano, es el empleado en Florida donde los clones obtenidos que se propagan son aproximadamente 20-25 % más productivos que los clones propagados hace 30 años, por lo que la disponibilidad de esta información permite a los productores seleccionar aquellas líneas que desean plantar. Es importante el mantenimiento del germoplasma obtenido, evaluado para la detección de patógenos, para evitar su reinfección por patógenos transmisibles por injerto, se exige que las plantas saneadas se mantengan aisladas en un espacio aislado o en invernaderos. Las plantas comprendidas en un programa de saneamiento necesitan de pruebas biológicas recurrentes para determinar si en el país están presentes patógenos transmisibles (Berg, 1989).

Los programas de certificación garantizan el estatus sanitario y genético del material que se va a propagar durante el proceso de propagación comercial a través de los viveros. Los programas de cuarentena y de saneamiento brindan la fuente del material libre de patógenos y su distribución corre a cargo del programa de certificación, el cual generalmente exige de otra evaluación para verificar la ausencia de patógenos transmisibles por injerto en el área, no de patógenos exóticos. Mientras que en muchas áreas existen programas de saneamiento, pocas cuentan con programas de certificación. Los programas de California, Florida, Sudáfrica, Taiwan y Australia cuentan con los reportes más antiguos. Artículos científicos relacionados a la sanidad vegetal en cítricos han sido propuestos por Roistacher, (1977), Navarro, (1986), Rocha *et al.*, (1995) y Vidal *et al.*, (2012) que han brindado estándares adecuados para un manejo integrado de plagas en este cultivo. El punto de partida para una citricultura exitosa radica en plantar árboles sanos, especialmente en áreas donde hay insectos vectores de patógenos.

El programa de certificación puede servir de punto focal para la liberación de nuevas variedades y cultivares, para acopiar información hortícola sobre rendimientos y producción. El mantenimiento de registros es una parte importante del programa ya que permite la trazabilidad de problemas que puedan aparecer posteriormente respecto a la fuente del material o de un vivero específico (Batista *et al.*, 2008). El esquema de certificación se estructura de manera que las pruebas biológicas y las evaluaciones hortícolas, que suelen consumir mucho tiempo y son costosas, se limiten a proteger los árboles primarios de los bloques de fundación. Por lo general, existen tres bloques de árboles en un programa de certificación (Vapnek, 2009):

- **Bloque primario protegido:** Están compuestos por plantas libres de patógenos obtenidas a través de los programas de saneamiento y de cuarentena. Se verifican que posean la más alta calidad hortícola y se someten a pruebas biológicas recurrentes para verificar su condición de libres de patógenos. Estas plantas se cultivan en condiciones protegidas. Los árboles presentes en este bloque son la fuente primaria de yemas para el establecimiento de los bloques de fundación. A los árboles en este bloque debe permitírsele la producción de frutos regularmente de modo que si ocurrieran brotes aberrantes puedan detectarse (Lee y Rocha 1992).
- **Bloque de fundación:** Estos pueden establecerse en el campo, pero si están presentes los patógenos con insectos vectores, han de mantenerse en condiciones protegidas. Mantener bloques de fundación en el campo puede poner en peligro su uso como fuentes de yemas, si apareciera una nueva enfermedad. Los árboles en un bloque de fundación deben propagarse a partir de material procedente del bloque primario de fundación, someterse a ensayos biológicos regularmente y dejarse fructificar para evaluar su legitimidad hortícola.
- **Bloque de multiplicación:** Brindan un aumento catalítico del material, ya sea del bloque de fundación o del bloque primario de fundación protegido. Se utilizan para suministrar la mayoría del material vegetal utilizado en la propagación de viveros certificados. Se establece un límite de tiempo para coleccionar yemas de los bloques de fundación, con el fin de evitar la posible propagación de mutaciones no detectadas. Si los bloques de multiplicación se mantienen en el campo, el período de tiempo puede ser tan corto como 18 meses con pruebas biológicas. No se permite que los árboles fructifiquen y se les monitorea para detectar la presencia de insectos vectores de patógenos como CTV.

Por último, las plantas de vivero certificadas suelen propagarse utilizando material de los bloques de multiplicación, pero también pueden propagarse utilizando yemas de los árboles del bloque de fundación. Por lo general se cultivan en condiciones regulares de campo, siempre y cuando no estén en un área donde esté presente HLB. Los árboles pueden inspeccionarse para asegurar que cumplen con la calidad hortícola requerida según las regulaciones de certificación.

### 3.8 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales o propagación *in vitro* es el cultivo aséptico tanto protoplastos, tejidos, células y órganos vegetales (Villalobos y Thorpe, 1991). La técnica consiste en cultivar un inóculo con la capacidad de diferenciarse en un medio de cultivo balanceado con nutrientes y hormonas en condiciones asépticas, teniendo como ventaja que los individuos descendientes de la planta madre al haber sido multiplicados de manera asexual son clones, es decir, copias genéticamente idénticas (Pérez *et al.*, 2010). Se induce la formación de brotes, se multiplican y las plantas o brotes obtenidos deben someterse a un proceso de aclimatación para adaptarlas de nuevo a las condiciones *in vivo* (Castillo, 2008). Las especie o cultivos se seleccionan para ser introducidos *in vitro* según el siguiente criterio: especies que tienen problemas de regeneración *in vivo*, es decir, un bajo porcentaje de germinación, especies difíciles de propagar, especies a las que se les quiere aplicar la técnica de la ingeniería genética y especies en las que al micropropagarlas adquieren alguna característica que les hace incrementar su valor comercial (Bagot, 2005).

Existen dos tipos de crecimiento *in vitro*: I) El organizado, que comienza con una parte de la planta como son los ápices, hojas, brotes, semillas y esta parte continúa creciendo manteniendo sus características estructurales. También, es considerado crecimiento organizado cuando se desarrolla una estructura organizada a partir de un tejido desorganizado, esto es conocido como organogénesis. II) El crecimiento desorganizado, se caracteriza por que a partir de fragmentos de órganos o tejidos se forma un tejido sin estructura que contiene un número limitado de células especializadas (callo). Los callos pueden generarse en subcultivos dependiendo de las concentraciones hormonales que se le apliquen al medio de cultivo y pueden ser mantenidos durante meses o años (Castillo, 2008).

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado (Berthouly y Etienne, 2005). Con el empleo de medios de cultivos adecuados para la planta con la que se trabaje, presenta tres etapas principales: I) Establecimiento del cultivo, donde se busca establecer cultivos viables y asépticos, donde los principales procesos a controlar son la selección, aislamiento y la esterilización de los explantes. II) El desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, donde se busca aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos o subcultivos y III) la etapa de enraizamiento y aclimatación del explante, mediante la formación de raíces adventicias utilizando substratos y reguladores de crecimiento

cuando se realiza *in vitro* o para cuando se realiza el enraizamiento *ex vitro*, la aclimatación se realiza de manera simultánea asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz (Olmos *et al.*, 2006). La técnica de micropropagación *in vitro* de plantas es empleada de manera eficiente en cultivos hortícolas ornamentales y de manera reciente su aplicación se ha comenzado en especies leñosas. Presenta numerosas ventajas con respecto a los métodos convencionales de multiplicación pues se reduce el tiempo, no presenta estacionalidad, hay un incremento acelerado del número de plantas por genotipo en superficies reducidas gracias al uso de medios de cultivo enriquecidos y reguladores de crecimiento, además existe un mayor control sobre la sanidad del material propagado y por ende facilita su transporte (Rojas *et al.*, 2004).

### 3.9 Reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento vegetal son aquellas sustancias que la planta sintetiza en un lugar definido y son translocadas a otro lugar donde actuarán a concentraciones muy bajas regulando así el crecimiento, desarrollo o metabolismo vegetal (Jordán y Casaretto, 2006). De manera más específica los reguladores del crecimiento abarcan a aquellas sustancias orgánicas tanto de origen natural como de origen sintético y son clasificadas en cinco grupos dependiendo de su origen y la respuesta fisiológica que provoquen (Cerna *et al.*, 2016). Estas sustancias regulan procesos de correlación, esto es que cuando un órgano recibe un estímulo, lo amplifica, traduce y generará una respuesta en otro sitio de la planta, los reguladores de crecimiento interactúan entre ellos y con otras sustancias por medio de tres mecanismos:

- **Sinergismo:** La acción de sustancia determinada se ve favorecida por la presencia de otra.
- **Antagonismo:** La presencia de una sustancia inhibe la acción de otra.
- **Balance cuantitativo:** La acción de una sustancia determinada dependerá directamente de la concentración de otra.

Es por ello que la composición y la concentración de los reguladores del crecimiento en un medio de cultivo son factores que determinan el crecimiento y desarrollo de la mayoría de las plantas que son cultivadas *in vitro* (Guidolin, 2003).



### 3.9.1 Citocininas y auxinas

Las citocininas son sustancias producidas en cualquier tejido vegetal, primordialmente en las zonas de crecimiento como en los meristemos, los ápices de las raíces y en tejidos embrionarios (Jordán y Casaretto, 2006). Su nombre se refiere al papel que ejercen durante la división celular o citocinesis, este podría ser considerado uno de los procesos fisiológicos más importantes dentro de los organismos vegetales, debido a que este proceso antecede en importancia a la diferenciación celular (Roca y Mroginski 1991). De las citocininas se derivan adeninas que promueven la división celular en tejidos no meristemáticos, inhiben el desarrollo de raíces laterales, rompen la latencia de yemas axilares, retrasan la senescencia de los órganos vegetales, promueven la organogénesis en callos celulares, la expansión celular en cotiledones y provocan un incremento en la cantidad de cloroplastos (Taiz, 2006). El movimiento de las citocininas en la planta, consigue llevarse a cabo en diferentes direcciones, puede ocurrir con trayectoria hacia el ápice como dirigirse a la base de la planta, lo que sugiere que el movimiento de las hormonas transcurre tanto en el xilema, como, en el floema. De esta manera puede translocarse a diferentes partes de la planta ejerciendo distintas funciones regulatorias (Olmos *et al.*, 2006). La actividad de estas sustancias en las plantas se puede ver reflejada en el desarrollo continuo del crecimiento de los brotes y hojas, esto se observa principalmente en la extensión de su área foliar, que le permitirá maximizar la eficiencia fotosintética de los cultivos. Entre las citocininas más destacadas se encuentran la kinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP) y zeatina (Z). Algunas veces cuando estas se combinan con otros reguladores del crecimiento en concentraciones apropiadas en el medio de cultivo, se promueve el desarrollo de más órganos (Maceda, 2008).

Las auxinas pertenecen a un grupo de compuestos que promueven la elongación de las células, debido a que tienen en común la capacidad de producir alargamiento y elongamiento de la pared celular, se ha encontrado que también pueden promover la división celular en el cultivo *in vitro* de tejidos (Parra, 2002). La auxina principal sintetizada de manera natural por la planta es el ácido indolacético (AIA) y las concentraciones más altas son localizadas en las regiones meristemáticas en crecimiento activo. Otras auxinas que se encuentran en menores cantidades son el ácido fenilacético (PAA) y el Ácido indolbutírico (AIB). El movimiento de estas fitohormonas a través de la planta es por translocación basipétala (desde los ápices hasta las raíces) o de manera acropétala (de raíces a ápices) por medio de un mecanismo dependiente de energía (Maceda, 2008). Las auxinas tienen la cualidad de regular diversos procesos fisiológicos de las plantas, tales como

la dominancia apical, suprimiendo el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo y estimulando así el crecimiento apical de toda la planta, también contribuyen a la diferenciación de los vasos conductores (xilema y floema), inhiben la caída de hojas y estimulan la formación de raíces adventicias y tropismos (Savedra, 2008).

### **3.10 Termoterapia**

La termoterapia es un tratamiento que debe emplearse como parte de las medidas aplicadas en un programa de certificación de material propagativo libre de patógenos. Se recomienda un diagnóstico inicial, esto ayudará a comparar la condición fitosanitaria del material antes y después del tratamiento (Lelliot y Stead, 1987; Adam *et al.*, 2007). La termoterapia se basa principalmente en que los microorganismos parásitos a menudo se matan cuando se someten a temperaturas altas (Baker y Smith, 1966), es por ello, que este tratamiento se puede usar para controlar enfermedades mediante condiciones semejantes a la pasteurización para erradicar o al menos reducir la cantidad de inóculo primario que queda latente en la parte vegetativa de la planta y en semillas durante el período de inactivación (Grondeau *et al.*, 1994). La termoterapia con temperaturas altas (mayores a 32 °C) es una alternativa poco explorada en laboratorios de cultivos vegetales *in vitro*. Esto podría minimizar o evitar epidemias dentro de las plantaciones citrícolas, por este motivo, para plantar o propagar material vegetal libre de patógenos principalmente se usa la terapia de calor porque es simple y fácil de emplear. La termoterapia en el saneamiento de material vegetal surgió como una técnica complementaria a la técnica de microinjerto de ápices caulinares, ambas utilizadas en programas de saneamiento de plantas de interés comercial. Con la combinación de las técnicas es posible obtener plantas cítricas libres de virus y de otros patógenos (Navarro, 1986). Las plantas que resultan libres de patógenos específicos son candidatas para la multiplicación vegetativa. Si las plantas sometidas a pruebas están libres de un patógeno de interés, pero no de otro, es necesario realizar un tratamiento de termoterapia adicional o microinjerto de ápices caulinares (Navarro, 1979). Los países con citricultura avanzada han basado su éxito en el empleo de programas de certificación utilizando la termoterapia para obtener plantas certificadas libres de enfermedades a partir de individuos enfermos especialmente las causadas por virus u organismos similares. Estas plantas libres de virus se monitorean y se tienen en condiciones controladas para su posterior propagación (Grondeau *et al.*, 1994).

### 3.11 Innovación y sustentabilidad del proyecto

Los principales países citrícolas han tenido éxito debido a la innovación y desarrollo de nuevas técnicas dentro de laboratorios generando ciencia básica o en el campo con ayuda de personas involucradas dentro de la cadena de productividad. La innovación actualmente está definida como toda idea generada a través de conocimiento que genera valor. Por este motivo, es esencial aportar nuevos conocimientos e investigaciones que beneficien a los productores y personas involucradas en el cultivo de cítricos, debido a que problemas latentes existen en la región citrícola de Cuitláhuac, Veracruz. La innovación dentro de la propagación de material libre de enfermedades podría minimizar o eliminar algunas epidemias dentro de las plantaciones citrícolas. Otra parte fundamental está relacionada con la sustentabilidad, esta acción busca la relación costo-beneficio, siempre y cuando el impacto medioambiental se disminuya conforme a lo establecido a las normas y leyes pertinentes a cada país. El desarrollo sustentable es el resultado de una acción concertada para impulsar un modelo de desarrollo compatible con la conservación del medio ambiente y con la equidad social (Orozco y Núñez, 2013), así mismo, la sustentabilidad debe satisfacer las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades (Marcote y Suárez, 2005). La parte esencial del presente proyecto, es buscar una alternativa viable para poder obtener vitroplantas libres de enfermedades, generando un protocolo que ayude a disminuir costos y tiempo para la micropropagación *in vitro* de limón Persa. La búsqueda del mejor medio de cultivo, el mejor fotoperiodo y el mejor tratamiento de temperatura-tiempo en la regeneración de meristemas apicales y en la termoterapia son la parte fundamental de esta investigación. El uso de la terapia de calor es simple y fácil de emplear, sin embargo, no ha sido aplicada en otros trabajos de la manera en que se aplicó en la presente investigación. Los termocicladores son sistemas complejos y completos que brindan confiabilidad para el uso de esta técnica utilizando ápices menores a 5 cm, porque brinda homogeneidad en el explante y la temperatura-tiempo son específicamente controladas. Cabe aclarar que dicho equipo se encuentra en todos los laboratorios donde realizan diagnósticos moleculares, por ello es importante que se pueda buscar un uso alternativo de este instrumento para obtener más beneficios. Además, no existen reportes en cítricos utilizando una metodología similar. La producción y distribución de vitroplantas libres de HLB y CTV es necesaria para obtener plantaciones de cítricos con mejores producciones y rendimientos dentro de la zona centro del estado de Veracruz.

#### 4. LITERATURA CITADA

- Adam, M. A. M., Phillips, M. S. and Blok, V. C. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Plant Pathology* 56(1): 190–197.
- Agusti F. M. 2003. *Citricultura*. 2da edición. Mundi Prensa. Madrid, España. 65–88 p.
- Bagot, M. E. 2005. El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Horticultura internacional* (1): 50–57.
- Baker, K. and Smith, S. H, 1966. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 4(1): 311–332.
- Bar-Joseph, M., Che, X., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Ayllón, M., Albiach-Martí, M., Garnsey, S. M. and Dawson, W. O. 2002. The continuous challenge of Citrus Tristeza Virus molecular research. Fifteenth IOCV Conference, 2002.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M. and Gonsalves, D, 1979. The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv Virus Res* 25: 93–168.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., and Lee, R. F. 1989. The continuous challenge of Citrus Tristeza Virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27(1): 291–316.
- Barrientos L. Z. 2003. *Zoología general*. Primera edición 2003, Editorial Universidad Estatal a Distancia San José. 285–290 p.
- Batista, L., Peña, I., López, D., Pérez, J. and Llauger, R. 2008. *Técnicas de diagnóstico de enfermedades que afectan a los cítricos*. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. La Habana, Cuba. Consejo Estatal Citrícola (CONCITIVER).
- Berg, G.H. 1989. *La cuarentena vegetal teoría y práctica*. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). 440 p.
- Berthouly, M., and Etienne, H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. 165–195 p.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive newly-emerging century-old disease of citrus. *J Plant Pathol* 88: 7–37.
- Cambra, M., and Moreno, P. 2000. Tristeza. *Enfermedades de los cítricos*. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología (2): 77 –81.

- Cambra, M., Gorris, M. T., Camarasa, E., Román, M. P., Narváez, G., Terrada, M. E. and Torres, M. A. 1999. Inmunoimpresión-ELISA: método ideal para detección del Virus de la Tristeza de los Cítricos. *Agraria. Revista de Información Técnica*. 12–13 p.
- Cambra, M., Gorris, M. T., Marroquin, C., Román, M. P., Olmos, A., Martínez, M. C. and Navarro, L. 2000. Incidence and epidemiology of Citrus Tristeza Virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Research* 71(1–2): 85–95.
- Carrillo J. M., Díez M. J., Pérez V. M. and Nuez F. 2010. Los recursos fitogenéticos en la mejora genética vegetal. *Mejora genética y recursos fitogenéticos: Nuevos avances en la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España. 9–49 p.
- Castillo, A. 2008. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Unidad de Biotecnología, Volumen 1*. 1–15 p.
- Cerna, M., Aucapiña, C. and López, P. 2016. Definición de protocolos para el uso de fitohormonas en el crecimiento de orquídeas a nivel *in vitro*. In *ESPE: Revista Congreso de Ciencia y Tecnología Vol. 11*. 12–19 p.
- Cruz, D. S., Urbina, S. D., Basurto, V. I. and Montie, S. F., 2003. Análisis de estacionalidad de la producción y precios en el mercado de productos hortofrutícolas y frijol. *SAGARPA. México, D. F.* 25–30 p.
- Curti, S. A., Loredó, X., Díaz, U., Sandoval, R. J. A. and Hernández, H. J. 2000. Tecnología para producir limón Persa. *INIFAP-CIRGOC. Campo Experimental Ixtacuaco. Veracruz, México DF. Libro Técnico Núm. 8. Veracruz, México*. 144 p.
- Da Graça, J. V. and Korsten, L. 2004. Citrus Huanglongbing: Review, present status and future strategies. In *Diseases of fruits and vegetables volume I*. 229–245 p.
- Deng, X., Chen, J., Feng, Z., Shan, Z., Guo, H., Zhu, J. and Civerolo, E. L. 2008. Identification and characterization of the Huanglongbing bacterium in pummelo from multiple locations in Guangdong, PR China. *Plant disease* 92(4): 513–518.
- Díaz, G., López, J. I., Sánchez, I., Guajardo, R. A., Mora, G. and Quijano, J. Á. 2014. Áreas de abundancia potencial en México del vector del Huanglongbing, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(7): 1137–1153.
- Esquivel, C. F. 2011. Análisis Histológico y epidemiológico del limón mexicano y limón Persa asociados a síntomas del HLB (Huanglongbing). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México. 56 p.
- Esquivel, F., Valdovinos, G., Mora, G., Gómez, R., Velázquez, J. J., Manzanilla, M. A., Flores J. L. and López J. I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769–782.

- FAO (2017) <http://www.fao.org/home/es/>, citado en marzo del 2018.
- FAO (2017) <http://www.fao.org/home/es/>, citado en marzo del 2018.
- Food and Agricultural Data (FAOSTAT) 2015. Principales productores de limones y limas en el mundo. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Citado en marzo del 2018
- González C. H. and Macías M. A. 2007. Vulnerabilidad alimentaria y política agroalimentaria en México. *Desacatos* (25): 47–78.
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V. and Bassanezi, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress* 6(1): 1–18.
- Graca, J. D. 1991. Citrus greening disease. *Annual Review of Phytopathology* 29(1): 109–136.
- Grondeau, C., Samson, R. and Sands, D. C. 1994. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(1): 57–75.
- Guidolin, A. 2003. Regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos y transformación genética via *Agrobacterium*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. PIRACICABA-Sao Paulo. Brazil.
- Halbert, S. E. and Manjunath, K. L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida entomologist* 87(3): 330–353.
- Hilje, L., Araya, C., Scorza, F. and Víquez, M. 1991. Plagas y enfermedades forestales en América Central: manual de consulta y guía de campo. CATIE.
- Jagoueix, S., Bové, J. M. and Garnie, M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease is a member of the  $\alpha$ -subdivision of the Proteobacteria. *Int J syst Bacteriol* 44: 379–386.
- Jagoueix, S., Bové, J. M. and Garnier, M. 1997. Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic region of *Candidatus liberobacter asiaticum* and *Candidatus liberobacter africanum*, the two species associated with citrus Huanglongbing (greening) disease. *Int J Syst Bacteriol* 47: 224–227.
- Jordán, M., and Casaretto, J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Squeo, F, A., and Cardemil, L.(eds.). *Fisiología Vegetal* 1–28.
- Lafleche, D. and Bové, J. M. 1970. Mycoplasmas in citrus fruits with greening, stubborn or similar diseases. *Fruits* 25(6): 455–465.

- Lee, R. F. and Rocha M. A. 1992. Citrus Tristeza Virus. In: Plant Diseases of International Importance. (Eds. A.N. Mukhopadhyay, H.S. Chaube, J. Kumar and U.S. Singh) Prentice Hall, New Jersey, Vol. III: 226–249.
- Lelliot, R. A. and Stead, D. E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants. Blackwell Sc. Pub. 215 p.
- Maceda, A. and González, I. 2008. Hormonas vegetales. Consultado en: <http://preupsubiologia.googlepages.com/ecolog%C3ADahormonasvegetales>.
- Magomere, T. O., Obukosia, S. D., Mutitu, E., Ngichabe, C., Olubayo, F. and Shibairo, S. 2009. Molecular characterization of *Candidatus Liberibacter* species/strains causing Huanglongbing disease of citrus in Kenya. Electronic Journal of Biotechnology 12(2).
- Marcote, P. V., and Suárez, P. A. 2005. Planteamiento de un marco teórico de la Educación Ambiental para un desarrollo sostenible. Revista electrónica de enseñanza de las ciencias 4(1): 1–16.
- Morton, J. F. 1987. Fruits of warm climates. J F Morton Tahiti Lime. 172–175 p.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473–497.
- Navarro, L. 1979. Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Boletín del servicio de plagas 5: 127–148.
- Navarro, L. 1986. Citrus certification in Mediterranean countries. EPPO Bulletin 16(2): 227–238.
- Navarro, L. and Juarez, J. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative bud-wood. II. *In vitro* propagation. Proc Intl Soci Citriculture 3: 973–987.
- Navarro, L., Ballester, L. F., Juarez, J., Pina, J. A., Arrengnic, J. M. and Bono, R. 1981. Development of a programme for disease free citrus from citrus bud-wood in Spain, In: Proc. Intl Soci Citriculture. 70–73 p.
- Navarro, L., Roistacher, C. N. and Murashige, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. J Amer Hor Soc 100: 471–479.
- O'Farrill, H. and Buitrago, M. 2005. Las plagas del hogar y jardín. Servicio de extensión agrícola Universidad de Puerto Rico.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. and Terrada, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. Nucl. Acids Res 27(6): 1564–1565.

- Olmos, S., Luciani, G. and Galdeano, E. 2006. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Argentina. 351–357 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2017. <http://www.fao.org/home/es/>. Citado en marzo del 2018.
- Orozco A. J. and Núñez M. P. 2013. Las teorías del desarrollo. En el análisis del turismo sustentable. *InterSedes: Revista de las Sedes Regionales* 14(27).
- Palou, L. 2017. Investigación aplicada en patología de poscosecha de fruta fresca en el Centre de Tecnologia Postcollita (CTP) del Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA). *Horticultura* (331): 38–44.
- Parra, R. 2002. Las hormonas vegetales. Apuntes de biología. Consultado en: <http://biologia-en-internet.com/apuntes-biologia/5/las-hormonas-vegetales/>.
- Patiño, S. A., Rodríguez, E., Mora, G., Lomelí, R. and Díaz, O. 2012. Composición y fluctuación de áfidos vectores del virus de la tristeza de los cítricos en la Península de Yucatán, México. *Entomología Mexicana* 11: 370–374.
- Pedraza M. R, Ponce J. L., Quintanar E. A, Valdés D. and Villareal G. 2016. Una amenaza agrícola mundial: El Virus de la Tristeza de los Cítricos y su vector el pulgón café *Toxoptera citricida*. *Artrópodos y salud*. 30–36 p.
- Pérez, O., Tallón, C. I. and Porras, I. 2010. An efficient protocol for micropropagation of lemon from mature nodal segments. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. Vol. 100: 263–271 p.
- Robles, M. M., Velázquez, J. J., Manzanilla, M. Á., Orozco, M., Medina, V. M., López, J. I. and Flores, 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.
- Roca, W. M. and Mroginski, L. A. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. 19 p.
- Rocha, M. A., Lee, R. F., Lastra, R., Niblett, C. L., Ochoa, F. M., Garnsey, S. M. and Yokomi R. K. 1995. Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in Caribbean and Central and North América. *Plant Disease* 79: 437–445.
- Roistacher, C. N. and Calavan, E. C. 1974. Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm glasshouse temperatures. *Pl Dis Rep* 58: 850–3.
- Roistacher, C. N. 1977. Elimination of citrus pathogens in proogative budwood. I. Budwood selection, indexing and thermotherapy. *Proc Int Soc Citrucult* 3: 965–972.



- Roistacher C. N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Rojas, G. S., García, L. J. and Alarcón, R. M. 2004. Propagación Asexual de Plantas. CORPOICA. Colombia. 31–33 p.
- Salcedo, D. 2010. Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana (No. IICA H20–50). IICA, México DF (México).
- Salcedo, R., Hinojosa, G., Mora, G., Covarrubias, G. I., De Paolis, F., Cíntora, G. C. and Mora, F. S. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 141 p.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2010. Protocolo de actuación para la detección del Huanglongbing. México: Dirección General de Sanidad Vegetal. <https://www.gob.mx/sagarpa>. Consultado el 06 de mayo de 2018.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. <https://www.gob.mx/siap/>, Consultado en marzo del 2018.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. <https://www.gob.mx/siap/>, Consultado en marzo del 2018.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2002. <https://www.gob.mx/senasica>. Consultado el 06 de mayo de 2018.
- SIAP (2016) <https://www.gob.mx/siap/>, citado en marzo del 2018.
- SIAP (2017) <https://www.gob.mx/siap/>, citado en marzo del 2018.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Ethylene: The Gaseous Hormone. In: Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. 567–586 p.
- Teixeira, C. D., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., Ayres, A. J. and Bové, J. M. 2005. *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus Huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55(5): 1857–1862.
- Trujillo, A. J. 2010. Situación Actual, Regulación y Manejo del HLB en México. Memorias del 2º Taller Internacional del Huanglongbing y el Psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México. 141–149 p.
- Tsai, J. H. and Liu, Y. H. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. Journal of Economic Entomology 93(6): 1721–1725.

- Vapnek, J, 2009. Legislatively Establishing a Health Certification Programme for Citrus. FAO Legal Papers Online.
- Vegas, U. and Narrea, M. 2011. Manejo integrado del cultivo de limón. Jornada de Capacitación. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. 43 p.
- Vidal, E., Moreno, A., Bertolini, E., Martínez, M. C., Corrales, A. R. and Cambra, M. 2012. Epidemiology of Citrus Tristeza Virus in nursery blocks of *Citrus macrophylla* and evaluation of control measures. Spanish Journal of Agricultural Research 10(4): 1107–1116.
- Villalobos, V. M. and Thorpe, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura 127–141.
- Weathers, L. G. and Calavan, E. C. 1957. Nucellar Embryony-A Means of Freezing Citrus Clones of Viruses. In International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings, Vol. 1, No. 1, 1957–2010.

# CAPITULO I. SANEAMIENTO VEGETATIVO DE VITROPLANTAS DE *CITRUS* × *LATIFOLIA* INFECTADAS CON HUANGLONGBING

Gael Francisco García Merino<sup>1</sup> • Odón Castañeda Castro<sup>2</sup> • Josafhat Salinas Ruiz<sup>1</sup> • Stephanie Hernández González<sup>2</sup> • Luis Alberto Solano Rodríguez<sup>3</sup> • Francisco Hernández Rosas<sup>1\*</sup>

## 1.1 RESUMEN

El limón Persa (*Citrus* × *latifolia*) es el segundo cítrico de importancia en México y sobresale por el tamaño de sus frutos y la carencia de semillas. En nuestro país, el Huanglongbing (HLB) se asocia al *Candidatus* *Liberobacter asiaticus* que se detectó por primera vez en julio del 2009, en Yucatán. Los informes sobre la eliminación del HLB por métodos de laboratorio son escasos, por ello se propusieron dos métodos *in vitro* (regeneración de meristemas apicales y termoterapia) para el saneamiento. Se recolectaron hojas de árboles con síntomas de la enfermedad, para la detección del HLB se utilizó la metodología descrita por Jagoueix *et al.* (1996), se tomaron segmentos nodales positivos y se regeneraron en medio de cultivo MS. La regeneración de meristemas se llevó a cabo en cuatro medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indolacético (AIA), para la termoterapia se tomaron ápices de 2.5 cm que se incubaron a 40 °C y 45 °C en diferentes tiempos: 2, 4 y 6 h dentro de un termociclador. Los resultados demostraron que los meristemas y los explantes sometidos a la termoterapia dieron negativo a HLB. Además, los meristemas en medio de cultivo suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> BAP y 0.5 mg L<sup>-1</sup> AIA obtuvieron una media de 1.5 hojas producidas y 1.19 brotes regenerados, por parte de la termoterapia se demostró que la mejor temperatura fue de 40 °C donde se pudo generar mayor sobrevivencia, mayor número de brotes y mayor porcentaje de vitroplantas libres de HLB.

**Palabras Clave:** • Limón Persa • HLB • *Candidatus* *Liberobacter asiaticus* • *in vitro* • Meristemas apicales • Termoterapia.

---

(✉) Francisco Hernández Rosas. [fhrosas@colpos.mx](mailto:fhrosas@colpos.mx). <sup>1</sup> Colegio de postgraduados (COLPOS), Veracruz, México. <sup>2</sup> Universidad Veracruzana (UV), Veracruz, México. <sup>3</sup> Producción Genética Agropecuaria de México S.P.R. de R.L. de C.V. (PROGAMEX), Veracruz, México.

## 1.2 INTRODUCCIÓN

México es el segundo productor a nivel mundial de limas y limones con una producción de 2,187,257 toneladas (SIAP 2017). El limón Persa (*Citrus × latifolia*), presenta características importantes entre las limas ácidas, sus frutos son ligeramente ovalados con un diámetro que oscila entre los 5 y 7 cm, carece de semillas y la cosecha es más sencilla debido a la menor cantidad de espinas que presenta (Morton 1987). Este cítrico es el segundo en importancia en México y su producción es de 861,163.19 toneladas cosechadas por año en una superficie de 64,183.67 hectáreas (SIAP 2017). Sin embargo, la producción se ve limitada por la presencia de enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias y virus. Un problema que se presenta actualmente en la citricultura a nivel mundial es la enfermedad del Huanglongbing (HLB), causada por las bacterias: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus* (Jagoueix *et al.* 1994; Jagoueix *et al.* 1997) y *Candidatus Liberibacter americanus* (Teixeira *et al.* 2004), reconocidas como bacterias Gram negativas no cultivadas (Benyon *et al.* 2013) que se localizan en los tubos del floema (Garnier *et al.* 1984). Estas bacterias afectan a diferentes especies de cítricos al producir fruta de mala calidad, bajos rendimientos en campo y acorta la vida del árbol (Bové 2006). Estudios filogenéticos de la región 16S rRNA indican que *Candidatus Liberibacter* pertenece a las  $\alpha$ -proteobacterias y está relacionada con los géneros del subgrupo  $\alpha$ -2 proteobacteria: *Bartonella*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Brucella* y *Alfipia* (Jagoueix *et al.* 1994). En México, HLB se relaciona al *Candidatus Liberibacter asiaticus* y la primera detección se hizo en julio de 2009, en Tizimín, Yucatán (Trujillo 2010). Este patógeno se transmite y dispersa por el insecto *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Halbert y Manjunath 2004; Hall *et al.* 2013). En febrero del 2015, 23 de los 25 estados que integran la citricultura nacional confirmaron la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* principalmente en insectos vectores, árboles productores y árboles de traspatio. La mayor severidad de síntomas fisiológicos e histológicos causados por el HLB se encuentran en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm*) y limón Persa, estos cítricos presentan síntomas en hojas que incluyen puntos cloróticos, manchas angulares, engrosamiento de nervaduras, moteado, clorosis difusa hasta el amarillamiento generalizado en la lámina foliar y defoliación. A nivel histológico se observa un incremento de almidón en el mesófilo de limón Persa y limón mexicano (Chávez *et al.* 2012). La información sobre el impacto destructivo del HLB en México con sustento epidemiológico y cuantitativo es escasa; los estudios existentes estimaron el impacto con base en el número de

plantas erradicadas y costos por control del vector en cítricos (Brlansky *et al.* 2009). Se han estimado pérdidas en producción mediante métodos multivariados y epidemiología comparativa a tres y cinco años en toda la cadena productiva de limón Persa y limón mexicano con 17.6 % y de naranja dulce del 57.6 % (Salcedo *et al.* 2010). Una alternativa que se utiliza para el manejo fitosanitario del cultivo de limón Persa en el país, es la propagación de material vegetal libre de enfermedades, con el establecimiento de viveros certificados, lo que asegura en cierta medida la productividad de los cultivos agrícolas. Propagar vegetativamente las plantas de manera tradicional las vuelve más propensas a acumular patógenos, que se transmiten a nuevos cultivos a través de esquejes, injertos y otros propágulos vegetativos con apariencia de estar libres de enfermedades. Actualmente el HLB está siendo controlado principalmente a través de la producción de plantas sanas, pero las investigaciones sobre la eliminación del HLB en cítricos por métodos de laboratorio son escasos. Las técnicas *in vitro* son muy útiles para la conservación y multiplicación de la biodiversidad de las plantas (Engelmann 2011). En practica, el injerto con punta de meristemo (Navarro 1979) y el tratamiento térmico combinado con antibióticos (Zhao *et al.* 1981; Luo 1991) han sido los utilizados con éxito en el pasado para terapia *in vitro* contra HLB. Sin embargo, con el injerto de punta de meristemo el éxito de la toma del injerto es proporcional al tamaño de la punta meristemática extirpada, mientras que en la erradicación del patógeno la tasa es inversamente proporcional al tamaño del explante (Faccioli y Marani 1998), pese a estas limitantes, en México el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Querétaro, A.C (CESAVEQ) emplea la técnica de microinjertos con punta de meristemo, que fue reportada por (Navarro 1979) donde evaluó la eliminación de todas las virosis de los agrios, y de acuerdo a Ding *et al.* (2008) esta técnica es efectiva en 25.3 % para eliminar HLB. Actualmente, las técnicas más eficientes para el saneamiento del HLB se basan en eliminar a la bacteria con temperaturas bajas o altas, en este caso, Ding *et al.* (2008) obtuvieron vitroplantas de naranja dulce, limón y pomelo libres de HLB mediante la técnica de vitrificación-criopreservación, con la que solo pequeñas áreas de la cúpula meristemática sobrevivieron al proceso de criopreservación, lo que aumento la probabilidad de regenerar células libres de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Células con grandes vacuolas y alto contenido de agua son más propensas a ser infectadas y aparentemente no pueden sobrevivir a la congelación en nitrógeno líquido. Por el contrario, pequeñas células con citoplasma denso ubicado en las capas superiores del meristemo tienen menos probabilidades de ser invadidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* y sobrevivir a la congelación en nitrógeno líquido. Pese a lo

obtenido en la técnica, las vitroplantas de limón presentaron el rango más bajo en supervivencia con un 69.3 % y en explantes libres de HLB con un 90.9 %. La termoterapia con temperaturas altas es una alternativa poco explorada en laboratorios de cultivos vegetales, por ello, en la presente investigación se propone el uso de la termoterapia bajo condiciones de regulación de temperatura en un termociclador, con la finalidad de controlar la homogeneidad de la temperatura en los explantes y tener mayor precisión en los intervalos de tiempo programados para los experimentos. Los microorganismos parásitos a menudo se matan cuando se someten a temperaturas altas (Baker y Smith 1966), es por ello, que este tratamiento se puede usar para controlar enfermedades mediante condiciones semejantes a la pasteurización para erradicar o al menos reducir la cantidad de inóculo primario que queda latente en partes de plantas vegetativas y en semillas durante el período de inactivación (Grondeau *et al.* 1994). Esto podría evitar o minimizar las epidemias en dentro de las plantaciones cítricas, por estos motivos, para plantar o propagar material vegetal libre de patógenos principalmente se usa la terapia de calor porque es simple y fácil de emplear.

### **1.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Material vegetal**

En enero del 2017 se recolectaron hojas de árboles con posibles síntomas de la enfermedad HLB tales como amarillamiento en hojas, decaimiento, defoliación y desarrollo lento (Figura 5A) en huertos ubicados en la zona cítrica de Cuitláhuac, Veracruz, México.

#### **Detección de HLB**

La detección de HLB se realizó mediante la técnica de PCR anidada y siguiendo la metodología descrita por Jagoueix *et al.* (1996) se amplificó y observó una banda de 1160 pb. Se utilizó el primer *OI2c* (5'-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3') extraído a partir de la secuencia 16S rDNA de *Ca. L. asiaticus* cepa Poona, India (Jagoueix *et al.* 1994; Jagoueix *et al.* 1997) y el primer *OAI* (5'-GCG CGT ATT TTA TAC GAG CGG CA-3') extraído a partir de la secuencia 16S rDNA de *Ca. L. africanus* cepa Nelspruit, Sudáfrica (Planet *et al.* 1995). La PCR se realizó en 50 µL con la mezcla de reacción siguiente: 5 µM de cada uno de los primers, 200 µM de dNTP'S, 78 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 17 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM βmercaptoetanol, 0.05 % W1 detergente (Gibco BRL®), 200 gm L<sup>-1</sup> y 2.5 U de My Taq™ DNA polimerasa (Bioline®). La amplificación de ADN se realizó en termociclador programando a 94 °C durante

45 s (desnaturalización), 64 °C durante 45 s (alineamiento) y 72 °C durante 120 s (elongación) a 35 ciclos. Se analizaron las seis muestras en una cámara de electroforesis (BioRad®) en geles de agarosa al 0.7 % teñidos con bromuro de etidio, se revelaron los geles en un transiluminador UV (UVP PhotoDoc-It™ Imaging System de Analytikjena®). Además, se utilizó como control positivo una muestra de HLB proporcionada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) y como control negativo agua HPLC.

### **Regeneración de plántulas *in vitro* de limón Persa**

Segmentos nodales de árboles positivos se regeneraron *in vitro* con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) (Figura 5B) suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de kinetina (KIN) (Anexo A) y se colocaron en incubación durante ocho semanas en fotoperiodo de 16:8 h (luz-oscuridad) a 25 °C



**Figura 5.** Etapas para la propagación de material vegetativo de limón Persa. A) Hojas con sintomatología de HLB en árboles de limón Persa y B) Explante a las ocho semanas de regeneración *in vitro*.

### **Regeneración *in vitro* de meristemos apicales**

La regeneración se llevó a cabo tomando la parte aérea de las yemas (incluyendo dos primordios foliares) de las vitroplantas positivas para HLB, y se colocaron en el Medio MS (Anexo B) en distintas concentraciones de fitohormonas como ácido indolacético (AIA) y BAP (Cuadro 1), colocando los explantes en incubación durante 45 días en fotoperiodo de 16:8 h (luz-oscuridad) a 25 °C.

**Cuadro 1.** Composición de los medios de cultivo utilizados para la regeneración de meristemas de limón Persa *in vitro*

<b>Tratamiento</b>	<b>BAP (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>AIA (mg L<sup>-1</sup>)</b>
MSN	0	0
MSBA1	0.1	0.1
MSBA2	0.5	0.25
MSBA3	1	0.5

### **Termoterapia de ápices**

Vitroplantas de limón Persa provenientes de segmentos nodales positivos a HLB con un tamaño de 2.5 cm se les cortaron las hojas e individualmente se colocaron dentro de tubos con capacidad para 200  $\mu$ L que contenían 120  $\mu$ L de medio MS sin fitohormonas, los explantes se colocaron en un termociclador (Axygen® MaxyGene Thermal Cycler II) y posteriormente se realizó la termoterapia en distintas temperaturas: Tr1 (40 °C - 2 h), Tr2 (40 °C - 4 h), Tr3 (40 °C - 6 h), Tr4 (45 °C - 2 h), Tr5 (45 °C - 4 h) y Tr6 (45 °C - 6 h). Los explantes se regeneraron en incubación de 30 días en un fotoperiodo de 16:8 h (luz-oscuridad) a 25 °C.

### **Diseño experimental**

En el presente trabajo se utilizaron dos diseños experimentales: 1) Para meristemas se empleó un diseño completamente al azar y 2) En la termoterapia se utilizó un diseño de bloques completamente al azar. Para las respuestas evaluadas como supervivencia (1 ="si", 0 ="no") y saneamiento (1 ="si", 0 ="no") se utilizó un modelo lineal generalizado mixto con respuesta binomial, mientras que, para las variables como número de brotes, número de hojas se utilizó un modelo lineal generalizado mixto con respuesta Poisson. Para el experimento de los meristemas se comparó el porcentaje de supervivencia, el número de hojas, el número de brotes y vitroplantas libres de HLB con evaluación en cuatro diferentes medios de cultivo; mientras que para el experimento de la termoterapia se compararon las mismas variables excepto el número de hojas.



## Regeneración *in vitro* de meristemos apicales

### Supervivencia de meristemos y vitroplantas libres de HLB

El predictor lineal de estos datos es:  $\eta_{ij} = \alpha + \tau_i + m_j$  donde  $\eta_{ij}$  es la función liga en el medio de cultivo  $i$  en el meristemo  $j$ ,  $\alpha$  es el intercepto,  $\tau_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo medio de cultivo,  $m_j$  es el efecto aleatorio del meristemo  $j$ , asumiendo que cada  $m_j$  tiene media 0 y  $\sigma_m^2$ . La respuesta de estas variables tienen una distribución binomial; es decir,  $y_{ij} | \sigma_m^2 \sim \text{binomial}(n_{ij}, \pi_{ij})$  y  $m_j \sim N(0, \sigma_m^2)$  cuya función liga está dada por  $\eta_{ij} = \text{logit}\left(\frac{\pi_{ij}}{1-\pi_{ij}}\right)$ .

### Número de hojas y número de brotes

El predictor lineal utilizado en estas variables respuestas es similar al anterior pero la respuesta de estas variables tienen una distribución Poisson; como a continuación se describe,  $y_{ij} | m_j \sim \text{Poisson}(\lambda_{ij})$  con función liga  $\eta_{ij} = \log(\lambda_{ij})$ .

## Termoterapia de ápices

### Supervivencia de ápices y vitroplantas libres de HLB

El predictor lineal de estos datos es:  $\eta_{ij} = \alpha + \tau_i + b_j$ , donde  $\eta_{ij}$  es la función liga en el medio de cultivo  $i$  en el bloque  $j$ ,  $\alpha$  es el intercepto,  $\tau_i$  es el efecto de la  $i$ -ésima temperatura  $i$ ,  $b_j$  es el efecto aleatorio debido al  $j$ -ésimo bloque asumiendo que cada  $b_j$  tiene una distribución normal con media 0 y varianza constante  $\sigma^2$  ( $b \sim N(0, \sigma_b^2)$ ). Estas variables tienen una distribución binomial; es decir,  $y_{ij} | b_j \sim \text{binomial}(n_{ij}, \pi_{ij})$  y cada  $b_j$  con ( $b_{j(i)} \sim N(0, \sigma_b^2)$ ) y función liga  $\eta_{ij} = \text{logit}\left(\frac{\pi_{ij}}{1-\pi_{ij}}\right)$ .

### Número de brotes

El predictor lineal utilizado en estas variables respuestas fue similar al anterior; pero la respuesta de estas variables tuvieron una distribución Poisson; como a continuación se describe,  $y_{ij} | m(\tau)_{j(i)} \sim \text{Poisson}(\lambda_{ij})$  y cada  $m(\tau)_{j(i)}$  con ( $m(\tau)_{j(i)} \sim (0, \sigma_{m(\tau)}^2)$ ).

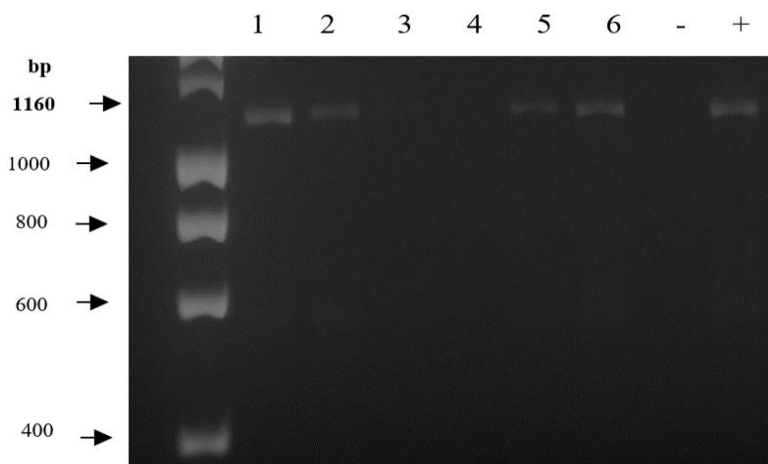
## Análisis estadístico

El análisis estadístico de las variables evaluadas se realizó mediante glimmix (PROC GLIMMIX) del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.4) y las medias se compararon con la prueba de LSD de Fisher con significancia de 0.05.

## 1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diagnóstico del HLB

El resultado del diagnóstico molecular demostró que cuatro árboles de los seis muestreados presentan la enfermedad del HLB (Figura 6) al encontrar productos de amplificación de 1160 bp como lo marcaba Jagoueix *et al.* (1996), esto además, coincidió con últimos reportes de Garcia *et al.* (2017) donde reporto que en la zona citrícola de Cuitláhuac existe incidencia de esta enfermedad, lo que representa un peligro fitosanitario latente para agricultores citrícolas dado a que el municipio de Cuitláhuac no cuenta con un vivero certificado para la producción de plantas sanas de limón Persa. La norma mexicana NOM PROY-NOM-079-FITO-2000 dicta que los cultivos deben ser sembrados a partir de plantas de vivero que se encuentren certificadas y libres de enfermedades, los árboles sintomáticos, así como otras plantas con potencial para ser hospedantes deben ser eliminados aplicando previamente insecticida foliar y las poblaciones de psílidos deben ser controladas mediante el uso de productos biológicos o químicos.



**Figura 6.** Diagnóstico de la presencia de HLB en árboles de limón Persa de campo, carril 1 MP (HypperLeader™ 1 kb), carriles del 2 al 7 se encontraron los seis productos de PCR realizados a los árboles con sintomatología de HLB, carril 8 control negativo y el carril 9 el control positivo. Gel de agarosa al 0.7 % teñido con bromuro de etidio y tamaño de la amplificación para HLB 1160 bp.

### **Regeneración de vitroplantas**

Se pudieron regenerar vitroplantas de un tamaño de  $2.5 \pm 0.5$  cm provenientes de segmentos nodales de limón Persa positivos a HLB en Medio MS suplementado con BAP y KIN, teniendo un índice menor al 30 % de contaminación el cual correspondió a 20 % hongos y 10 % bacterias.

### **Regeneración *in vitro* de meristemos apicales**

#### **Supervivencia de meristemos**

El análisis de varianza para el porcentaje de supervivencia de los meristemos (Figura 7A) no se observó diferencia estadística significativa entre los diferentes medios de cultivo ( $P = 0.95$ ). Es decir, el porcentaje promedio de meristemos sobrevivientes es similar en cada uno de los medios de cultivo empleados, esto coincide con las primeras extracciones de meristemos llevadas a cabo por Navarro (1979) en cítricos donde se murieron debido a su diámetro de 0.05-0.06 mm, por ello se tuvieron que regenerar meristemos apicales con dos primordios foliares con un tamaño de 0.1-0.15 mm.

#### **Vitroplantas libres de HLB provenientes de meristemos**

En las vitroplantas libres de HLB provenientes de meristemos apicales (Figura 7B), el análisis de varianza no mostro diferencia significativa entre los diferentes medios de cultivo ( $P = 0.95$ ) Es decir, no existe diferencia entre la relación de medios de cultivo con el saneamiento de los meristemos, este resultado coincide con resultados obtenidos por Navarro *et al.* (1975), quienes reportaron que usando la técnica de microinjertos con el meristemo apical del cítrico de interés como injerto y dejando en incubación los explantes durante dos meses, fue posible establecer un vivero de *Citrus* libre de enfermedades (principalmente viroides). Ahora a través de la regeneración de meristemos apicales provenientes de vitroplantas positivas al HLB se comprobó mediante PCR anidada que la bacteria estaba ausente en el explante.

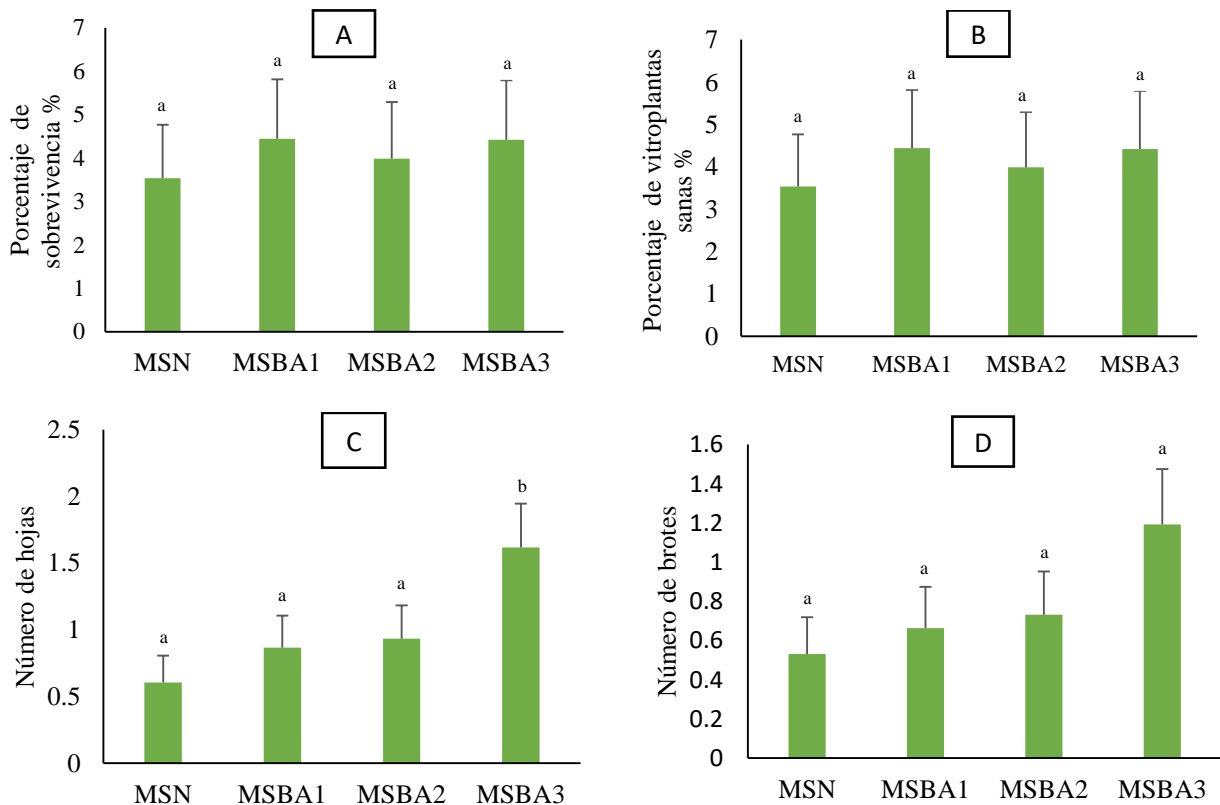
#### **Generación de hojas a partir de la regeneración de meristemos**

Se evaluó el porcentaje promedio de hojas producidas por los meristemos en cada uno de los medios de cultivo. El análisis de varianza mostro una diferencia significativa entre los medios de cultivo sobre el número promedio de hojas producidas ( $P \leq 0.05$ ). Esta diferencia se debe a las diferentes concentraciones de fitohormonas como BAP y AIA añadidas al medio MS, como se

observa en (Figura 7C) los meristemos produjeron una media aproximada  $1 \pm 0.5$  hojas esto debido a las diversas concentración de estas fitohormonas. El medio de cultivo con mayor producción de hojas por explante fue MSBA3 que contenía  $1 \text{ mgL}^{-1}$  y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA que promovieron el crecimiento de  $1.5 \pm 0.32$  hojas.

### Generación de brotes provenientes de la regeneración de meristemos

El análisis de varianza para el porcentaje de sobrevivencia de meristemos (Figura 7D) no presentó diferencias significativas entre los diferentes medios de cultivo ( $P = 0.21$ ), esto indica que la concentración de fitohormonas en el medio de cultivo no influyó directamente en la aparición de brotes regenerados en los meristemos. Esto puede deberse a que el tiempo de incubación y el fotoperiodo utilizado no fue adecuado para la elongación del explante. La producción de brotes fue ligeramente mayor en el medio MSBA3 con una media de  $1.19 \pm 0.28$ , pero no fue significativa la diferencia, probablemente las citoquininas al interactuar con las auxinas ejercieron desdiferenciación celular, es por ello que se debe realizar aplicaciones con diferentes concentraciones de auxinas/citoquininas para observar el efecto sobre las variables evaluadas y así determinar si los resultados son estadísticamente significativos.



**Figura 7.** Supervivencia de meristemos, vitroplantas libre de HLB, hojas y brotes. A) Porcentaje de supervivencia de los meristemos introducidos a los diferentes medios de cultivo utilizando la técnica de corte transversal, B) Porcentaje de vitroplantas libres de HLB, C) Media del número de las hojas en los cuatro diferentes medios de cultivo, D) Media del número de brotes en los cuatro diferentes medios de cultivo. Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre las variables.

### **Termoterapia de ápices**

#### **Efecto de la termoterapia sobre la supervivencia de ápices**

La supervivencia de las vitroplantas a diferentes temperaturas (40 °C y 45° C), el análisis de varianza mostro diferencias significativas sobre el porcentaje de supervivencia de los explantes (Figura 8A). Esto se debió probablemente a que el tamaño del explante empleado fue pequeño (2.5 cm) y no tolero la temperatura más alta de 45 °C, ocasionando la muerte de los explantes en un 94%, ya que el calor deshidrato por completo el explante, mientras que a 40 °C el índice de supervivencia oscilo entre el 30 % mostrando la susceptibilidad de los ápices a diferenciales de temperatura.

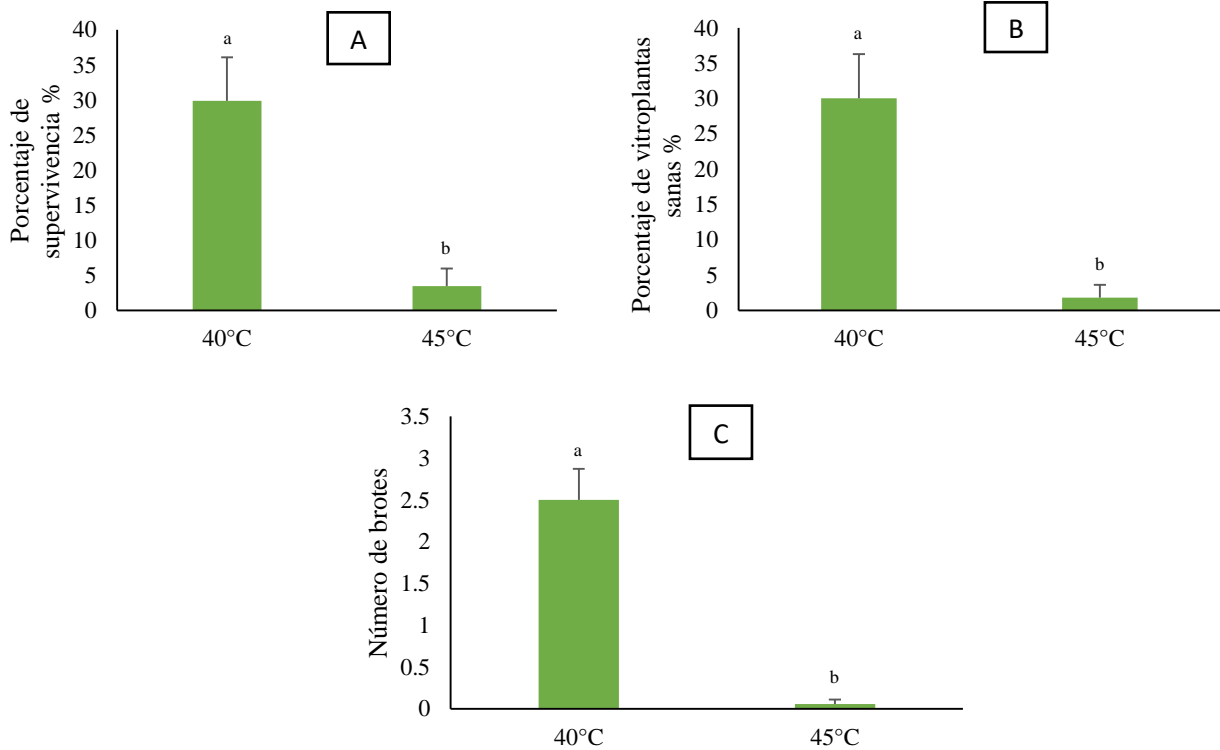
#### **Efectividad de la termoterapia sobre el HLB**

El análisis de varianza mostro que si existen diferencias significativas, en los gradientes de temperatura (40 °C y 45° C), sobre las vitroplantas libres de HLB (Figura 8B). La muerte de los explantes a 45 °C impidió el que el diagnóstico final fuera mayor al 5 %, además, como se pudo observar a la temperatura de 40 °C el saneamiento fue exitoso, esto nos indica que la bacteria no tolera directamente temperaturas mayores a 35 °C como lo plantearon Hoffman *et al.* (2013).

#### **Efecto de la termoterapia sobre el número de brotes**

El número promedio de brotes por explante fue estadísticamente diferente entre ambos gradientes de temperatura ( $P = 0.001$ ). El promedio del número de brotes fue 2.5 cm a 40 °C (Figura 8C), así como el mayor índice de sobrevivencia y mayor porcentaje de vitroplantas libres de HLB que ha una temperatura de 45 °C. Esta variable fue importante ya que los mismos brotes generados se pueden posteriormente propagar *in vitro* de manera convencional en medio líquido o semisólido,

así como también en biorreactores de inmersión parcial o temporal para así obtener una producción mayor de vitroplantas libres de HLB.

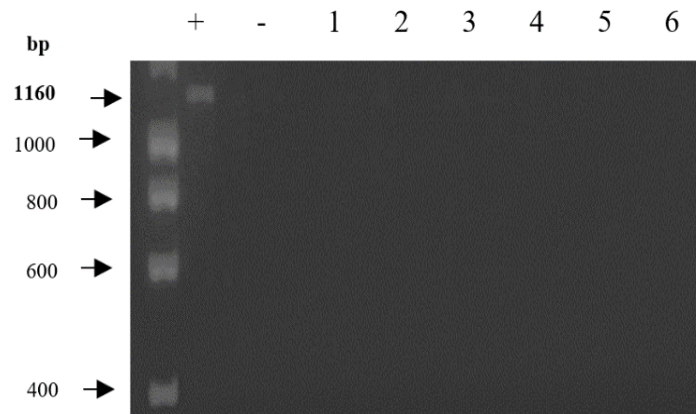


**Figura 8.** Termoterapia de ápices, vitroplantas libres de HLB y número de brotes. A) Porcentaje de supervivencia explantes introducidos a la termoterapia utilizando dos gradientes de temperatura (40 °C y 45 °C), B) Porcentaje de vitroplantas libres de HLB, C) Número de brotes producidos por explante, regenerados a los 30 días después de la termoterapia. Diferentes letras en las columnas indican diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre las variables.

### Diagnóstico final en la termoterapia

Mediante un diagnóstico final, 30 días después del tratamiento de la termoterapia, se evaluó el saneamiento de los explantes de limón Persa regenerados *in vitro*, empleando la técnica descrita por Jagoueix *et al.* (1996) (Figura 9) Los resultados fueron negativos a HLB, por lo que se puede decir que a temperaturas altas la bacteria que provoca la enfermedad de HLB se inactiva. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Lo *et al.* (1981) y Lo (1983), quienes lograron eliminar a *Candidatus Liberibacter asiaticus* de varetas y plántulas exponiendo los explantes a aire caliente de 49 a 50 °C por 50 a 60 min, así mismo sumergir plántulas infectadas en agua

caliente, de 47 a 50 °C durante 6 min puede eliminar a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Hoffman *et al.* 2013), sin embargo estos métodos son recomendados para utilizarse en viveros e invernaderos, por ello como alternativa nuestro método puede ser útil para el control de *Candidatus Liberibacter asiaticus* dentro del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.



**Figura 9.** Diagnóstico final del HLB utilizando vitroplantas regeneradas a los 30 días después de la termoterapia, carril 1 MP (HypperLeader™ 1kb), carril 2 control positivo, carril 3 control negativo y del carril 4 al 9 se encuentran los seis productos de PCR realizados a los árboles con sintomatología de HLB. Gel de agarosa al 0.7 % teñido con bromuro de etidio y tamaño de la amplificación para HLB 1160 bp.

## 1.5 CONCLUSIÓN

Los resultados demostraron que la regeneración de los meristemos apicales provenientes de vitroplantas positivas a HLB se sanearon en un porcentaje del 5 % debido a la muerte de los explantes introducidos, sin embargo, todos los meristemos sobrevivientes dieron negativo al HLB, probablemente esto se debió a que el meristemo apical es un cúmulo de células en contaste división celular y no permitió que la bacteria invadiera esta zona o incluso la ausencia de la bacteria en el meristemo se deba a problemas que esta misma tenga para poder transportarse dentro de la planta. La comparación llevada a cabo entre los cuatro medios de cultivo, señala que el medio MSBA3 con la mayor concentración de BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) y AIA (0.5 mg L<sup>-1</sup>) logró obtener diferencia significativa referente al número de hojas con una media de 1.5 ± 0.32, produciendo más que los demás medios evaluados, sin embargo, referente a la generación de brotes no se obtuvo una diferencia significativa en ninguno de los medios empleados. Por parte en la termoterapia se demostró que la temperatura idónea para el saneamiento de HLB en vitroplantas de limón Persa

es 40 °C, donde se pudo generar mayor sobrevivencia, mayor número de brotes y mayor porcentaje de vitroplantas libres de HLB comparado con la temperatura de 45 °C.

## CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Todos los autores proporcionaron comentarios constructivos y corrigieron el manuscrito.

## AGRADECIMIENTOS

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en México por la beca otorgada en 2016-2018 y al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF).

## 1.6 LITERATURA CITADA

- Baker KF, Smith SH (1966) Dynamics of seed transmission of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology 4(1):311–332
- Benyon LS, Stover E, Bowman KD, Niedz R, Shatters RG, Zale J, Belknap W (2013) GUS expression driven by constitutive and phloem-specific promoters in citrus hybrid US-802. In Vitro Cell Dev Biol Plant 49:255–265
- Bové JM (2006) Huanglongbing: a destructive newly-emerging century-old disease of citrus. J Plant Pathol 88:7–37
- Brlansky HR, Dewdney EMM, Rogers M, Chung RK (2009) Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida 3p
- Chávez F, Valdovinos G, Mora G, Gómez R, Velázquez JJ, Manzanilla MA, Flores JL, López JJ (2012) Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Agrociencia 46(8):769–782
- Ding F, Jin S, Hong N, Zhong Y, Cao Q, Yi G, Wang G (2008) Vitrification–cryopreservation, an efficient method for eliminating *Candidatus Liberobacter asiaticus*, the citrus Huanglongbing pathogen, from *in vitro* adult shoot tips. Plant cell reports 27:241–250
- Engelmann F (2011) Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In Vitro Cell Dev Biol Plant 47:5–16
- Faccioli G, Marani F (1998) Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. Plant virus disease control 346–380



- Garnier M, Danel N, Bové JM (1984) Aetiology of citrus greening disease. *Ann Microbiol* 135:169–179
- Garcia GF, Castañeda O, Hernández F, Bulbarela JE, Corona JA, Pastelín MC, Solano MA (2017) Diagnosis of HLB's presence in persian lemon crop (*Citrus x latifolia*) by PCR. *Mexican journal of phytopathology*, vol 35, ISSN:2007–8080
- Grondeau C, Samson R, Sands DC (1994) A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(1):57–75
- Halbert, SE, Manjunath KL (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida entomologist* 87(3):330–353
- Hall DG, Richardson ML, Ammar ED, Halbert SE (2013) Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus Huanglongbing disease. *Entomol Exp* 146:207–223
- Hoffman MT, Doud MS, Williams L, Zhang MQ, Ding F, Stover E, Hall D, Zhang S, Jones L, Gooch M, Fleites L, Dixon W, Gabriel D, Duan, YP (2013) Heat treatment eliminates *Candidatus Liberibacter asiaticus* from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology* 103(1):15–22
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease is a member of the  $\alpha$ -subdivision of the Proteobacteria. *Int J syst Bacteriol* 44:379–386
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1996) PCR detection of the two *Candidatus liberobacter* species associated with greening disease of citrus. *Molecular and cellular probes* 10(1):43–50
- Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1997) Comparison of the 16S/23S ribosomal intergenic region of '*Candidatus liberobacter asiaticum*' and '*Candidatus liberobacter africanum*', the two species associated with citrus Huanglongbing (greening) disease. *Int J Syst Bacteriol* 47:224–227
- Lo X, Lo D, Tang W (1981) Studies on the thermotherapy of citrus yellow shoot disease. *Acta Phytopylacica Sinica* 8(1):47–51
- Lo X (1983) Studies on the sterilization effect of the intermittent hot water treatment on citrus budwood and nursling infected with citrus yellow shoot. *Journal Science China Agriculture University* 1:97–102
- Luo ZD (1991) Preliminary report on the efficacy of heated tetracycline hydrochloride solution in treating citrus yellow shoot disease. *J South China Agric Univ* 12(2):38–42
- Morton J F (1987) Fruits of warm climates. J F Morton Tahiti Lime p. 172–175

- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Navarro L, Roistacher CN, Murashige T (1975) Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *J Amer Hor Soc* 100:471–479
- Navarro L (1979) Micro injerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus. *Boletín del servicio de plagas* 5:127–148
- Planet P, Jagoueix S, Bové JM, Garnier M (1995) Detection and characterization of the African citrus greening liberobacter by amplification, cloning and sequencing of the rplKAJL-rpoBC operon. *Current Microbiology* 30:137–41
- SIAP (2017) <https://www.gob.mx/siap/>, citado en marzo del 2018
- Salcedo R, Hinojosa G, Mora G, Covarrubias GI, De Paolis F, Cíntora GC, Mora FS (2010) Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura 141 p
- Teixeira CD, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, Ayres AJ, 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(5):1857–1862
- Trujillo AJ (2010) Situación Actual, Regulación y Manejo del HLB en México. Memorias del 2º Taller Internacional del Huanglongbing y el Psílido asiático de los cítricos. Mérida, Yucatán, México p 141–149
- Zhao XY, Qiu ZS, Su WF, Jiang YH (1981) Response of citrus Huanglongbing to penicillin and tetracycline. *South China Fruits* 4:17

## CAPITULO II. SANEAMIENTO VEGETATIVO DE VITROPLANTAS DE *CITRUS* × *LATIFOLIA* CON PRESENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

Gael F. Garcia-Merino<sup>1</sup> • Francisco Hernández-Rosas<sup>1</sup> • Josafhat Salinas-Ruiz<sup>1</sup> • Miriam C. Pastelín-Solano<sup>2</sup> • Luis A. Solano-Rodríguez<sup>3</sup> • Odón Castañeda-Castro<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Colegio de postgraduados (COLPOS), Veracruz, México, Km.348 Carretera Federal Córdoba-Veracruz, Congregación Manuel León, Municipio de Amatlán de los reyes, Ver. C.P. 94953

<sup>2</sup> Universidad Veracruzana (UV), Veracruz, México. <sup>2</sup> Ote. 6, Número 1009, Colonia Rafael Alvarado, Orizaba, Ver. C.P 94340

<sup>3</sup> Producción Genética Agropecuaria de México S.P.R. de R.L. de C.V. (PROGAMEX), Veracruz, México, Av. Eugenio Garza Sada, Número 1, Córdoba, Ver. C.P 94500

### 2.1 RESUMEN

El limón Persa (*Citrus* × *latifolia*) se caracteriza por la ausencia de semillas y la dimensión de sus frutos, este árbol frutal es el segundo cítrico de importancia para México. *Citrus tristeza virus* (CTV) es el agente causal de la enfermedad de la *tristeza* en los cítricos, donde los árboles infectados muestran decaimiento, defoliación, detención del desarrollo y en muchos casos mueren. Se realizó el diagnóstico fitosanitario utilizando hojas de árboles con síntomas de la enfermedad y se tomaron segmentos nodales. La regeneración de meristemos estudiados se llevó a cabo en el medio de cultivo de MS suplementado y se incubaron a oscuridad total, se evaluó el saneamiento, crecimiento de brotes y hojas a los 45 días de establecido el cultivo. Los tratamientos en termoterapia se realizaron con ápices de 2.5 cm, se sometieron a temperaturas de 33, 35, 37, 39 y 41 °C a tres tiempos diferentes de 3, 4 y 5 h. Los meristemos regenerados y ápices tratados mediante la termoterapia dieron negativo a CTV, corroborando resultados mediante RT-PCR utilizando los cebadores *PINI* y *PIN2*. Los meristemos regenerados en 15 días en oscuridad y 30 días de fotoperiodo presentaron mayor número de brotes (1.8) y hojas (3.1). En la termoterapia de ápices, el tratamiento con mayor éxito fue a 37 °C durante 4 h, promoviendo la regeneración de brotes (4.8) y hojas (5.9) por explante.

**Palabras Clave:** • Limón Persa • CTV • RT-PCR • meristemos • termoterapia.

**Autor de correspondencia:** [Odcastaneda@uv.mx](mailto:Odcastaneda@uv.mx)

## 2.2 INTRODUCCIÓN

El segundo productor mundial de limas y limones es México con una producción de 2,187,257 toneladas (SIAP, 2017). El limón Persa (*Citrus × latifolia*), es una especie con frutos que se caracterizan por ser de gran tamaño, presentan cáscara gruesa e intenso color verde (Agustí, 2003), su sabor es menos ácido y posee un contenido ligeramente mayor de vitamina C comparado con el resto de los cítricos, pero su principal característica es que carecen de semillas (Cruz *et al.*, 2003). De acuerdo con el informe de parte de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en 2017, el limón destaca entre los principales productos agrícolas que México exporta, generando divisas por 465 millones de dólares en 2017 (SIAP, 2017). Sin embargo, todos los cítricos son susceptibles a una serie de enfermedades (principalmente el CTV), plagas y condiciones adversas que afectan su rendimiento y productividad. El CTV es miembro del género *Closterovirus* de la familia *Closteroviridae* y es causante de la enfermedad llamada *tristeza* de los cítricos, tiene partículas víricas largas, flexuosas y filamentosas con un tamaño de aproximadamente  $11 \times 2000$  nm (Bar-Joseph *et al.*, 1979), los arboles infectados muestran decaimiento, defoliación, detención del desarrollo y en muchos casos mueren (Moreno *et al.*, 2008). Esta sintomatología es causada por problemas de absorción en el sistema radicular como consecuencia de la necrosis de los vasos conductores inducida por el virus debajo del punto de unión del injerto al patrón (FAO, 2017). Un vector del CTV es *Toxoptera citricida*, un insecto que se caracteriza por ser el más severo transmisor de este virus (Yokomi *et al.*, 1994). Este vector y el material vegetal con el inoculo del CTV han aumentado en los últimos años debido a la globalización y falta de medidas cuarentenarias adecuadas (Moreno *et al.*, 2008). Por lo tanto, la enfermedad se ha convertido en un problema auspiciado por los agricultores, que al momento de introducir otras variedades de cítricos a diferentes áreas no llevan a cabo buenas prácticas agrícolas. Las condiciones específicas de los viveros hacen más difícil el control de los virus que atacan a los vegetales transmitidos por insectos vectores (Vidal *et al.*, 2012). A menudo el CTV puede no expresarse en el hospedante, por lo que puede haber plantas de cítricos asintomáticos, lo que representa un riesgo en su propagación. Una vez que el virus está presente, su rápida propagación está asegurada por diferentes especies de áfidos, lo que dificulta el control del virus, su rápida propagación está asegurada por diferentes especies de áfidos, lo que dificulta el control del virus. El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) ha enlistado una serie de acciones emprendidas de acuerdo a la normatividad

aplicable en cuanto a material vegetal de cítricos en general. Una de estas es la Norma Oficial Mexicana NOM-079-FITO-2002 para conocer los requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material vegetativo libre del virus de la tristeza y otros patógenos asociados a cítricos. Varios métodos de saneamiento están disponibles con mayor a menor eficiencia en la eliminación de virus como citrus exocortis viroid (CEVd), citrus psoriasis virus (CPV), citrus cachexia viroid (CCaVd), citrus idaeovirus (CIV) y CTV. Sin embargo, el mejor procedimiento debe ser fácil de usar en términos de condiciones ambientales. Para ello, deben considerarse factores para obtener el mejor tratamiento para el saneamiento: i) tiempos cortos para la regeneración de la planta, ii) mantenimiento de caracteres verdaderos en las plantas producidas y iii) ausencia de caracteres de juvenilidad (Navarro *et al.*, 1975). En los últimos años, el desarrollo de metodologías innovadoras resulta apremiante en métodos *in vitro* empleadas para el saneamiento del CTV, anteriormente se utilizaban las plantas nucelares, que se obtienen por germinación de los embriones nucelares presentes en las semillas de las variedades poliembriónicas, en este caso, estas plantas están libres de virus debido a que en los cítricos agrios éstos no se transmiten por semilla (McClean, 1957; Navarro, 1979), el inconveniente de la técnica reside en que se obtienen caracteres juveniles (por ejemplo, espinas excesivas, hábito vigoroso y crecimiento lento de frutos), que pueden persistir durante muchos años y durante muchas generaciones (Roistacher, 1977). Estas últimas limitaciones mencionadas, se superaron usando brotes tratados térmicamente con aire caliente a 35-42 °C durante 78-107 días con pre-acondicionamiento de yemas (Roistacher, 1977) y el tiempo de espera era muy largo. Las desventajas de las plantas nucelares y el aire caliente, se resolvieron finalmente mediante injerto de punta de brote (STG, por sus siglas en inglés) (Navarro *et al.*, 1975). Aproximadamente un mes después del injerto, las plantas generalmente se transfieren *in vivo*. Las plantas producidas son verdaderas y no muestran carácter juvenil. La cantidad de injertos exitosos depende de la especie, las variedades y el tipo de cepa del virus, aunque la habilidad del operador sigue siendo un punto crucial en la tasa de supervivencia y saneamiento del injerto (Navarro, 1979). La termoterapia consiste en someter a las plantas o partes de ellas a tratamientos térmicos que destruyan o disminuyan la velocidad de replicación de los virus sin matar la planta y la propagación vegetativa de yemas o esquejes libres de virus obtenidos tras el tratamiento. Esta técnica se basa en el principio de que los microorganismos parásitos a menudo se eliminan a altas temperaturas (Baker y Smith, 1966), este tratamiento se puede usar para controlar enfermedades mediante la erradicación o al

menos disminuir la cantidad de inóculo primario (Grondeau *et al.*, 1994). La termoterapia a temperaturas altas es una alternativa que no ha sido ampliamente explorada en laboratorio, por ello, en la presente investigación se propone el uso de la termoterapia utilizando como fuente de temperatura constante y homogénea el termociclador, así de esta manera, contar con mayor control en los explantes y en consecuencia se comprobará la eficiencia del saneamiento en ápices y se determinará que el fotoperiodo para los meristemas apicales es el idóneo para regenerar el mayor número de brotes y hojas.

## **2.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Se recolectaron hojas de la copa de árboles de limón Persa con aparentes síntomas del CTV como decaimiento, defoliación y desarrollo lento en huertos ubicados en la zona citrícola de Cuitláhuac, Veracruz, México.

### **Regeneración y micropropagación de vitroplantas de limón Persa**

Segmentos nodales de un tamaño de 2.5 cm proveniente de árboles positivos a CTV se regeneraron *in vitro*, en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de kinetina (KIN,) mismo que se sirvió en frascos con capacidad para 100 mL en los cuales se sirvieron 20 mL del medio y esterilizó en autoclave a 120 °C durante 15 minutos, se mantuvo en ambiente controlado de 26 ± 1 °C durante 45 días en fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

### **Regeneración *in vitro* de meristemas apicales**

La regeneración de estos explantes se llevó a cabo tomando la parte aérea de las yemas (incluyendo dos primordios foliares) de las vitroplantas positivas para CTV, se colocaron en el medio MS suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), colocando los explantes en incubación, en fotoperiodos de 15, 30 y 45 días en oscuridad a 25 °C.

### **Termoterapia de ápices positivos para CTV**

Se utilizaron vitroplantas de limón Persa provenientes de segmentos nodales positivos, con un tamaño de 2.5 cm, se cortaron las hojas y de forma individual se fueron colocando dentro de tubos con capacidad para 200  $\mu\text{L}$  que contenían 120  $\mu\text{L}$  de medio MS sin fitohormonas, los explantes se colocaron en un termociclador (Axygen® MaxyGen Thermal Cycler II) utilizando distintas temperaturas y tiempos: Tr1 (33 °C - 3 h), Tr2 (33 °C - 4 h), Tr3 (33 °C - 5 h), Tr4 (35 °C - 3 h), Tr5 (35 °C - 4 h), Tr6 (35 °C - 5 h), Tr7 (37 °C - 3 h), Tr8 (37 °C - 4 h), Tr9 (37 °C - 5 h), Tr10 (39 °C - 3 h), Tr11 (39 °C - 4 h), Tr12 (39 °C - 5 h), Tr13 (41 °C - 3 h), Tr14 (41 °C - 4 h), y Tr15 (41 °C - 5 h). Los explantes fueron evaluados a los 10, 20 30 y 40 días de regeneración, incubados en un fotoperiodo de 16:8 h (luz:oscuridad) a 25 °C.

### **Diseño experimental**

Se realizó un diseño completamente al azar. Para la respuesta evaluada como saneamiento (1="si", 0="no") se utilizó un modelo lineal generalizado mixto con respuesta Binomial, mientras que, para las variables número de brotes y número de hojas se utilizó un modelo lineal generalizado mixto con respuesta Poisson, en ambos experimentos se comparó el porcentaje de saneamiento, el número de hojas y el número de brotes.

### **Predictor lineal del saneamiento de meristemos apicales**

El predictor lineal para los meristemos apicales que permite estimar la media es:  $\eta_{ij} = \alpha + \tau_i + m_j$  donde  $\eta_{ij}$  es la función liga en el tiempo de oscuridad  $i$  en el meristemo  $j$ ,  $\alpha$  es el intercepto,  $\tau_i$  es el efecto fijo del fotoperiodo  $i$ ,  $m_j$  es el efecto aleatorio del meristemo  $j$ , asumiendo que cada  $m_j$  tiene media 0 y  $\sigma_m^2$ . La respuesta de estas variables tienen una distribución Binomial;  $y_{ij} | \sigma_m^2 \sim \text{Binomial}(n_{ij}, \pi_{ij})$  y  $m_j \sim N(0, \sigma_m^2)$  cuya función liga está dada por  $\eta_{ij} = \text{logit} \left( \frac{\pi_{ij}}{1-\pi_{ij}} \right)$ .

### **Predictor lineal del saneamiento mediante termoterapia**

El predictor lineal de estos datos es:  $\eta_{ij} = \alpha + \tau_i + m_j$  donde  $\eta_{ij}$  es la función liga en el efecto del tratamiento  $i$  en el ápice  $j$ ,  $\alpha$  es el intercepto,  $\tau_i$  es el efecto fijo del tratamiento  $i$ ,  $m_j$  es el efecto aleatorio del ápice  $j$ , asumiendo que cada  $m_j$  tiene media 0 y  $\sigma_m^2$ . La respuesta de estas

variables tienen una distribución Binomial;  $y_{ij}|\sigma_m^2 \sim \text{Binomial}(n_{ij}, \pi_{ij})$  y  $m_j \sim N(0, \sigma_m^2)$  cuya función de enlace está dada por  $\eta_{ij} = \text{logit}\left(\frac{\pi_{ij}}{1-\pi_{ij}}\right)$ .

### **Predictor lineal del número de hojas y número de brotes**

El predictor lineal utilizado en estas variables respuestas es similar al anterior pero la respuesta de estas variables tiene una distribución Poisson; como a continuación se enlista,  $y_{ij}|m_j \sim \text{Poisson}(\lambda_{ij})$  con función de enlace  $\eta_{ij} = \log(\lambda_{ij})$ .

### **Detección del CTV mediante RT-PCR**

La extracción del ARN total se realizó siguiendo la metodología TRIsure™. La RT-PCR se realizó utilizando los primers; *PIN1* (5'-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3') y *PIN2* (5'-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA-3') dirigida a la región 3' conservada del genoma del virus (Olmos *et al.*, 1999). El mix para la RT-PCR contenía: 2 µL de dNTPs (10 mM), 2 µL de ambos primers (10 mM), 0.3 µL de Taq ADN polimerasa, 0.02 µL (5 U/µL) de enzima transcriptasa reversa, 5 µL de My taq reaction buffer 5× (5 mM de dNTPs y 15 mM de MgCl), 3 µL de ARN (100 ng) y agua libre de RNasa hasta 25 µL de volumen. El ADNc fue sintetizado usando el ácido nucleico total a 42 °C durante 45 min, seguido de una desnaturalización y la inactivación enzimática a 92 °C durante 2 min. El protocolo de amplificación consistió en 40 ciclos a 92 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s, seguido de una amplificación a 10 min a 72 °C, los productos se analizaron mediante gel de agarosa al 1.5 %, en un transiluminador UV (UVP PhotoDoc-It™ Imaging System de Analytikjena®), se utilizó como control positivo una muestra de CTV proporcionada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF) y como control negativo agua HPLC.

### **Análisis estadístico**

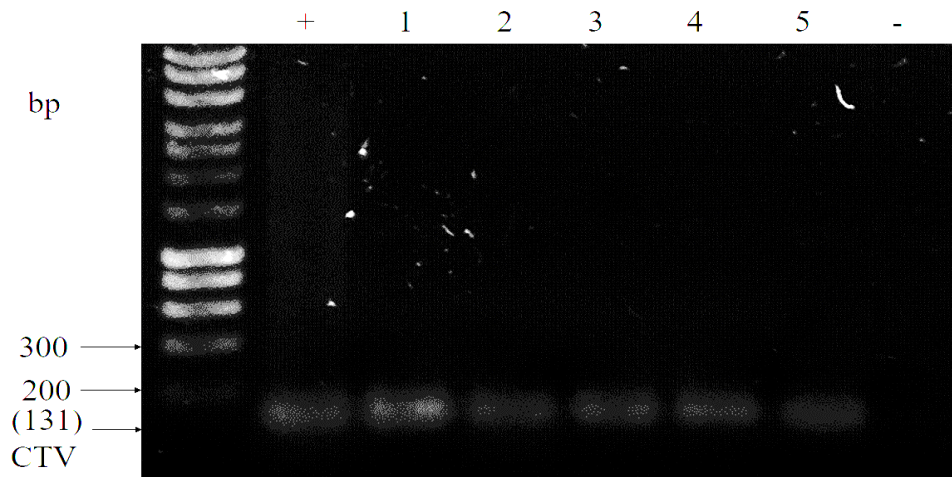
El análisis estadístico se realizó mediante el procedimiento de glimmix (PROC GLIMMIX) del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.4) y las medias se compararon con la prueba de LSD de Fisher a un nivel de significancia de 0.05.



## 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diagnóstico del CTV y regeneración de vitroplantas

Todas las muestras vegetales de los árboles presentaron el virus del CTV (Figura 10) al encontrar productos de amplificación de 131 bp, lo que presenta que en las parcelas donde se tomaron las muestras con sintomatología de CTV, existe una fuente de inoculo y a partir de esta, el virus se puede diseminar dependiendo del vector presente en la zona.



**Figura 10.** Diagnóstico de la presencia de CTV en arboles de limón Persa de campo, carril 1 MP (HyperLeader™ 100 bp), carril 2 control positivo, carriles del 3 al 7 los cinco productos de RT-PCR de las muestras vegetales de árboles con sintomatología de CTV y el carril 8 el control negativo. Gel de agarosa al 1.2 % y tamaño de la amplificación para CTV 131 bp.

### Regeneración de meristemos apicales

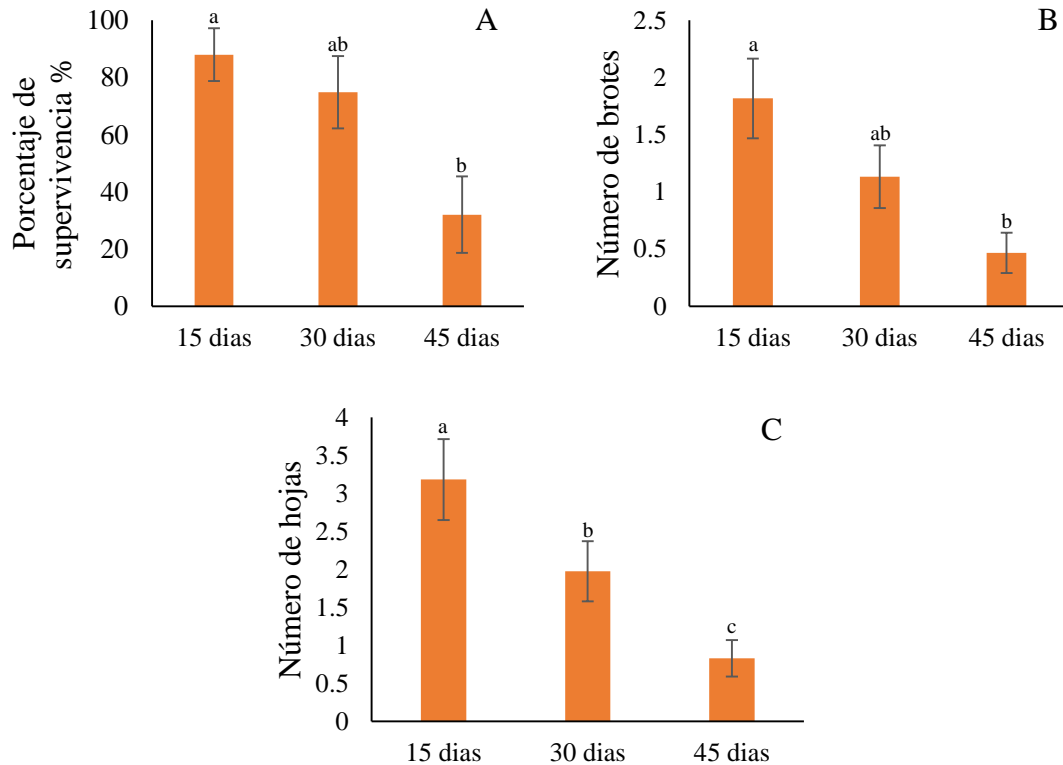
#### Supervivencia y saneamiento de meristemos apicales

El porcentaje de supervivencia de meristemos (Figura 11A) se observó diferencia estadística significativa entre los tiempos de incubación ( $P = 0.05$ ). Si influyó el tamaño del explante y tiempo en oscuridad respecto al porcentaje de meristemos sobrevivientes. Navarro (1979) en pruebas con microinjertos, regeneraban patrones de cítricos donde sus muestras se sometieron a un fotoperiodo de dos semanas de oscuridad y obtuvieron el mayor índice de supervivencia. Con ello, promovieron que el patrón se desarrolló lo suficiente para poder llevar a cabo el microinjerto del meristemo apical con un diámetro de 0.06-0.07 mm, pero debido a su tamaño tenían un alto índice de mortandad, por esto tuvieron que regenerar meristemos apicales con dos, tres y seis primordios foliares con tamaño de 0.1-0.15 mm, para así aumentar el índice de supervivencia.

Todos los meristemos supervivientes resultaron negativos a CTV después de los 45 días de estudio. Esto también coincide con Navarro *et al.* (1975), donde reportaron el establecimiento de un vivero de citrus libre de enfermedades principalmente provocadas por viroides como psoriasis y exocortis mediante la técnica de STG.

### **Generación de brotes y hojas a partir de la regeneración de meristemos**

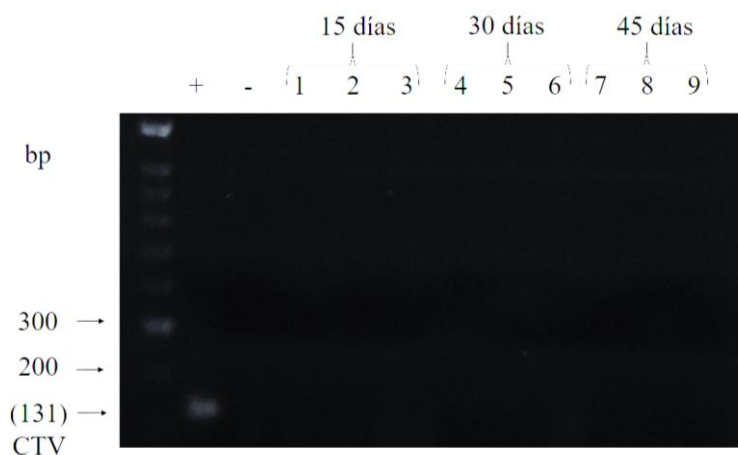
El análisis de varianza mostró una diferencia significativa entre los diferentes tiempos de fotoperiodo ( $P = 0.01$ ), esto indica que la concentración de fitohormonas en el medio de cultivo y el tiempo en oscuridad influye directamente con la aparición de brotes regenerados (Figura 11B). No se optó por una etapa de tejido indiferenciado (callo), a pesar que el número de brotes que se generan por esta vía suele ser mayor (Domínguez *et al.*, 2008), ya que este método hace más probable que se presenten variaciones genéticas o epigenéticas y se obtengan plantas anormales o alteradas. El mejor tratamiento para la regeneración de meristemos se obtuvo en incubación durante 15 días en oscuridad y 30 días en luz obteniendo el mayor número de brotes ( $1.81 \pm 0.34$ ). La iluminación es fundamental para el crecimiento de los meristemos (Navarro, 1979). En cuanto al número de hojas a partir de los meristemos, el análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los fotoperiodos ( $P = 0.0006$ ). Esta diferencia expresada se debe a las concentraciones de fitohormonas (BAP y AIA) y la iluminación posterior a la oscuridad, además el tamaño de las hojas aumenta con el incremento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo (Navarro, 1979). Como se observa en la Figura 11C, durante 15 días de incubación en oscuridad los meristemos produjeron mayor número de hojas ( $3.8 \pm 0.53$ ), ante la ausencia de luz, las hojas se observan más separadas entre sí, siempre y cuando tengan las condiciones óptimas de temperatura y pH en el medio de cultivo (Burgess, 1985), es recomendable de acuerdo a nuestros resultados que haya una fuente de luz posterior a las dos semanas de incubación para que las hojas de los meristemos se desarrollen mejor y se promueva el crecimiento de una manera más óptima.



**Figura 11.** Supervivencia de meristemos libres de CTV, hojas y brotes a 15, 30 y 45 días. A) Porcentaje de supervivencia de los meristemos apicales utilizando la técnica de corte transversal, B) Media del número de brotes, C) Media del número de hojas. Letras distintas sobre las columnas indican diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las variables.

### Diagnóstico final de la regeneración de meristemos

En la regeneración de los meristemos apicales de limón Persa *in vitro*, se les realizó un diagnóstico final (Figura 12) a los 45 días del proceso de incubación empleando la técnica descrita por Olmos *et al.* (1999), donde en las muestras evaluadas no se observó la presencia de CTV. Esto indica que la zona meristemática está libre de virus que desencadena la enfermedad de la tristeza de los cítricos. Esta hipótesis en un principio fue planteada por Navarro *et al.* (1975), quien con la ayuda de la fusión entre patrones regenerados *in vitro* y meristemos apicales, logro sanear varios tipos de cítricos de enfermedades en su mayoría transmitidas por virus como CEVd, CPV, CCaVd, CIV y CTV.



**Figura 12.** Diagnóstico final de la presencia de CTV en los meristemos apicales regenerados a los 45 días, carril 1 MP (HyperLeader™ 1kb), carril 2 control positivo, carril 3 control negativo y del carril 4 al 9 los seis productos de PCR de muestras de los árboles con sintomatología de CTV. Gel de agarosa al 0.7 % teñido con bromuro de etidio y tamaño de la amplificación para CTV 131 bp.

### **Termoterapia de ápices positivos a CTV**

#### **Supervivencia y saneamiento de ápices**

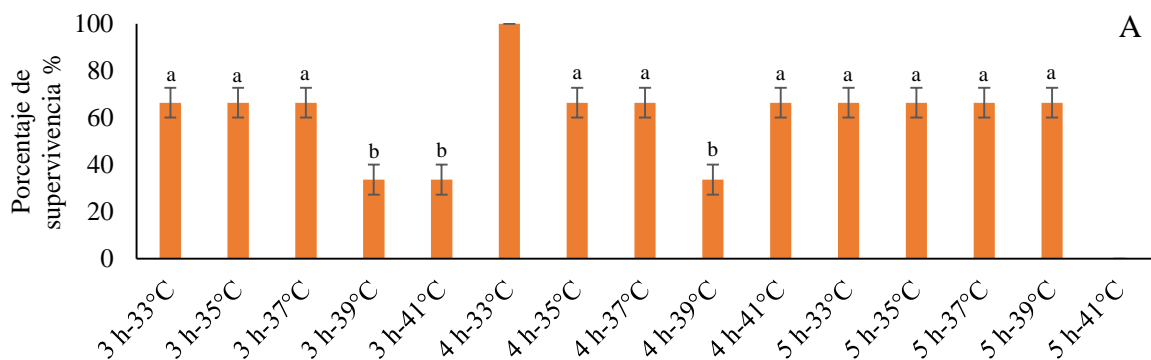
El análisis de varianza para la supervivencia de ápices en la termoterapia (Figura 13A) se observó una diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $P = 0.0003$ ). La ventaja que permite la termoterapia como mencionan Grondeau *et al.* (1994) se basa en eliminar o atenuar las enfermedades dentro de las estructuras y células vegetales evitando el uso de sustancias químicas, sanitizadores y la presencia de sus residuos químicos. En nuestros resultados observamos que el tamaño del explante y la exposición a temperaturas iguales o mayores a 39 °C disminuyó significativamente el porcentaje de supervivencia. La parte apical cultivada *in vitro*, es útil para obtener clones de cítricos libres de virus (Starrantino, 1992). La eliminación del CTV requiere un pre-acondicionamiento durante cierto período de tiempo que haga que gradualmente aumente la temperatura (Arif *et al.*, 2005), observaciones como esta han sido hechas por Roistacher y Calavan (1974), quienes mencionaron que el CTV no se puede eliminar a temperaturas pre-acondicionadas, por ello se requiere de forma gradual de calor para eliminar el virus. La termoterapia se utilizó con éxito para la eliminación del CTV corroborando la ausencia mediante la técnica de diagnóstico molecular de RT-PCR. El mecanismo de inactivación de virus con terapia de calor aún no ha sido explicado (Arif *et al.*, 2005), pero se cree que la exposición de las plantas con presencia del virus a altas temperaturas puede eliminar la síntesis tanto de la proteína de la capsida como de las

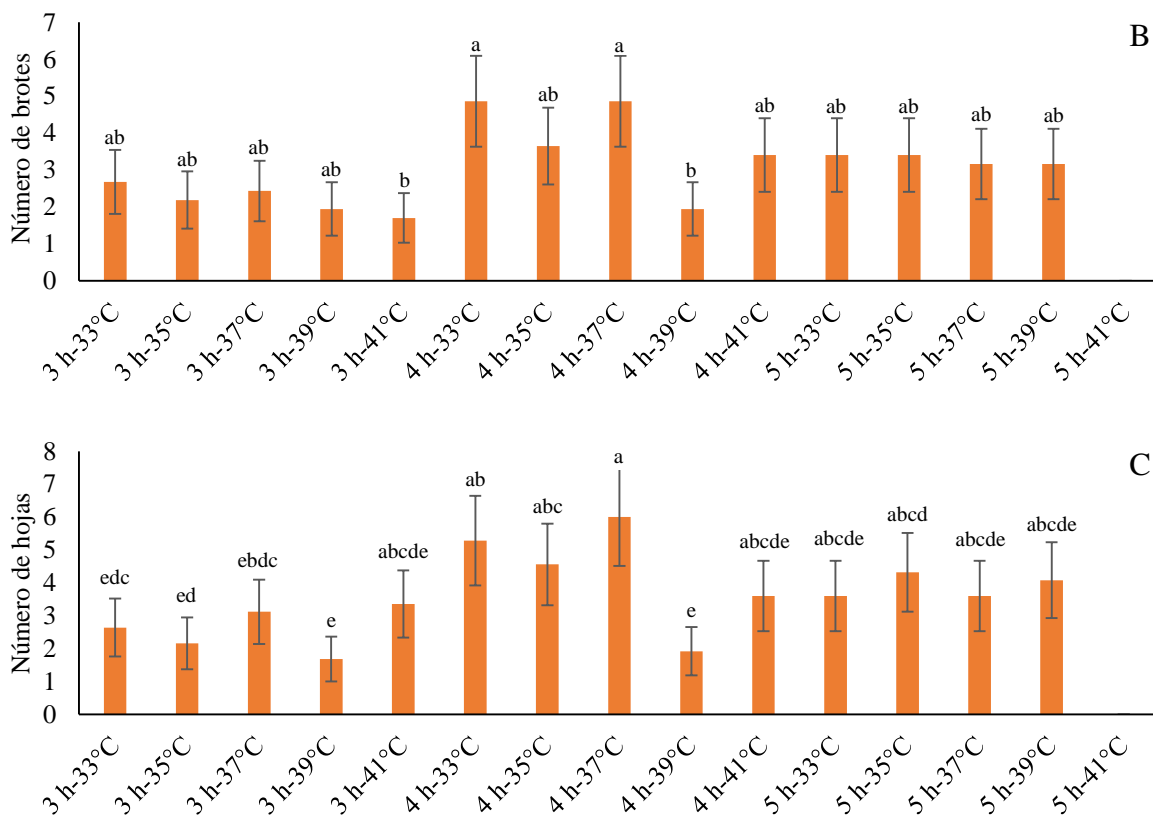
proteínas de movimiento mediante la desnaturalización de estas. Esto probablemente restringiría el movimiento de célula a célula del virus preexistente como inóculo (Hull, 1989; Mink *et al.*, 1998). Esta técnica se ha empleado durante años para la eliminación de virus y patógenos similares de forma exitosa (Calavan y Roistacher, 1972; Roistacher, 1977; Navarro y Juárez, 1977; Navarro *et al.*, 1981; Nauer *et al.*, 1983). Diferentes temperaturas de incubación y periodos de tiempo se han usado dependiendo de las especies de plantas con presencia del virus. Además, se ha observado que las temperaturas sostenidas de 37 °C o superiores inhiben por completo la multiplicación de diversos virus (Kassanis, 1957). Estudios relacionados con el virus del mosaico del tabaco (TMV), no se detectaron pruebas de síntesis de ARN viral cuando las plantas inoculadas se mantuvieron a temperatura constante 40 °C durante 12 horas (Dawson, 1978). El termociclador convencional para la técnica de PCR es un instrumento que brinda confiabilidad para el empleo de esta técnica utilizando muestras menores a 3 cm, brinda homogeneidad en todo el explante y tanto temperatura como tiempo son específicamente controlados y precisos. Es por ello que la termoterapia con el uso de termocicladores resulta una metodología adecuada y factible dado a que se corroboró la eliminación de la enfermedad de la tristeza, en los tejidos de las vitroplantas de limón Persa. La presencia del virus CTV en árboles madre y en brotes afecta en mayor o en menor grado la esperanza de vida útil del árbol y de la plantación en general, reduce el rendimiento, tamaño y número de frutos e incluso mata a los árboles, por este motivo la producción y distribución de vitroplantas libres de CTV resulta ser una propuesta necesaria e innovadora para sanear material vegetal de limón Persa.

### **Generación de brotes y hojas a partir de la termoterapia**

En el análisis de varianza se observó una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos ( $P = 0.02$ ) sobre el número promedio de brotes. Esto indica que la interacción temperatura-tiempo influye directamente en la aparición de brotes regenerados (Figura 13B). Para la regeneración de brotes los mejores tratamientos fueron a las 4 h a 33 y 37 °C, con los que se obtuvo una media mayor de  $4.86 \pm 1.23$  brotes por explante, así mismo los tratamientos menos efectivos fueron los realizados a 41 °C, esto sugiere que dicha temperatura produce cambios en la actividad hormonal y disminuye el crecimiento de los brotes (Itai *et al.*, 1973). La importancia de la regeneración de brotes radica en que estos mismos brotes saneados se pueden posteriormente micropropagar *in vitro* o en biorreactores para la multiplicación masiva de los mismos. Para el número de hojas

producidas, en el análisis de varianza se observó que no existen diferencias significativas  $P = 0.0985$  entre tratamientos que hayan sobrevivido al proceso de la termoterapia (Figura 13C). Se obtuvo una media mayor a  $5.99 \pm 1.48$  hojas en el tratamiento ocho (4 h - 37 °C), lo cual indicó que este tratamiento fue el de mayor producción de brotes y hojas. Sin embargo, la cantidad de hojas en los demás tratamientos fue en cierta medida aceptable, debido a que las hojas contienen los estomas y que son los encargados de realizar el intercambio gaseoso en la planta, al tener estomas activos la planta puede absorber  $\text{CO}_2$ , fijar el carbono y realizar sus funciones para su desarrollo (Taiz y Zeiger, 2006). Para ello, se recomienda que una vitroplanta obtenida tenga un promedio de hojas entre 4 y 6 hojas debido a que si el número de hojas es mayor la planta invierte mucha energía en nutrir a todo su tejido. Por lo que también se recomienda eliminar las hojas más grandes y pequeñas, dejando así las medianas para evitar la senescencia y que la energía producida se centre específicamente en las hojas aptas para que brinden apoyo para el desarrollo de la planta. Estudios realizados en tabaco (Itai *et al.*, 1973; Itai y Ben-Zioni, 1973) se observó una disminución de hojas producidas debido a las altas temperaturas. Anteriormente, Itai y Vaadia (1971) descubrieron que la temperatura influye directamente en la actividad de la kinetina en hojas tratadas térmicamente, esto sugiere que los cambios inducidos por el calor en las hojas están regulados por la acción de las citoquininas. La regeneración de hojas *in vitro* es importante, porque al momento de llevar la vitroplanta a *ex vitro* se favorecerá el proceso de aclimatación, por ello se recomienda que la termoterapia *in vitro* no solo se busque el saneamiento de la planta, sino más bien llevar el proceso a un óptimo desarrollo, promoviendo el crecimiento de brotes y hojas para así obtener un mayor éxito en la siguiente etapa del proceso de micropropagación.





**Figura 13.** Supervivencia de ápices libres de CTV, hojas y brotes tratados con termoterapia A) Porcentaje de supervivencia de los ápices introducidos B) Media del número de brotes, C) Media del número de hojas. Letras distintas en las columnas indican diferencias estadísticas ( $P \leq 0.05$ ) entre las variables.

## 2.5 CONCLUSIÓN

Todos los arboles muestreados presentan la enfermedad del CTV, esto presenta un riesgo fitosanitario para la zona citrícola de Cuitláhuac, Veracruz debido a la alta incidencia de la enfermedad dentro de sus cultivos. La diferencia de la técnica de los microinjertos y la termoterapia para el saneamiento de material vegetal *in vitro* varía entre la facilidad de emplearse, dado a que el índice de éxito es inversamente proporcional al tamaño de los explantes utilizados en los microinjertos y en la mayoría de las ocasiones se necesita la combinación con termoterapia para aumentar la probabilidad de obtener vitroplantas libres del virus CTV. Los resultados demostraron que los meristemos regenerados y explantes tratados mediante la termoterapia dieron negativo a CTV. Los meristemos apicales regenerados a oscuridad durante 15 días y 30 días de fotoperiodo durante 16 horas luz y 8 h oscuridad a 25 °C, presentaron mayor número de brotes y hojas. En la

termoterapia la exposición a temperaturas iguales o mayores a 39 °C disminuyo significativamente el porcentaje de supervivencia. La parte apical cultivada *in vitro* es útil para obtener clones de cítricos libres de virus. El tratamiento con mayor éxito fue a 37 °C durante 4 h, promoviendo la regeneración de  $4.86 \pm 1.23$  brotes y  $5.99 \pm 1.48$  hojas por explante. No se recomienda utilizar temperaturas mayores a 41 °C durante más de 5 h. La termoterapia dentro de un termociclador es adecuada y factible para la eliminación del CTV, dentro de vitroplantas de limón Persa. En posteriores investigaciones se pretende seguir la cadena de micropropagación para ver el efecto de las vitroplantas regeneradas por su estabilidad, vigor y sanidad, así como observar su tolerancia en la etapa de invernadero para obtener más información sobre la viabilidad de esta técnica.

## 2.6 LITERATURA CITADA

- Agusti, F.M, 2003. Citricultura. 2da edición. Mundi Prensa. Madrid, España 65–88 p.
- Arif, M., Ibrahim, M., Ahmad, A. and Hassan, S. 2005. Elimination of Citrus Tristeza Closterovirus from citrus bud-wood through thermotherapy. *Pakistan Journal of Botany* 37(2): 423.
- Baker, K. and Smith, S.H, 1966. Dynamics of seed transmission of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 4(1): 311–332.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M. and Gonsalves, D, 1979. The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv Virus Res* 25: 93–168.
- Burgess J. 1985. An introduction to plant cell development. Cambridge University Press, Cambridge, England. 101 p.
- Calavan, E.C., Roistacher, C.N. and Naver, E.M. 1972. Thermotherapy of citrus for inactivation of citrus viruses. *Pl Dis Repr* 56: 976–980.
- Cruz, D.S., Urbina, S.D., Basurto, V.I. and Montie, S.F, 2003. Análisis de estacionalidad de la producción y precios en el mercado de productos hortofrutícolas y frijol. SAGARPA. México, D.F. 25–30 p.
- Dawson, W.O. 1978. Recovery of tobacco mosaic virus RNA replication after incubation at 40 °C. *Intervirology* 9: 295–303.
- Domínguez, M.S., González, M.D.L.L., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles Ordaz, S.J. and Pérez, E. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*, 16(41) 53 p..
- FAO (2017) <http://www.fao.org/home/es/>, citado en marzo del 2018.



- Grondeau, C., Samson, R. and Sands, D.C. 1994. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13(1): 57–75.
- Hull, R. 1989. The movement of viruses in plants. *Annu Rev Phytopathol* 27: 213–240.
- Itai, C. and Ben-Zioni, A. 1973. Short- and long-term effects of high temperatures (47-49 °C) on tobacco leaves. II O-y uptake and amylolytic activity. *Physiol Plant* 28: 490–492.
- Itai, C., and Vaadia, Y. 1971. Cytokinin activity in water-stressed shoots. *Plant physiology* 47(1): 87–90.
- Itai, C., Ben-zioni, A., and Ordin, L. 1973. Correlative changes in endogenous hormone levels and shoot growth induced by short heat treatments to the root. *Physiologia plantarum* 29(3): 355–360.
- Kassanis, B. 1957. Some effect of varying temperature on the quality and quantity of tobacco mosaic virus in infected plants. *Virology* 4: 187–190.
- McCleannm, A.P.D. 1957. Tristeza virus of citrus; Evidence for absence of seed transmission. *Plant Dis Repr* 4(1): 821.
- Mink, G.I., Wample, R. and Howell, W.E. 1998. Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses, and viroids while maintaining plant survival. *Plant Virus Disease Control* 32–345.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach, M.R., Guerri, J. and Peña, L. 2008. Citrus Tristeza Virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9(2): 251–268.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.
- Nauer, E.M., Roistacher, C.N., Carson, T.L. and Murashige, T. 1983. *In vitro* shoot-tip grafting to eliminate citrus viruses and virus-like pathogens produces uniform budlines. *Hort Science* 18: 308–309.
- Navarro, L. 1979. Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus. *Boletín del servicio de plagas* 5: 127–148.
- Navarro, L. and Juarez, J. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative bud-wood. II. *In vitro* propagation. *Proc Intl Soc Citriculture* 3: 973–987.
- Navarro, L., Ballester, L.F., Juarez, J., Pina, J.A., Arrengnic, J.M. and Bono, R. 1981. Development of a programme for disease free citrus from citrus bud-wood in Spain, In: *Proc. Intl. Soci. Citriculture*. 70–73 p.

- Navarro, L., Roistacher, C.N. and Murashige, T, 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. J Amer Hor Soc 100: 471–479.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. and Terrada, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. Nucl Acids Res 27(6): 1564–1565.
- Roistacher, C.N. and Calavan, E.C. 1974. Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm glasshouse temperatures. Pl Dis Rep 58: 850–3.
- Roistacher, C.N. 1977. Elimination of citrus pathogens in propagative budwood. I. Budwood selection, indexing and thermotherapy. Proc Int Soc Citricult 3: 965–972.
- Ryugo, K. 1993. Fruticultura – Ciencia y arte. AGT Editor, S.A., México, D.F. 460 p.
- SIAP (2016) <https://www.gob.mx/siap/>, citado en marzo del 2018.
- SIAP (2017) <https://www.gob.mx/siap/>, citado en marzo del 2018.
- Starrantino, A. 1992. *In vitro* micrografting of citrus. Review of Plant Pathology 72: 184.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Ethylene: The Gaseous Hormone. In: Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. 567–586 p.
- Vidal, E., Moreno, A., Bertolini, E., Martínez, M.C., Corrales, A.R. and Cambra, M. 2012. Epidemiology of Citrus Tristeza Virus in nursery blocks of Citrus macrophylla and evaluation of control measures. Spanish Journal of Agricultural Research 10(4): 1107–1116.
- Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Damsteegt, V.D., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Rocha, M.A. and Niblett, C.L. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central-America and the Caribbean Basin and transmission of Citrus tristeza virus. J Econ Entomol 87: 1078–1085.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

### 1. CONCLUSIONES

- La regeneración de todos los meristemos sobrevivientes a través de la regeneración de meristemos apicales y la termoterapia dieron negativo al HLB y CTV siguiendo las metodologías para el diagnóstico fitosanitario descritas por Jagoeix *et al.* (1996) y Olmos *et al.* (1999).
- La regeneración de meristemos apicales con la presencia de la bacteria HLB, demostró que el medio MSBA3 con la mayor concentración de BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) y AIA (0.5 mg L<sup>-1</sup>) se logró obtener diferencia significativa con respecto al número de hojas con una media de  $1.5 \pm 0.32$ , produciendo más hojas que en los otros medios de cultivo evaluados.
- Para termoterapia de ápices con presencia de HLB se obtuvo que la temperatura idónea para el saneamiento es de 40 °C, donde se pudo generar un incremento en la sobrevivencia de los ápices, con mayor número de brotes y el porcentaje de vitroplantas libres de HLB fue mejor comparado con los tratamientos a 45 °C.
- En la regeneración de meristemos apicales para sanear vitroplantas con presencia de CTV se logró obtener una diferencia significativa con respecto al número de hojas producidas con una media de  $3.8 \pm 0.53$  hojas en un periodo de 15 días a oscuridad, así como un número mayor de brotes ( $1.81 \pm 0.34$ ) y meristemos apicales de limón Persa saneados.
- Para la termoterapia de ápices con presencia de CTV, el tratamiento con mayor éxito fue a temperatura de 37 °C durante 4 h, promoviendo la regeneración de 4.8 brotes y 5.9 hojas por explante. Además, no se recomienda utilizar temperaturas mayores a 41°C durante más de 5 h.
- La termoterapia de ápices dentro de un termociclador es adecuada y factible para la eliminación del HLB y CTV de dichos tejidos.

## **2. RECOMENDACIONES GENERALES**

El uso de la terapia de calor es simple y fácil de emplear. Los termocicladores son sistemas complejos y completos que brindan confiabilidad para el uso de esta técnica utilizando ápices menores a 5 cm, porque brinda homogeneidad en el explante y la temperatura-tiempo son específicamente controladas. Cabe recalcar que dicho equipo se encuentra en todos los laboratorios donde realizan diagnósticos moleculares, por ello es importante que se pueda buscar un uso alternativo de este instrumento para obtener más beneficios. La producción y distribución de vitroplantas libres de HLB y CTV es necesaria para obtener plantaciones de cítricos con mejores producciones y rendimientos dentro de la zona centro del estado de Veracruz. En posteriores investigaciones se pretende seguir la cadena de micropropagación para ver el efecto de las vitroplantas regeneradas por su estabilidad, vigor y sanidad, así como observar su tolerancia en la etapa de invernadero para obtener más información sobre la viabilidad de esta técnica.

### 3. ANEXOS

#### A1. Concentraciones de ADN de hojas con síntomas de HLB provenientes de campo.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/μL</b>	<b>260/230</b>
1	1559.6	1.68
2	1828.0	1.14
3	1235.2	1.26
4	1691.5	1.35
5	1736.7	1.55
6	1901.8	1.48

#### A2. Concentraciones de ADN provenientes de meristemos apicales regenerados *in vitro*.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/μL</b>	<b>260/230</b>
1	1257.6	1.41
2	1148.0	1.52
3	1105.2	1.56
4	1001.6	1.35

#### A3. Concentraciones de ADN provenientes de la termoterapia del HLB.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/μL</b>	<b>260/230</b>
1	1051.1	1.58
2	1225.4	1.60
3	1321.2	1.66
4	1410.6	1.75
5	1012.1	1.42
6	1705.4	1.47

#### A4. Concentraciones de ARN de hojas con síntomas de CTV provenientes.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/μL</b>	<b>260/230</b>
1	421.3	2.05
2	385.2	2.11
3	391.4	2.32
4	496.9	2.01
5	524.7	2.20

**A5.** Concentraciones de ARN provenientes de meristemos apicales regenerados *in vitro*.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>260/230</b>
1	229.8	2.18
2	520.4	2.04
3	381.3	2.23

**A6.** Concentraciones de ARN provenientes de la termoterapia de CTV.

<b>Muestra</b>	<b>Concentración ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>260/230</b>
1	337.1	2.22
2	288.3	2.25
3	421.2	2.21
4	233.3	2.04
5	393.2	2.30
6	579	2.55
7	433.6	2.40
8	536.7	2.34
9	278.1	2.13
10	503.1	2.40
11	396.7	2.41
12	339.5	2.40
13	646.3	2.44
14	296.8	2.29
15	401.1	2.49

## MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN LA INVESTIGACIÓN

### A6. Medio MS modificado para introducción y multiplicación de material vegetal.

- MS-----100 %
- Sacarosa----30 g L<sup>-1</sup>
- Phytigel®---2.5 g L<sup>-1</sup>
- KIN-----0.5 mg L<sup>-1</sup>
- BAP-----1 mg L<sup>-1</sup>
- Ácido cítrico---150 mg L<sup>-1</sup>
- Ácido ascórbico----100 mg L<sup>-1</sup>
- Myo-inositol-----100 mg L<sup>-1</sup>
- pH-----5.7

### A7. Medio MS modificado para multiplicación de meristemos.

- MS-----100 %
- Sacarosa----30 g L<sup>-1</sup>
- Phytigel®---2.5 g L<sup>-1</sup>
- AIA-----0.5 mg L<sup>-1</sup>
- BAP-----1 mg L<sup>-1</sup>
- Ácido cítrico---150 mg L<sup>-1</sup>
- Ácido ascórbico----100 mg L<sup>-1</sup>
- Myo-inositol-----100 mg L<sup>-1</sup>
- pH-----5.7