



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD**

FRUTICULTURA

DETECCIÓN DE TRISTEZA, HUANGLONGBING, XILOPOROSIS Y EXOCORTIS EN HUERTOS CITRÍCOLAS DE LA ZONA NORTE DE VERACRUZ

EMANUEL OVANDO BARROSO

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Emanuel Ovando Barroso, 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 DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTER, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis

DETECCIÓN DE TRISTEZA, HUANGLOMBINE, XILOPODOSIS Y ENDOMETIS EN HUERTOS DE CITRÍCULAS DE LA ZONA NORTE DE VERACRUZ

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 Consejero o Director 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.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 26 de NOVIEMBRE de 2018



Firma del
Alumno (a)

Ángel Villegas Monter
ÁNGEL VILLEGAS MONTER

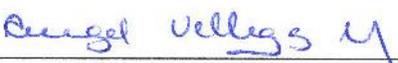
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Detección de tristeza, huanglongbing, xiloporosis, exocortis en huertos citrícolas de la zona norte de Veracruz** realizada por el alumno: **Emanuel Ovando Barroso** con 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
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



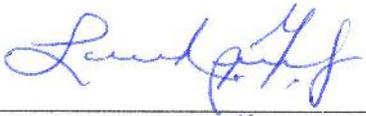
DR. ANGEL VILLEGAS MONTER

ASESOR



DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ

ASESORA



DRA. LUCERO DEL MAR RUÍZ POSADAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2018

DETECCIÓN DE TRISTEZA, HUANGLONGBING, XILOPOROSIS Y EXOCORTIS EN HUERTOS CITRÍCOLAS DE LA ZONA NORTE DE VERACRUZ, MÉXICO

Emanuel Ovando Barroso, M. en C.

Colegio de Posgraduados, 2018

RESUMEN

Los cítricos son los frutales más importantes en el mundo, México es el cuarto productor mundial y Veracruz es el principal estado citrícola. En plantaciones comerciales de cítricos de los municipios del norte de Veracruz se han observado árboles con decaimiento, brotes amarillos, hojas y frutos pequeños, además de descortezamiento y agrietamiento de tronco y ramas, síntomas que se han asociado a *Citrus tristeza virus* (CTV), *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Citrus exocortis viroid - citrus* (CEVd – cit) y *Hop stunt viroid – citrus*, (HpSVd – cit). Con base en ello se planteó la presente investigación con el objetivo de determinar la presencia y distribución de *Citrus tristeza virus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus exocortis viroid - citrus* y *Hop stunt viroid – citrus*, en árboles de naranjo, mandarina, lima persa y pomelo en seis municipios del norte de Veracruz. Se realizó extracción de ARN y DNA con el método Dellaporta (1983) con modificaciones. La detección de CLas se realizó por PCR con los iniciadores OI-1 y OI-2C y RT PCR para CTV, CEVd - cit y HpSVd - cit utilizando CPK-F / CPK-R, CVd-II-H/CVD-II-C y CEVd 1/CEVd 2 respectivamente. La incidencia más alta la presentó HpSVd - cit (83.4%), seguido de CTV (67.6 %), CEVd - cit (21.5 %) y CLas (9.8 %). Los municipios con mayor incidencia de CTV fueron Álamo y Papantla (100 %), seguido de Castillo (94.4 %) y Cazonas (80.9 %). CLas se encontró en Cazonas con una incidencia de 23.8 %. Por otro lado para HpSVd - cit

Castillo y Cazonas fueron los de mayor incidencia (100 %) y para CEVd - cit fue Álamo (53.3 %). Naranja Valencia fue la especie con mayor frecuencia de plantas muertas con 13.7 % y 20.3 % en comparación con mandarina Fairchild y "Tuxpeña".

Palabras clave: Cítricos, PCR, CTV, CLAs, CEVd – cit, HpSVd - cit.

**DETECTION OF TRISTEZA, HUANGLONGBING, XILOPOROSIS AND EXOCORTIS
IN CITRUS ORCHARDS IN THE NORTHERN ZONE OF VERACRUZ, MEXICO**

Emanuel Ovando Barroso, M. en C.

Colegio de Posgraduados, 2018

ABSTRACT

Citrus fruits are the most important fruits in the world; Mexico is the fourth greatest producer worldwide and Veracruz is the main citrus producer state in the country. In commercial citrus plantations in the municipalities of northern Veracruz have been observed trees showing wilting, yellow budding, small fruits and leaves, and de-barking and splitting of trunks and branches. These symptoms have been associated with *Citrus tristeza virus* (CTV), *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Citrus exocortis viroid - citrus* (CEVd – cit), and *Hop stunt viroid – citrus* , (HpSVd – cit). Based on this, the present research work was proposed with the objective of determining the presence and spread of *Citrus tristeza virus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus exocortis viroid – citrus*, and *Hop stunt viroid– citrus* in orange, mandarin orange, Persian lime, and grapefruit trees in six municipalities in northern Veracruz. RNA and DNA extractions were done using the Dellaporta (1983) method with modifications. The detection of CLas was done through PCR with initiators OI-1 and OI-2C, RT PCR for CTV, CEVd - cit and HpSVd - cit using CPK-F / CPK-R, CVd-II-H/CVD-II-C, and CEVd 1/CEVd 2, respectively. The highest incidence was found in HpSVd - cit (83.4%), followed by CTV (67.6 %), CEVd - cit (21.5 %), and CLas (9.8 %). The municipalities with the highest incidence of CTV were Álamo and Papantla (100 %), followed by Castillo (94.4 %) and Cazonas (80.9 %), for CLas it was Cazonas (23.8 %). In the case of HpSVd – cit,

Castillo and Cazonas had the greatest frequency (100 %), while for CEVd - cit it was Álamo (53.3 %). Naranja Valencia was the species with the highest frequency of dead plants, with 13.7 % and 20.3 %, compared with Fairchild mandarin orange and "Tuxpeña".

Key words: Citrus fruits, PCR, CTV, CLas, CEVd – cit., HpSVd – cit.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y al colegio de posgraduados por mi preparación profesional

Al Dr. Villegas por sus consejos y tiempo invertido para mi preparación profesional.

Al Dr. Daniel por su orientación y por facilitarme los reactivos y equipo de laboratorio.

A la Dra. Lucero del Mar por su apoyo y orientación durante la investigación.

A la familia Villegas por su cálido recibimiento durante los viajes de estudio en Cazonas de Herrera.

A los productores de Álamo, Castillo, Cazonas, Tihuatlán, Tuxpan y Papantla por permitir realizar el muestreo en sus parcelas.

Al Mc. Candelario y Mc Rosalba Maya por su apoyo y asesoría en la parte de laboratorio.

DEDICATORIA

A mis padres Nohemi Barroso Aguilar, Manuel Enrique Ovando Cruz por su apoyo y animos que me dieron para culminar este proyecto.

A mi esposa, por su amor, comprensión, y a sus oraciones diarias hacía mi persona.

A los productores e ingenieros de Veracruz que hicieron posible este trabajo.

A mi amigo David Preza por su amistad y los momentos que convivimos.

A Doña Angeles, Sandra, Rosalba, Laura y don memo por los momentos de diversión que pasamos en el laboratorio.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
AGRADECIMIENTOS	viii
DEDICATORIA	ix
CONTENIDO	x
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
HIPÓTESIS	5
REVISIÓN DE LITERATURA	6
Patógenos de los cítricos	6
Tristeza de los cítricos.....	6
Huanglongbing	10
Viroides	14
Exocortis de los cítricos	14
Cachexia de los cítricos.....	16
Distribución de CEVd y HSVd	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Extracción de ácidos nucleicos totales	21
6.4 PCR	22
Retrotranscripción-PCR (RT- PCR)	23
PCR	24
Evaluación de la incidencia de síntomas asociados a Tristeza.....	25
Análisis de datos.....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26

<i>Citrus tristeza virus</i>	27
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	32
<i>Citrus exocortis viroid</i>	36
<i>Hop stunt viroid</i>	40
Presencia de una, dos, tres y cuatro patógenos por planta	43
Incidencia de síntomas asociados a tristeza en una huerta de cítricos en la Concepción, Tehuacán Ver.....	44
CONCLUSIONES	47
LITERATURA CONSULTADA	48
APENDICE	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Muestras obtenidas por especie y municipio	21
Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la detección de los patógenos en estudio.	23
Cuadro 3. Porcentaje (%) de plantas positivas a <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV), <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> (CLas), <i>Hop stunt viroid</i> - citrus (HpSVd - cit), <i>Citrus exocortis viroid</i> – citrus, por municipio (CEVd - cit).	27
Cuadro 4. Porcentaje (%) especies de cítricos positivas a <i>Citrus tristeza virus</i> por municipio	36
Cuadro 5. Porcentaje especies de cítricos positivas a <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> por municipio.	35
Cuadro 6. Porcentaje (%) especies de cítricos positivas a <i>Citrus exocortis viroid</i> – citrus por municipio	39
Cuadro 7. Porcentaje (%) especies de cítricos positivas a <i>Hop stunt viroid</i> - citrus por municipio.	42
Cuadro 8. Porcentaje (%) de plantas muertas, sintomáticas y asintomáticas en huerta de naranjo, mandarina Fairchild y Tuxpeña en la Concha, Veracruz.	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Municipios de la zona norte de Veracruz, donde se realizó el estudio. **21**
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos con iniciadores CPK-R Y CPK-F que amplifican un fragmento de 273 pb de la CP. Carril 1: Control positivo (Planta positiva a CTV); Carril 2: Control negativo (Agua); Carril 4-12: Muestras 34-45. **28**
- Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR obtenidos con iniciadores OI-1 y OI-2C que amplifican un fragmento de 1163 pb de 16s rDNA. Carril 1 y 18: Marcador de 1Kb, Carril 2: Control positivo (Planta positiva a CLas; Carril 3: Control negativo (Agua); Carril 4-10: 2, 11, 18, 20, 23, 47, 61, 84, 98..... **33**
- Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos con iniciadores CEVd -1y CEVd-2 que amplifican un fragmento de 371 pb del genoma. Carril: Marcador de 100pb, Carril 2: Control positivo (Planta positiva a CVd-II); Carril 3: Control negativo (Agua); Carril 4-19: Muestras **36**
- Figura 5.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos con iniciadores CVd-II-H y CVd-II-C que amplifican un fragmento de 300 pb del genoma. Carril: Marcador de 100pb, Carril 2: Control positivo (Planta positiva a HpSVd - cit); Carril 3: Control negativo (Agua); Carril 4-19: Muestras de la 84-99 **40**

INTRODUCCIÓN

Los cítricos forman parte de los frutales más importantes a escala mundial, con cosechada 5,044,110 de hectáreas y 90.534 millones de toneladas cosechadas. México es el cuarto productor precedido de India, Brasil y China (FAO, 2016). Veracruz es el principal estado cítrico en México con 230,543 ha, las principales especies cultivadas son naranjo Valencia (*Citrus sinensis*) (165,323 ha), lima persa (*C. latifolia*) (45,384 ha), mandarina Dancy (*C. reticulata*) (8,456 ha), pomelo (*C. paradisi*) (7,465 ha), naranjo agrio (*C. aurantium*) (1,578 ha) (SIAP, 2017).

Los cítricos en México son afectados por enfermedades de importancia cuarentenaria como: Tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV), psorosis (*Citrus psorosis virus*, CPsV), leprosis (*Citrus leprosis virus*, CiLV), Huanglongbing (HLB) (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLas), Clorosis variegada de los cítricos (CVC) (*Xylella fastidiosa* subsp. *Pauca*), cancro (*Xanthomonas citri* subsp. *Citri*), cachexia (*Hop stunt viroid* – citrus, HSVd - cit), exocortis (*Citrus exocortis viroid* - citrus, CEVd - cit) (Rivas-Valencia, 2010; Trujillo, 2010, Alvarado *et al.*, 2000, Timmer *et al.*, 2000)

La tristeza de los cítricos causada por CTV, es considerada la enfermedad más devastadora (Moreno *et al.*, 2008) debido a que ha causado la muerte de 100 millones de árboles a nivel mundial (Lee y Bar-Joseph 2000) en árboles injertados sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). El primer reporte de la presencia de tristeza de los cítricos en México fue en el estado de Tamaulipas en 1983 (SENASICA, 2016), de acuerdo al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) se encuentra distribuido en todas las zonas productoras de cítricos de México. Los principales vectores son *Toxoptera citricida* y *Aphis gossypii* (Karasev, 1995), además

se puede transmitir por material vegetal y herramientas contaminadas (Dawson *et al.*, 2015).

El Huanglongbing es otra de las enfermedades importantes en cítricos, está asociado a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* la cual se transmite de manera semipersistente por *Diaphorina citri* (Bové, 2006), por material vegetal y herramientas contaminadas (Vuuren, 1993). Se estima que ha ocasionado la muerte de más de 63 millones de árboles, principalmente en Asia y Sudamérica (Bové, 2006). La enfermedad fue detectada por primera vez en México en 2009 en árboles de lima persa en Tizimin, Yucatán (Trujillo, 2010), actualmente se encuentra presente en los 24 estados productores de cítricos (SENASICA, 2018).

Otras enfermedades presentes en cítricos son causadas por viroides, los cuales están compuestos por RNA de cadena simple que no codifica proteínas y con replicación autónoma en su hospedante (Eiras *et al.*, 2009). Los de mayor importancia son cachexia y exocortis. La exocortis de los cítricos, es causada por CEVd, descrita por primera vez por Fawcett y Klotz en 1948 en naranjo trifoliada (*Poncirus trifoliata*), su RNA tiene de 370-372 pb (Semanick y Weathers, 1972), y es transmitido por material propagativo y herramientas infectadas (Müller, 2004). La cachexia está asociada a HpSVd - cit, fue descrita por primera vez en Palestina (Reichery y Perlberger, 1934) ocasionando picado de tallo en *Citrus limettioides* (Müller, 2005), este viroide fue incluido en el grupo CVd-II y posee un genoma RNA con 300 pb, (Duran-Vila *et al.*, 1986).

En algunas huertas de cítricos de los municipios del norte de Veracruz se han observado plantas con decaimiento, brotes amarillos, hojas y frutos pequeños, e

incluso muerte de árboles. Los productores y técnicos han asociado los síntomas al HLB, sin embargo, no existen evidencias que determinen el o los agentes causales que se encuentran asociados a estos síntomas. Además, en algunas plantaciones se ha observado descortezamiento y agrietamiento de tronco y ramas, síntomas que los productores atribuyen a *Phytophthora* spp, debido a la presencia de goma. Con base en ello se planteó en esta investigación, determinar la presencia y distribución de *Citrus tristeza virus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus exocortis viroid* - citrus y *Hop stunt viroid* – citrus, en árboles de naranjo, mandarina, lima persa y pomelo en seis municipios del norte de Veracruz.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la presencia y distribución de *Citrus tristeza virus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus exocortis viroid* – citrus y *Hop stunt viroid* – citrus en plantaciones citrícolas de seis municipios del estado de Veracruz.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la incidencia de *Citrus tristeza virus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Hop stunt viroid* - citrus y *Citrus exocortis viroid* – citrus en plantaciones de naranjo, mandarina, lima persa y pomelo de los municipios de Álamo, Castillo, Cazonas, Tihuatlán, Tuxpan y Papantla, Ver.
- Evaluar la incidencia de plantas muertas y sintomáticas en una huerta de naranjo, mandarina Farchild y Tuxpeña en la Concepción, Tihuatlán, Veracruz.

HIPÓTESIS

- *Citrus tristeza virus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus exocortis viroid* – citrus y *Hop stunt viroid* - citrus se encuentran presentes en plantaciones citrícolas de Álamo, Castillo, Cazones, Tihuatlán, Tuxpan y Papantla.

REVISIÓN DE LITERATURA

Patógenos de los cítricos

De acuerdo con Duran-Vila y Moreno (2000) los principales fitopatógenos en cítricos son: *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus leprosis virus* (CiLV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Candidatus Liberibacter* spp, *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri, *Spiroplasma citri*, *Hop stunt viroid* (HpSVd - cit) y *Citrus exocortis viroid* - citrus (CEVd - cit).

Tristeza de los cítricos

Esta enfermedad es considerada la más devastadora de los cítricos, (Roistacher, 2004), en la década de los 30's provocó la muerte de 18 millones de árboles en Argentina, 10 millones en Brasil (1937), En España el primer brote de la enfermedad de esta enfermedad se registró en 1957 en la Comunidad Valenciana España, provocando la muerte de 40 millones de árboles de naranjo y mandarina injertados sobre portainjertos de naranjo agrio.y en Venezuela durante la década de 1980 se tuvo la muerte de 16 millones (Rocha-Peña, 1995).

Agente causal

La tristeza de los cítricos es causada por *Citrus tristeza virus* (familia Closteroviridae), que contiene virus con genoma mono, bi y tripartita de RNA monocatenario de sentido positivo (Agranovsky, 1996). Los viriones son flexuosos (2.000 nm x 10-12 nm) encapsulados por dos proteínas de la cápside: la mayor (CP), cubre aproximadamente

97 % del virión, y la menor (CPm), cubre los 5 a 630 nucleótidos terminales (Satyanarayana, 2004). El genoma de 19.3 Kb se divide en doce marcos de lectura abiertos (ORF) que pueden codificar al menos 12 proteínas y dos regiones terminales no traducidos (NTR) en los extremos 5' y 3' (Karasev, 1995).

Antecedentes

El CTV probablemente se originó en China y debido al movimiento de material vegetal infectado se diseminó a China a Japón, Filipinas, Australia y Sudáfrica (Roistacher, 2004). Las epidemias causadas por *Phytophthora* spp. han estado estrechamente relacionadas a las de CTV ocasionado por la utilización de naranjo agrio como portainjerto. Los primeros países en utilizar este portainjerto por ser tolerante a *Phytophthora* spp fueron Australia y Sudáfrica en los años de 1870 y 1895 respectivamente (Roistacher, 2004). Por lo anterior estos países fueron los primeros en presentar declinamiento repentino de árboles provocados por CTV (Fraser y Broadbent, 1979). La primera problemática con este virus en América se presentó en Argentina en 1930 y posteriormente en Brasil en 1937 donde la superficie establecida estaba plantada con naranjo agrio, provocando la muerte de millones de árboles (Roistacher, 2004). Wallace *et al.*, (1956) mencionan que existen registros de la exportación de 1,400 plantas de naranjo de Sudáfrica a Argentina en el año de 1937, las cuales probablemente estaban infectadas con CTV y fueron las responsables de diseminarlo. Roistacher (2004) menciona que se reportaron epidemias de la enfermedad en Estados Unidos en 1951, Venezuela en 1980 y que a finales de la década de 1990 fue observada por primera vez en Costa Rica, el Salvador y Panamá. La pérdida de la

industria de naranja Washington Navel en California fue resultado directo de la importación de plantas infectadas con variantes severas de CTV provenientes de Japón (Roistacher, 2004).

Distribución en México

Citrus tristeza virus se encuentra distribuido en todos los países citrícolas del mundo (Fu, 2016). En México el primer reporte de CTV fue en 1983 en Tamaulipas y en 1986 en Veracruz (SAGARPA, 2001). De acuerdo con SENASICA (2014), se encuentra distribuido en todas las zonas citrícolas del país. Sin embargo, a pesar de la erradicación de los focos iniciales, la enfermedad ha seguido extendiéndose (Rivas-Valencia *et al.*, 2010). Los aislados de CTV prevalentes en Yucatán han sido del tipo moderado (Rivas-Valencia *et al.*, 2010), mientras que se han detectado aislados severos en Nuevo León, Colima, Baja California, Veracruz y Tamaulipas (Herrera-Isidró *et al.*, 2009).

Transmisión

Este virus es transmitido por propagación vegetativa, mecánica y por diversas especies de áfidos de forma semipersistente (Dawson *et al.*, 2015). El uso de material propagativo infectado es importante en la diseminación de la enfermedad hacia nuevas áreas, mientras la transmisión mecánica e insectos vectores es de relevancia en su dispersión de manera local. El vector más eficiente es *Toxoptera citricida*, el cual se ha reportado en Asia, Australia, África, América Central y América del Sur (Rocha-Peña *et al.*, 1995), seguido de *Aphis gossypii* (Marroquín *et al.*, 2004). En estudios de

transmisión comparativa de varios aislados de CTV se encontró que *T. citricida* puede transmitir al virus de 6 a 25 veces con mayor eficiencia (Yokomi *et al.*, 1994).

Varios factores influyen en la transmisión de CTV en una plantación: Las especies de áfidos vectoras (Cambra *et al.*, 2000), condiciones ambientales (Bar-Joseph y Loebenstein, 1973), susceptibilidad de las variedades de cítricos (Marroquín *et al.*, 2004) y patogenicidad de los aislamientos predominantes del virus (Bar-Joseph *et al.*, 1989;).

Hospedantes y síntomas

La mayoría de las especies de cítricos y algunas pertenecientes a otros géneros de la familia *Rutaceae*, y de los géneros *Aeglopsis*, *Afraegle* y *Pamburus* son susceptibles a ser infectadas por el virus (McClellan, 1960). Las únicas plantas hospedantes no rutáceas son *Passiflora gracilis*. (Müller *et al.*, 1974) y *P. caerulea* (Roistacher y Bar-Joseph, 1987).

La expresión de los síntomas varía conforme a las especies hospedantes en la copa, portainjerto y con la severidad del aislado del virus (Walter *et al.*, 2005). En cultivares de pomelo, naranjo y limas se visualizan picado del tallo cuando se desprende la corteza (Garnsey *et al.*, 1996). La fruta en los árboles infectados reduce su tamaño y calidad (Sharia, 2004), presenta albedo espeso, acidez elevada y bajo contenido de jugo; estos síntomas son observados en especies de cítricos más susceptibles, como la naranja, lima mexicana (*C. aurantiifolia*), lima Tahiti y pomelo los árboles afectados reducen su vigor (Walter *et al.*, 2005), en algunos casos la raíz se vuelve frágil y se rompe fácilmente (Sharia, 2004). Por otra parte, síntomas severos de CTV se han

registrado en áreas como Estados Unidos, Sudáfrica, Brasil, España, India, China y otros países del este (Bar- Joseph, 1989).

Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad se ha realizado mediante plantas indicadoras, principalmente lima mexicana o plántulas de *C. macrophylla* (Roistacher, 1991). Después de la purificación del CTV, se produjeron diferentes antisueros y anticuerpos monoclonales para la cubierta proteica permitiendo la detección de CTV por procedimientos inmunoenzimáticos, (Nikolaeva *et al.*, 1998). Posteriormente con técnicas serológicas como ELISA las investigaciones se expandieron a áreas como la epidemiología, al movimiento del virus o caracterización de aislamientos (Gottwald *et al.*, 2002). Después de la secuenciación completa de nucleótidos del CTV fue posible realizar hibridación de sondas de cDNA o cRNA (Barbarossa y Savino, 2006) así como la amplificación de segmentos conservados mediante RT-PCR (Olmos *et al.*, 1999).

Huanglongbing

El huanglongbing es considerada una de las enfermedades más devastadoras (Manjunath *et al.*, 2008), esta enfermedad afecta a todas las variedades comerciales de cítricos en muchos países del sudeste de Asia, sur y–costa este de África (Robles-González *et al.*, 2014). De acuerdo a la FAO (2013) se estima la muerte de 100 millones de plantas y diseminación de la enfermedad a varios continentes.

Agente causal

El huanglongbing está asociado a la bacteria *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam), *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf). Pertenecientes a las α -proteobacterias, gram-negativas dentro de la familia Rhizobiaceae. El nombre de *Candidatus Liberibacter* se deriva del término *candidatus* que se utiliza para designar a los organismos que no se pueden cultivar y por lo tanto no pueden ser clasificados por técnicas tradicionales (Murray y Stackebrandt, 1995) y *Liberibacter* del latín *Liber* (Corteza) y *bacter* (bacteria) (Jagouexi *et al.*, 1994).

Antecedentes

Aunque el origen es poco claro, se asume que la enfermedad se originó en China durante la década de 1890, en donde se le dio el nombre de “huang long bing” (enfermedad del brote amarillo) (Da Graça, 1991).

Zhao (1981) menciona que la enfermedad estuvo presente en plantaciones de cítricos por más de 100 años. La enfermedad en áreas citrícolas de África se notó en la década de 1920 (Van der Merwe y Andersen, 1937). En el año 2004 se encontró por primera vez en el continente americano en São Paulo, Brasil (Teixeira *et al.*, 2004) y en Florida, Estados Unidos (Halbert, 2005). La enfermedad se propagó rápidamente en ambos países causando importantes pérdidas (Da Graça, 2016). El HLB se ha diseminado por los países vecinos de Brasil, como Argentina y Paraguay (Lopes *et al.*, 2013). Además está presente en varios países del Caribe como Cuba (Luis *et al.*, 2009), Jamaica (Oberheim *et al.*, 2011), Belice (Manjunath *et al.*, 2010) y México (Trujillo- Arriaga *et al.*, 2010).

Distribución

El HLB se ha encontrado en 39 países, donde la variante CLaf se distribuye en África y Asia, mientras que CLam se encuentra en Brasil y CLas está ampliamente distribuido en Asia, Sudamérica, Centroamérica y Norteamérica (Teixeira, 2008).

En México se encuentra presente en 24 estados, de los cuales en 285 municipios se han detectado en material vegetal y 154 tienen presencia en psíidos (SENASICA, 2018).

Transmisión

La transmisión de CLas es principalmente por insectos vectores y por propagación vegetativa (Vuuren, 1993) y experimentalmente por cuscuta y semilla (Tirtawidjaja, 1981). Aunque Hartung *et al.*, (2010) y Hilf (2011) no encontraron evidencia de transmisión por semillas obtenidas de frutas con síntomas.

Candidatus Liberibacter spp. es una bacteria persistente que se reproduce dentro del insecto y es capaz de transmitirse a otras generaciones (Pelz-Stelinsky *et al.*, 2010).

Diaphorina citri es la principal vectora de CLas y CLam mientras que *Trioza erytreae* lo es de CLaf (Hall, 2008).

Hospedantes y síntomas

El huanglongbing afecta a todos los cultivares de cítricos; naranjo dulce, tangelo, y mandarina, siendo las más susceptibles; mientras que la lima, el pomelo y las naranjas trifoliadas son las más tolerantes (Knapp *et al.*, 2004).

Los síntomas varían dependiendo de la edad del árbol, época del año y etapa de la infección (Da Graca, 2004). Los síntomas generalmente comienzan con amarillamiento

de brotes, pero si la infección ocurre poco después de la propagación, el amarillamiento se observa en todo el dosel, si la infección ocurre en una etapa posterior del crecimiento, los síntomas y el organismo causal permanecen en el brote infectado (Oberholzer *et al.*, 1965).

Otros síntomas, asociados a HLB son hojas coriáceas, caída de frutos y floración fuera de temporada (Martinez, 1972). En infecciones severas se presenta defoliación excesiva, muerte de ramas y reducción de la calidad de frutos (Oberholzer *et al.*, 1965). CLaf ocasiona amarillamiento intervenal, moteado (Manicom y Van Buuren, 1980), reducción de la lámina foliar y manchas cloróticas (McClellan y Schwarz, 1970). CLas induce síntomas similares, aunque con amarillamiento más extenso, además de marchitamiento y muerte de plantas (Zhao, 1981). Además de que se considera más tolerante a altas temperaturas (Schwarz, 1968).

La severidad de síntomas causados por CLas puede aumentar por la presencia de otros patógenos (Da Graca, 2004). Se ha reportado infección múltiple con CTV, en plantaciones con síntomas severos en varios países de Asia (Huang *et al.*, 1980). Sin embargo otros autores señalan que ciertos aislados de CTV protegen de la infección por HLB, (van Vuuren *et al.*, 2000). Además del moteado asimétrico, la principal característica de la enfermedad puede ser causada por otros patógenos *Spiroplasma citri*, aislamientos severos de CTV y daños por *Phytophthora* spp. en la raíz (Da Graca, 2004).

Diagnóstico

La detección de la bacteria causante de HLB se ha realizado PCR y PCR en tiempo real PCR-RT, también conocida como PCR cuantitativa, ambas pruebas se basan en el uso de iniciadores que amplifican las secuencias de los genes 16s rRNA (Jagoueix *et al.*, 1996). La baja concentración y distribución irregular de la bacteria en las plantas hospedantes, así como los inhibidores de la PCR presentes en los extractos de cítricos, han dificultado su detección (Da Graca y Korsten, 2004).

Viroides

Los viroides son agentes subvirales constituidos de RNA, de 246 y 401 nucleótidos, son diez veces más pequeños que las partículas virales (Eiras *et al.*, 2009). Son considerados parásitos del núcleo o cloroplastos y dependen totalmente de la célula hospedante para replicarse (Ding y Wang, 2009).

Exocortis de los cítricos

Antecedentes

Fawcett y Klotz (1948) describieron la enfermedad del descortezamiento en portainjertos trifoliados y la denominaron exocortis (exo= exterior y cortis =corteza). Benton *et al.* (1950) describieron una grave enfermedad consistente en el descortezamiento severo de la base del tallo de portainjertos trifoliados en Australia y la llamaron sarna. Bitters (1952) sugirió que la exocortis de los cítricos era causada por un agente viral debido a que pudo transmitirla mediante inoculación mecánica también

demonstraron que los limones nucelares no eran portadores, así mismo mostró no había insectos vectores involucrados en su transmisión y propuso el uso de portainjertos trifoliados como plantas indicadoras de esta enfermedad.

Agente causal

La exocortis de los cítricos es causada por *Citrus exocortis viroid* - citrus (CEVd - cit) el cual presenta su genoma consiste en 370 nucleótidos pertenece al género *Pospiviroid* y a la familia *Pospiviroidae* (Flores *et al.*, 2005). La molécula de RNA del CEVd, es del tipo bastón con fuerte estructura secundaria, posee una región conservada (RC) y una región terminal (RT) (Eiras *et al.*, 2009).

Hospederos y síntomas

La exocortis presenta amplio rango de hospederos pudiendo infectar plantas de importancia económica de otras familias botánicas distantes evolutivamente de las rutaceae, como tomate (*Solanum lycopersicum*), berenjena (*Solanum melongena*), zanahoria (*Daucus carota*), vid (*Vitis* spp.), entre otros.

CEVd puede infectar diversos cultivares de cítricos, los más sensibles son portainjertos trifoliados, lima rangpur (*C. limonia*), *C. latifolia* y cidras, por lo que estas últimas son utilizadas como plantas indicadoras (Müller *et al.*, 2005).

Los árboles infectados por exocortis presentan agrietamiento en el tallo y estrías en ramas, vegetación escasa, manchas cloróticas y reducción del crecimiento de acuerdo con la combinación injerto/portainjerto (Müller *et al.*, 2005) En ocasiones se producen lesiones en el epicarpio de la corteza siendo invadidas por *Phytophthora* spp. que

causan exudados en forma de goma y frecuentemente determinan la muerte de la planta (Müller *et al.*, 2005).

Transmisión

La transmisión de CEVd - cit se lleva a cabo por injerto de yemas infectadas en árboles sanos o de forma mecánica a través del uso de la herramienta de corte y poda (Lin *et al.*, 2015).

Cachexia de los cítricos

Antecedentes

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en Palestina (Reichert y Perlberguer, 1934) en lima de chichi (*C. limettioides*) con síntomas de acanaladuras en la corteza (*C. limettioides*) (Müller, 2005). El término cachexia fue usado en California, Estados Unidos, cuando se observó una enfermedad en tangelo Orlando (*C. reticulata* x *C. paradisi*), con presencia de acanaladuras en la unión del portainjerto con el injerto y daños en frutos con impregnaciones de goma (Childs, 1950). La naturaleza viroidal de la caquexia, fue sugerida por primera vez por Roistacher *et al.*,(1983) al describir las similitudes entre esta y exocortis. Esta enfermedad se encuentra distribuida en prácticamente todas las áreas citrícolas del mundo (Roistacher *et al.*, 2004). La mayoría de los cultivares de cítricos comerciales son portadores asintomáticos y el patógeno se transmite mecánicamente y por material propagativo (Roistacher y Duran-Vila, 1988). Palacio-Bielsa (1999) demostró que cachexia y xiloporosis son causadas por el mismo patógeno.

Agente causal

El agente causal es *Hop stunt viroid* – citrus (HpSVd - cit) (Semancick *et al.*, 1988) posee 300 nucleótidos y fue incluido en el grupo CVd-II de viroides de los cítricos (Duran-Vila *et al.*, 1986). Mediante indexación biológica, se encontró que existen aislados que causan cachexia y otros no, estos últimos no patogénicos, comportándose de manera latente en especies consideradas sensibles. Por lo anterior se establecieron los grupos CVd-IIa y CVd-IIb, que incluyen aislamientos patogénicos y no patogénicos, respectivamente (Müller *et al.*, 2005).

Hospedantes y síntomas

De acuerdo con Müller *et al.* (2005) algunos tangelos, lima persa y mandarina son susceptibles. En principal síntoma de la enfermedad es el descortezamiento y en etapas más avanzadas de la enfermedad se observan acanaladuras longitudinales en la corteza. En el injerto, o portainjerto se presenta levantamiento de la corteza, reducción de la lámina foliar y puntos cloróticos (Müller *et al.*, 2005).

Transmisión

HpSVd se transmite de manera mecánica a través de herramientas de poda y material propagativo infectado (Roistacher, 1980).

Distribución de CEVd y HSVd

Los viroides de cítricos se han reportado en la región del Mediterráneo, Australia, norte y sur de África, Europa, Asia y en el Continente Americano (Timmer *et al.*, 2000; Hadidi *et al.*, 2003).

En México se encuentran presentes en todas la regiones cítrícolas sin embargo no son considerados como un problema fitosanitario de los cítricos, a pesar de que en varios casos se han detectado incidencias superiores al 60% de árboles infectados por ambos viroides (Alvarado, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

De febrero a mayo del 2018 se muestrearon árboles de huertos comerciales de cítricos en los municipios de: Álamo, Castillo, Cazones, Tihuatlán, Tuxpan y Papantla, Veracruz (Figura 1).

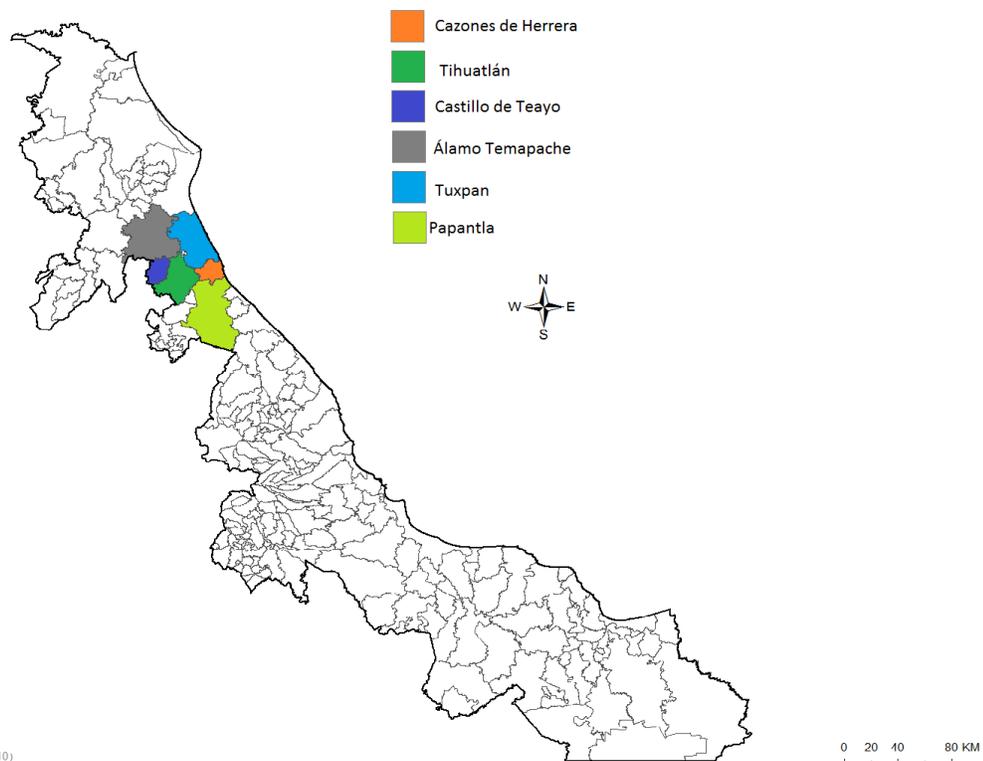


Figura 1. Municipios de la zona norte de Veracruz, donde se realizó el estudio.

Se seleccionaron plantas naranjo, mandarina, lima persa y pomelo con brotes amarillos o frutos pequeños y de cada una se obtuvieron cuatro brotes maduros, de los cuatro puntos cardinales a la altura media de la copa del árbol. El material vegetal fue guardado en bolsas herméticas y depositados en hielera para su traslado al laboratorio.

A cada árbol muestreado se le evaluó la presencia de agrietamiento y descortezamiento en tronco y ramas

Muestras obtenidas

Se muestrearon 102 plantas de los cuales 66 muestras fueron de naranjo, 22 de mandarina, siete de lima persa y siete de pomelo. El número de muestras por municipio fueron: Álamo 15, Castillo 18, Cazones 21, Tihuatlán 18, Tuxpan 21 y Papantla 10 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Muestras obtenidas por especie y municipio.

Municipio	ESPECIE			
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. latifolia</i>	<i>C. paradisi</i>
Álamo	10	3	1	1
Castillo	17	1	-	-
Cazones	10	2	6	3
Tihuatlán	11	6	-	1
Tuxpan	10	10	-	-
Papantla	8	-	-	2
Total	66	22	7	7

(-) Especies no muestreadas.

De las plantas muestreadas 12 presentaban, agrietamiento, 40 descortezamiento, 16 ambos síntomas y 35 fueron asintomáticas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de plantas de cítricos con descortezamiento y agrietamiento en el tronco y ramas principales, por municipio.

Municipios	Sintomatología			
	Agrietamiento	Descortezamiento	A+D	Asintomáticas
Álamo ¹	3	7	2	3
Castillo ²	4	6	5	3
Cazones ³	0	8	0	13
Tihuatlán ⁴	2	6	3	7
Tuxpan ⁵	3	6	6	6
Papantla ⁶	0	7	0	3
Total	12	40	16	35

Extracción de ácidos nucleicos totales

Se procesó el material vegetal obteniendo la nervadura central para la detección de CLas y CTV. Para HpSVd - cit y CEVd - cit se utilizó una porción de la corteza de los brotes de cada muestra. La nervadura central y la corteza fueron trituradas y depositadas en viales de 2 ml, etiquetadas de acuerdo al número de muestra y almacenadas a -20°C.

La extracción de DNA y RNA se realizó con el protocolo indicado de Dellaporta, (1983) con las siguientes modificaciones: se maceraron 0.2 gramos de nervadura y corteza con nitrógeno líquido, posteriormente fueron transferidos a un tubo eppendorf que contenía 750 µl de EB1 y 75 µl de SDS 20 % y se mezclaron por inversión cinco veces. Los tubos se incubaron a 65°C por 20 minutos y mezclaron por inversión cada 5 minutos. Después se agregó 250 µl de acetato de potasio al 5 M y se incubaron en hielo por 20 minutos. La mezcla fue centrifugada a 15000 rpm por 20 minutos a

temperatura ambiente. Posteriormente 900 µl de la fase acuosa fue transferida a un tubo que contenía 540 µl de isopropanol y se incubaron a -20°C durante 30 minutos, después se centrifugaron a 15000 rpm por 15 minutos desechando el sobrenadante. La pastilla se dejó secar por 20 minutos se disolvió con 700 µl de EB2 y los tubos se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente 500 µl de la parte superior fueron transferidos a un nuevo tubo que contenía 75 µl de acetato de sodio 3 M y 500 µl de isopropanol, y se mezcló por inversión de 5 a 10 veces. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 15000 rpm durante 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla formada fue disuelta con 1 mL de etanol 75 % centrifugada a 15000 gravedades durante 5 minutos, después se dejó secar la pastilla y para resuspenderla resuspendió en agua. La concentración y pureza de los ácidos nucleicos obtenidos se cuantificó en un Nanodrop ThermoScientific®.

6.4 PCR

Iniciadores

Los iniciadores utilizados para la detección de CTV, CLas, HpSVd - cit y CEVd - cit se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Iniciadores Forwards y Reverse utilizados para la detección de los patógenos de estudio.

Patógeno	Iniciadores	RC ¹	TP ²	Referencia
CLas	OI-1 5'GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA3'	16s	1163 pb	Jagoueix <i>et al.</i> , 1994
	OI-2c 5'GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT3'	rDNA		
CTV	CPK F- 5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA 3'	Cápside proteica	273 pb	(Rivas <i>et al.</i> , 2008)
	CPK R- 5' TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC 3'			
HpSVd- cit	CVd-II-h 5' CGCCCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCC 3'	Genoma completo	300 pb	Almeyda <i>et al.</i> , 2002
	CVd-II-C (5' GCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG 3'			
CEVd - cit	CEVd 1- 5'CCCTGAAGGACTTCTTCCCC 3'	Genoma completo	371 pb	Yang <i>et al.</i> ,1992
	CEVd 2- 5' ATCCCCGGGAAACCTGGAGGAA 3'			

RC¹: Región codificante TDP²: Tamaño del producto

Retrotranscripción-PCR (RT- PCR)

Para la detección CTV, HpSVd - cit y CEVd - cit, la amplificación consistió en dos etapas: la primera etapa fue la reverso transcripción (RT) para la síntesis de DNA complementario (DNAC) y la segunda para la amplificación de éste (PCR).

Para la RT, se preparó una mezcla por muestra de 0.5 µl del iniciador antisentido, 4.5 µl de H₂O y 2 µl de RNA por muestra y se incubó en un termociclador Techne® TC-512 a 72 °C por 5 minutos. Posteriormente se adicionó una mezcla de RT [2 µL Buffer 5X de M-MLV (marca: PROMEGA), 1 µL de DTT 10mM (DL-Dithiothreitol-Marca: PROMEGA), 0.5 µL de dNTP's Mix (solución pre mezclada de sales de sodio de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, PROMEGA) y 0.25 µL de M-MLV Reverse Transcriptase

(PROMEGA)] y la reacción se inició en el termociclador a 42°C por 60 min y finalizó a 72°C por 10 min.

PCR

Para la amplificación del DNAC se preparó una mezcla de 2 µl de buffer de reacción (5X Green Go Taq®), 0.4 µl de MgCl₂ (25mM), 0.2 µl de DNTP's (10mM), 0.6 µl de cada iniciador (10 µM), 5.1 µl de H₂O, 0.1 µl de GoTaq® DNA Polymerase (5U/µl) y 2 µl de DNA.

La PCR se realizó en un termociclador Techne® con las siguientes condiciones: Para la detección de CTV consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C/1 min, 35 ciclos con una desnaturalización de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 1 min, y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min.

Para CLas se realizó una desnaturalización inicial de 94°C/3 min, 35 ciclos de 94°C/30 s, 60°C/45 s, 72°C/45 s y una extensión final a 72°C/10 min.

En CEVd las condiciones fueron 94°C por 5 min de desnaturalización inicial, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, y 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min.

Para HSVd se dio una desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 30 s, 50°C por 30 s, 72° por 30 s y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio a 90 volts por 60 minutos, en todos los casos se incluyó un testigo positivo y agua como control negativo. Los amplicones fueron secuenciados y las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa DNA baser y comparados en la base de datos del GenBank. Las secuencias con identidad del 95-100 % fueron subidas a la base de datos del bankit.

Evaluación de la incidencia de síntomas asociados a Tristeza

En la comunidad de la Concepción, comunidad de Tihuatlán Veracruz se evaluó la incidencia de plantas muertas, sintomáticas y asintomáticas en un huerto de naranjo Valencia, mandarina Fairchild y Tuxpeña injertados sobre naranjo agrio. Se realizaron dos evaluaciones, la primera el mes de marzo y la segunda en agosto. En total se evaluaron 792 árboles de naranjo Valencia, 298 árboles de mandarina Tuxpeña y 381 de mandarina Fairchild.

Análisis de datos

Se determinó el número de plantas infectadas por *Citrus tristeza virus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus exocortis viroid* – citrus y *Hop stunt viroid* - citrus por municipio y especie. En la huerta de la Concepción se determinó el porcentaje de plantas muertas, con síntomas y asintomáticas asociadas a tristeza de los cítricos durante los meses de marzo y agosto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las primeras epidemias en cítricos se presentaron desde 1836, con la pudrición de raíz provocada por *Phytophthora spp.* Esta fue la primera enfermedad causante de la muerte de plantas en distintas partes del mundo, comenzando en la isla Azores y propagándose a los países del Mediterráneo (Roistacher, 1981). Esto condujo a la introducción de naranjo agrio como portainjerto, que se adaptó a cualquier tipo de suelo y produjo buena calidad de fruta, siendo utilizado en todas las regiones productoras de cítricos (Atta *et al.*, 2012), posteriormente esto ocasionó epidemias por CTV en diversas áreas cítricas del mundo (Roistacher, 1981).

Esta problemática provocó la adopción de estrategias para el manejo de la enfermedad, como el cambio de portainjertos susceptibles a tolerantes a CTV (Rocha Peña y Padrón-Chávez, 1992). Sin embargo, algunos portainjertos tolerantes como naranjo trifoliado *Poncirus trifoliata* y sus híbridos, los citranjes troyer y carrizo (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*) presentaron la desventaja de ser susceptibles a los viroides CEVd - cit y HpSVd - cit (Roistacher, 1995). En México, se estableció programa de certificación con la implementación de la NOM- 079-FITO-2002 con la finalidad de sustituir plantas enfermas por sanas y evitar la diseminación de enfermedades mediante el movimiento de material vegetativo infectado. Además de promover el uso de portainjertos tolerantes para prevenir epidemias por CTV.

Los resultados de la presente investigación demuestran que HpSVd-cit fue la enfermedad con mayor porcentaje de plantas positivas (87 %), seguido de CTV (67.96 %) y exocortis (CEVd – cit) (21.5 %) presentes en Álamo, Castillo, Cazonas, Tihuatlán,

Tuxpan y Papantla. Mientras que CLas fue el patógeno con menor incidencia (9.8 %), presente en Álamo, Cazones, Tihuatlán y Tuxpan (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje (%) de plantas positivas a *Citrus tristeza virus* (CTV), *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Hop stunt viroid* – citrus (HpSVd - cit), *Citrus exocortis viroid* - citrus por municipio (CEVd - cit).

PATÓGENOS				
MUNICIPIO	CTV	CLas	CEVd - cit	HpSVd - cit
Álamo ¹	100	20	53.3	93.3
Castillo ²	94.4	0	11.1	100
Cazones ³	80.9	23.8	23.8	100
Tihuatlán ⁴	39	5.5	22.2	88.8
Tuxpan ⁵	15	5	5	50
Papantla ⁶	100	0	20	90

Número de muestras por municipio: 15¹, 18², 20³, 18⁴, 20⁵, 10⁶

Citrus tristeza virus

De las 102 muestras analizadas, 67.96 % amplificaron el fragmento de 273 pb (Figura 2) y sus secuencias tuvieron similitud de 97- 99 % con *Citrus tristeza virus*. (números de acceso: MH894634, MH894635, MH894636, MH894637, MH894638, MH894639, MH894640, MH894641, MH894642, MH894643, MH894644, MH894645, MH894646, MH894647, MH894648, MH894649, MH894650, MH909596, MH909597 y MH909598).

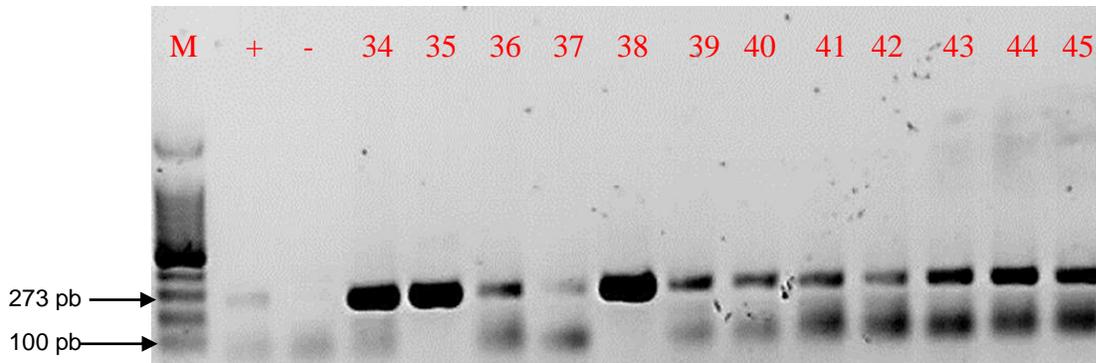


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR obtenidos con iniciadores CPK-R Y CPK-F que amplifican un fragmento de 273 pb de la Cp. Carril 1: Marcador de 100 pb Carril 2: Control positivo (Planta positiva a CTV); Carril 2: Control negativo (Agua); Carril 4-12: Muestras de la 34-45.

Álamo y Papantla tuvieron 100 % de plantas positivas a CTV, Castillo con 94.4 %, Cazones con 81 %, Tihuatlán con 39 % y Tuxpan con 15 % (Figura 3).

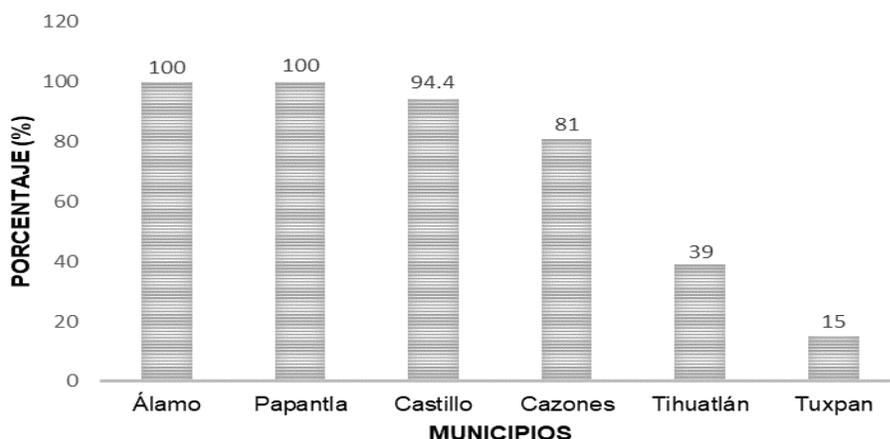


Figura 3. Porcentaje de plantas positivas a CTV en los municipios de estudio. Número de plantas muestreadas por municipio: Álamo (15), Papantla (10), Castillo (18), Cazones (21), Tihuatlán (18) y Tuxpan (20).

Las diferencias en las incidencias en los municipios muestreados puede deberse a diversos factores que influyen en la tasa de transmisión del CTV en un área como:

especies de áfidos (Cambra *et al.*, 2000), condiciones ambientales que favorecen su reproducción (Bar-Joseph y Loebenstein, 1973), transmisibilidad de los aislamientos predominantes (Bar-Joseph *et al.*, 1989;), utilización del material vegetativo no certificado y el manejo de las huertas principalmente podas con herramientas infectadas (Roistacher, 2004).

La presencia de CTV en los municipios muestreados puede deberse a la utilización de material infectado, de acuerdo a los productores la mayoría fue adquirido en viveros no certificados. Con relación a lo anterior, Lee (2015) menciona que los programas de certificación son importantes para prevenir la introducción de aislados severos y diseminación de CTV u otros patógenos asociados a cítricos. Los vectores también pudieron influir en la diseminación a cortas distancias (Roistacher 2004). *T. citricida* es el vector más eficiente de CTV y se reportó por primera vez en México en el año 2000 en árboles de naranjo en Lázaro Cárdenas Quintana Roo y actualmente se encuentra en 18 estados citrícolas (SENASICA, 2014), con riesgo de provocar epidemias severas. En España, tristeza de los cítricos se incrementó de 11 a 53 % de 1989-1998 debido a la presencia de *Aphis gossypii* (Cambra *et al.*, 2000). Halbert (2004) menciona que en Brasil la presencia de *T. citricida* ocasionó la diseminación de aislamientos severos.

Tristeza de los cítricos se encontró ampliamente distribuida en los municipios de Álamo, Castillo, Cazones y Papantla con porcentajes del 81 % al 100 % comparado con Tuxpan con 18.2 %, esta amplia variación en la infección podría ser atribuida a la prevalencia de naranjo en las zonas productoras de estos municipios contrario a Tuxpan donde predomina mandarina. Diversos estudios han demostrado que las especies predominantes en una zona citrícola pueden influir en la diseminación de la

enfermedad, Abubaker *et al.*, (2017) en Sudan encontró mayor distribución en los estados del norte de este país con 45 % al 75 % de incidencia mientras en los del sur encontró 10 % al 30 % y lo atribuyó a que en los estados del norte predominaba naranjo mientras en los estados del sur es pomelo.

En Papantla los huertos muestreados estaban bajo manejo orgánico, este factor también puede influir en los resultados obtenidos, sin embargo, no existen estudios que demuestren mayor incidencia de este patógeno o del vector en huertas bajo manejo orgánico, en comparación al convencional.

Todas las especies analizadas estuvieron infectadas por CTV, pomelo fue la de mayor promedio de plantas infectadas por municipio con 100 %, seguido de lima persa 83.3 % naranjo 71.4 % y mandarina fue la menor con 68.6 % (Cuadro 5).

La sintomatología observada varió en cada especie y municipio en que se muestreó, en naranjo y mandarina en municipios de Cazonas y Tihuatlán se observó decaimiento en plantas de naranja y mandarina injertadas sobre naranjo agrio, también se visualizaron síntomas de hoja pequeña y floración excesiva pudiendo estar ocasionados por la presencia de aislados severos de CTV, mientras que en el resto de los municipios únicamente se observó amarillamiento generalizado observándose con mayor severidad en naranjo mientras que más atenuadas en mandarina y pomelo. Moreno *et al.* (2008) menciona que los árboles afectados por aislados severos en naranjo y mandarina muestran síntomas de decaimiento que incluyen el amarillamiento y desprendimiento del follaje, muerte de ramas, reducción progresiva del sistema radical, la disminución del tamaño y decoloración de las frutas, provocando la muerte de la planta.

Cuadro 5. Porcentaje (%) especies de cítricos positivas a *Citrus tristeza virus* por municipio.

MUNICIPIO	ESPECIE			
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. latifolia</i>	<i>C. paradisi</i>
Álamo ¹	100	100	100	100
Castillo ²	94.1	100	-	-
Cazones ³	80	100	66.6	100
Tehuacán ⁴	36.3	33.3	-	100
Tuxpan ⁵	20	10	-	-
Papantla ⁶	100	-	-	100
Promedio	71.4	68.6	83.3	100

(-) Especies no muestreadas.

Número de plantas muestreadas: *C. sinensis* = 66, *C. reticulata* = 22, *C. latifolia* = 7 y *C. paradisi* = 7.

Número de plantas muestreadas en cada municipio: *C. sinensis*: 10¹, 17², 10³, 11⁴, 10⁵ y 8⁶. *C. reticulata*: 3¹, 1², 2³, 6⁴ y 10⁵. *C. latifolia*: 1¹ y 6³. *C. paradisi*: 1¹, 3³, 1⁴ y 2⁶.

En el continente americano las epidemias causadas por CTV están bien documentadas, los primeros reportes se dieron en Argentina en 1930 y Brasil en 1937, causando la muerte de plantas de naranjo y mandarina injertadas sobre naranjo agrio (Roistacher, 2004). Posteriormente ocurrieron en Ghana en 1938, California en 1939, Florida en 1951, España en 1957, Israel en 1970, y Venezuela en 1980, otros brotes también se han reportado en otros huertos de cítricos, como en Chipre en 1989, Cuba en 1992, República Dominicana en 1996 e Italia en 2002 (Gottwald *et al.*, 2002) y éstas han estado estrechamente relacionadas a la utilización de naranjo agrio como portainjerto.

Para prevenir posibles epidemias por CTV es necesario la implementación por parte del gobierno local y federal campañas de información y concientización para evitar la utilización de naranjo agrio como portainjerto e incentivar a los productores la compra de plantas certificadas. Además que posterior a la compra de material sano es indispensable tener un buen manejo agronómico para disminuir la transmisión por vectores o herramientas de poda contaminadas. De acuerdo a Costa y Müller (1980) la utilización de materiales certificados de cítricos injertadas sobre portainjerto tolerante es el mejor método de control, sin embargo, ante la presencia de aislados severos es necesario la protección cruzada basada en la previa inoculación de un aislado tenue.

Candidatus Liberibacter asiaticus

De las 102 muestras analizadas de los 6 municipios, 9.8 % amplificaron el fragmento esperado de 1163 pb (Figura 3). Sus secuencias tuvieron un porcentaje de similitud de 97-99 % con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (números de acceso: MK031933, MK031934, MK031935, MK031936, MK031937, MK031938, MK031939, MK031940, MK031941 y MK031942).

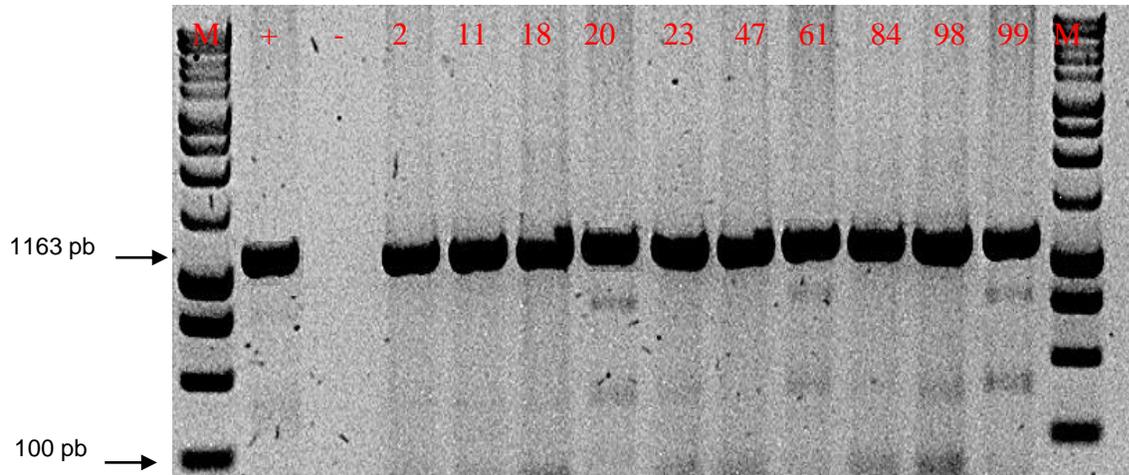


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR obtenidos con iniciadores OI-1 y OI-2C que amplifican un fragmento de 1163 pb de la 16s rDNA. Carril 1 y 18: Marcador 1Kb, Carril 2: Control positivo (Planta infectada con CLas), Carril 3: Control negativo (Agua); Carril 4-10: Muestras: 2, 11, 18, 20, 23, 47, 61, 84, 98 y 99.

En el municipio de Cazones se obtuvo 22.7 % de plantas positivas a CLas, seguido de Álamo 20 %, Tihuatlán 5.5 % y Tuxpan con 4.5 %. En los municipios de Castillo y Papantla no se encontraron plantas positivas por este patógeno (Figura 5).

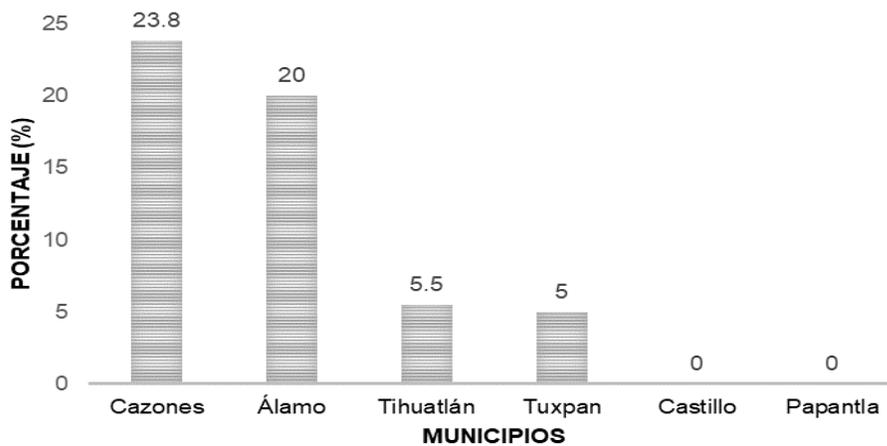


Figura 5. Porcentaje de plantas positivas a CLas en los municipios de estudio. Número de plantas muestreadas por municipio: Álamo (15), Papantla (10), Castillo (18), Cazones (21), Tihuatlán (18) y Tuxpan (20).

La baja incidencia de plantas positivas en los municipios muestreados puede deberse a que durante el muestreo no se observaron los síntomas de amarillamiento de la parte apical de los brotes en las especies muestreadas y maduración invertida de frutos en variedades de naranja, asociados a Huanglongbing (Timmer *et al.*, 2000). También puede estar relacionado a los factores ambientales, de acuerdo a Lopes *et al.*, (2017) existen evidencias del impacto de la temperatura en la proliferación de la bacteria en plantas infectadas. El rango óptimo de temperaturas para la proliferación de CLas en la planta es de 17-27°C, por lo cual la época de muestro es recomendable en los meses más fríos. Cabe indicar que los síntomas clásicos descritos en la literatura se refieren a plantas donde no están presentes otros patógenos, y en el caso de Veracruz, las plantas analizadas tienen, psorosis, exocortis y cachexia, por lo que sería importante realizar investigaciones para definir la sintomatología en las condiciones de estudio.

Las especies infectadas por CLas fueron naranjo, lima persa y pomelo con un porcentaje promedio de 11.51 %, 16.6 % y 33.3 % respectivamente. En caso de mandarina no se encontraron plantas positivas a este patógeno (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje (%) de especies de cítricos positivas a *Candidatus Liberibacter asiaticus* por municipio.

MUNICIPIO	ESPECIE			
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. latifolia</i>	<i>C. paradisi</i>
Álamo ¹	20	0	0	100
Castillo ²	0	0	-	-
Cazones ³	30	0	33.3	0
Tihuatlán ⁴	9.1	0	-	0
Tuxpan ⁵	10	0	-	-
Papantla ⁶	0	-	-	-
Promedio	11.5	0	16.6	33.3

(-) Especies no muestreadas.

Número de plantas muestreadas: *C. sinensis* = 66, *C. reticulata* = 22, *C. latifolia* = 7 y *C. paradisi* = 7.

Número de plantas muestreadas en cada municipio: *C. sinensis*: 10¹, 17², 10³, 11⁴, 10⁵ y 8⁶. *C. reticulata*: 3¹, 1², 2³, 6⁴ y 10⁵. *C. latifolia*: 1¹ y 6³. *C. paradisi*: 1¹, 3³, 1⁴ y 2⁶.

De acuerdo a Knap *et al.*, (2004) el huanglongbing de los cítricos afecta a todas las especies cítricas, siendo más susceptibles naranjo y mandarina, mientras que pomelo es tolerante. Sin embargo, en México los efectos por CLAs no ha sido como en otros países, debido a que no se ha reportado muerte de plantas desde el primer reporte de este patógeno en México en 2009 a diferencia de otros países como Indonesia que diez años después de haberse detectado ya había provocado la muerte de tres millones de árboles (Tirtawidjaja, 1980). Asimismo, en México no existen estudios que demuestren el comportamiento de naranjo, mandarina y pomelo infectados a CLAs. La incidencia de este patógeno en las especies de cítricos también puede deberse a la preferencia del vector por el hospedante Ahmad *et al.*, (2008) determinó mayor

incidencia de *Diaphorina citri* en árboles de pomelo en comparación a las de mandarina, citranje Troyer, cleopatra y citrumelo Swingle.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, CTV presenta mayor distribución que CLas. Sin embargo, las campañas fitosanitarias de prevención erradicación y control van enfocadas únicamente a la enfermedad del Huanglongbing de los cítricos y por la que se ha establecido la NOM-EM-FITO-2009 asignando recursos por 5,894,006 millones de pesos en el 2015 (SENASICA, 2015). Sin embargo, desde el primer reporte de la presencia del HLB en México, no se ha tenido reportes sobre la muerte de plantas por esta enfermedad. Siendo necesario reenfocar los recursos económicos para la prevención de posibles epidemias de tristeza de los cítricos en la zona norte de Veracruz, debido a la presencia de esta enfermedad y utilización de naranjo agrio como portainjerto.

Citrus exocortis viroid

De las 102 muestras analizadas, 21.5 % amplificaron el fragmento esperado de 371 pb (Figura 4) y sus secuencias tuvieron una similitud del 99 % de identidad con *Citrus exocortis viroid* (número de acceso: MK182521).

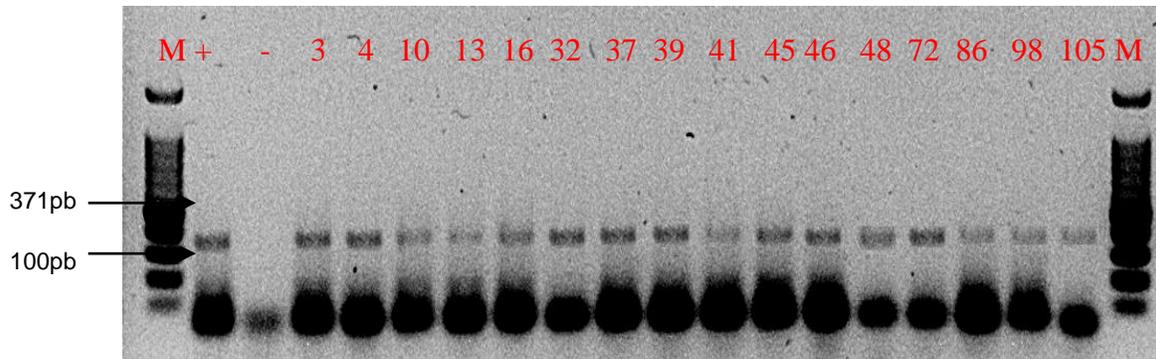


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR obtenidos con iniciadores CEVd -1y CEVd-2 que amplifican un fragmento de 371 pb del genoma. Carril: Marcador de 100pb, Carril 2: Control positivo (Planta positiva a CVd-II); Carril 3: Control negativo (Agua); Carril 4-19: Muestras: 3, 4, 10, 13, 16, 32, 37, 39, 41, 45, 46, 48, 72, 86, 98 y 105.

El municipio de Álamo presentó la mayor incidencia con 53.3 % de plantas positivas a CEVd - cit, seguido de Cazones con 23.8 %, Tihuatlán 22.2 %, Papantla 20 %, Castillo 11.1 % y Tuxpan 5 %. (Figura 7).

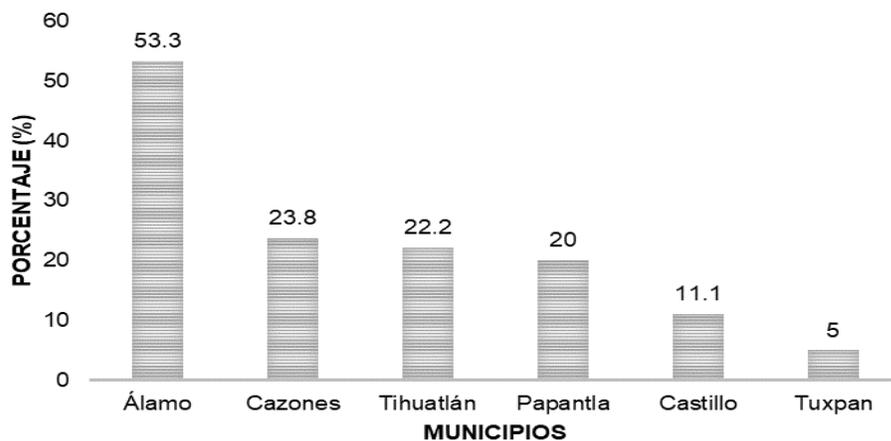


Figura 7. Porcentaje de plantas positivas a CEVd en los municipios de estudio. Número de plantas muestreadas por municipio: Álamo (15), Papantla (10), Castillo (18), Cazones (21), Tihuatlán (18) y Tuxpan (20).

La presencia de este viroide en los municipios de Álamo, Cazones, Tihuatlán, Papantla, Castillo y Tuxpan podría deberse a la utilización de plantas no certificadas y su transmisión de una planta a otra por herramientas contaminadas que de acuerdo a Barbosa (2005) la eficiencia en la transmisión de este patógeno puede variar del 4 al 21 %.

La edad de la planta también pudo influir en los resultados, en Álamo, la edad osciló de los 9 a 40 años, por el mayor tiempo de exposición a ser infectadas por este patógeno en comparación a las plantaciones muestreadas de Tuxpan que oscilaron de los 5 a 10 años. La presencia de este patógeno en todos los municipios muestreados demuestra que las medidas preventivas como la utilización de material propagativo sano no ha sido eficaz. Por ello es importante el saneamiento de huertas con material vegetativo producidas bajo la NOM-079-FITO-2002 para reducir su diseminación y el establecimiento de plantas infectadas en edades tempranas, además de capacitar a los productores en actividades que ayuden a mitigar la propagación por herramienta contaminada. Los síntomas de descortezamiento y agrietamiento en plantas muestreadas se observaron por encima de la zona de unión del portainjerto debido a la tolerancia de naranjo agrio, sin embargo, es posible que al sustituir este portainjerto por portainjertos como Citranje Carrizo y Troyer tolerantes a CTV el impacto del daño se incremente por ser materiales susceptibles a CEVd - cit y HpSVd – cit.

De las especies muestreadas el mayor porcentaje promedio se obtuvo en pomelo con 50 %, seguido de mandarina 31.8 %, lima persa 16.6 % y naranja 16.4 % (Cuadro 7) especies reportados como susceptibles a este viroide (Almeyda *et al.*, 2007).

Cuadro 7. Porcentaje (%) de especies de cítricos positivas a *Citrus exocortis viroid* – citrus por municipio.

Municipio	ESPECIE			
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. latifolia</i>	<i>C. paradisi</i>
Álamo	50	66.6	0	100
Castillo	5.8	100	-	-
Cazones	20	50	33.3	0
Tihuatlán	9	33.3	-	100
Tuxpan	0	10	-	-
Papantla	25	-	-	0
Promedio	16.4	31.8	16.6	50

(-) Especies no muestreadas.

Número de plantas muestreadas: *C. sinensis* = 66, *C. reticulata* = 22, *C. latifolia* = 7 y *C. paradisi* = 7.

Número de plantas muestreadas en cada municipio: *C. sinensis*: 10¹, 17², 10³, 11⁴, 10⁵ y 8⁶. *C. reticulata*: 3¹, 1², 2³, 6⁴ y 10⁵. *C. latifolia*: 1¹ y 6³. *C. paradisi*: 1¹, 3³, 1⁴ y 2⁶.

Los daños observados en los árboles muestreados no pueden ser atribuidos únicamente a CEVd - cit debido a la presencia HSVd - cit y *Citrus psorosis virus* en plantaciones citrícolas de México. Se han reportado que frutos de pomelo “Marsh”, obtenidos de plantas infectadas con CEVd tienen bajo contenido de jugo y peso de fruto (Sánchez *et al.*, 2007). También se ha observado reducción del crecimiento en naranjo var. Maltese injertada sobre mandarina Cleopatra, citrumelo Swingle y naranjo agrio infectados con CEVd - cit. Murcia (2005) al inocular CEVd - cit en naranjo Washington Navel injertado sobre citrange Carrizo, no observó síntomas de descortezamiento, solo daño en las raíces. Almeyda *et al.*, (2007) mencionan que en naranjo y mandarina la infección por CEVd puede reducir el rendimiento hasta en 50 %,

además de causar reducción del vigor, agrietamiento de corteza y muerte de los árboles.

En el presente estudio CEVd – cit tuvo menor incidencia (4.7 al 53.3 %) respecto HpSVd - cit. En México se ha reportado al CEVd - cit en árboles de cítricos con incidencias del 50 % de árboles cítricos afectados en Veracruz, Nuevo León, Sinaloa, Tabasco y Yucatán (Alvarado, 1998; Uc-Vázquez *et al.*, 2005). La presencia de este patógeno se debe principalmente a la utilización de material propagativo infectado y herramientas contaminadas (Alvarado, 2005), por lo que se sugiere promover el uso de material propagativo certificado y desinfección de herramientas.

Hop stunt viroid

De las 102 muestras analizadas, 87 % amplificaron el fragmento esperado de 300 pb (Figura 8), y sus secuencias tuvieron 95 98% de similitud con *Hop stunt viroid* (número de acceso: MK182520).

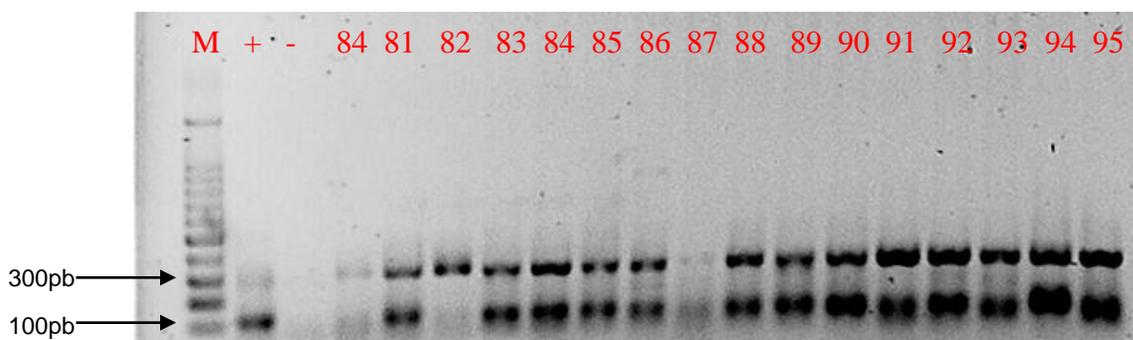


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR obtenidos con iniciadores CVd-II-H y CVd-II-C que amplifican un fragmento de 300 pb del genoma. Carril: Marcador de 100pb, Carril 2: Control positivo (Planta positiva a CVd-II); Carril 3: Control negativo (Agua libre de nucleasas); Carril 4-19: Muestras de la 84-95.

Los municipios de Castillo y Cazonos fueron los municipios con mayor incidencia de plantas positivas con 100 %, seguido de Álamo 93.3 %, Papantla 90 %, Tihuatlán 88.8 % y Tuxpan 50 % (Figura 9).

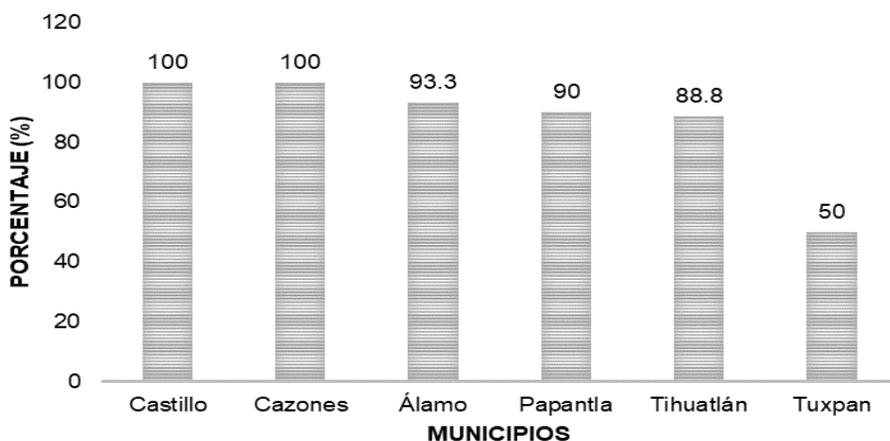


Figura 9. Porcentaje de plantas positivas a HpSVd-cit por municipio.

Número de plantas muestreadas por municipio: Álamo (15), Papantla (10), Castillo (18), Cazonos (21), Tihuatlán (18) y Tuxpan (20).

La amplia distribución del viroide puede deberse a la utilización de plantas infectadas y herramientas contaminadas, ya que a la fecha no se conoce un vector para este viroide. Se sabe que HSVd - cit puede transmitirse fácilmente de manera mecánica (Roistacher, 1983) y que su eficiencia de transmisión en campo depende de gran medida del hospedante (Barbosa *et al.*, 2005). La transmisión de viroides en plantaciones cítricas se ha demostrado con diferentes eficiencias de transmisión en función del huésped (Barbosa *et al.*, 2002).

Lima persa fue la especie con mayor incidencia de plantas muestreadas con 100 %, seguido de naranjo 95.1 %, mandarina 77.3 % y pomelo con 62.5 % (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje (%) especies de cítricos positivas a *Hop stunt viroide* – citrus por municipio.

MUNICIPIO	ESPECIE			
	<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. latifolia</i>	<i>C. paradisi</i>
Álamo	100	66.6	100	100
Castillo	100	100	-	-
Cazones	100	100	100	100
Tihuatlán	90.9	100	-	0
Tuxpan	80	20	-	-
Papantla	100	-	-	50
Promedio	95.1	77.3	100	62.5

(-) Especies no muestreadas.

Número de plantas muestreadas: *C. sinensis* = 66, *C. reticulata* = 22, *C. latifolia* = 7 y *C. paradisi* = 7.

Número de plantas muestreadas en cada municipio: *C. sinensis*: 10¹, 17², 10³, 11⁴, 10⁵ y 8⁶. *C. reticulata*: 3¹, 1², 2³, 6⁴ y 10⁵. *C. latifolia*: 1¹ y 6³. *C. paradisi*: 1¹, 3³, 1⁴ y 2⁶.

De acuerdo a Müller *et al.*, (2005) las especies más susceptibles son: lima persa y lima rangpur (*Citrus limonia*) sin embargo todas las especies pueden ser infectadas por este patógeno.

En el presente estudio se tuvo una alta incidencia de infección en todas las especies muestreadas. De acuerdo a Guerrero *et al.*, (2013) mencionan que cachexia se encuentra en forma endémica en la mayoría de las plantaciones de lima persa y en forma asintomática en cítricos dulces del país. Robles-Serna *et al.*, (1985) y Rocha-

Peña (1995) reportaron que la cachexia de los cítricos se encuentra ampliamente distribuida en plantaciones de naranjo y mandarina en Tamaulipas y Nuevo León respectivamente, Alvarado-Gómez (2000) menciona que esta enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de las plantaciones de cítricos de México.

Actualmente los daños por HpSVd - cit han sido ignorados por la mayoría de los productores, además de que los síntomas típicos como agrietamiento del tronco y descortezamiento son atribuidos a *Phytophthora spp.* por este diagnóstico erróneo se ha dado un mal manejo de la enfermedad. Es por ello que es necesario implementar campañas informativas sobre los daños provocados por este viroide y la importancia de la utilización de plantas certificadas para el control preventivo de la enfermedad, de acuerdo a la NAPPO (2013) la utilización de plantas sanas es el único medio de control y manejo para este patógeno.

Presencia de una, dos, tres y cuatro patógenos por planta

El 87.2 % de las plantas muestreadas fueron positivas al menos a un patógeno, mientras que el 12.8 % no amplificó a ninguno de estos. De las muestras positivas 59.5 % amplificó a dos patógenos, 19.1 % a uno, 17.9 % a tres y 3.3 % a cuatro.

La combinación CTV+HpSVd-cit fue la de mayor frecuencia (49.4 %), seguido de HpSVd-cit (11.2 %), CTV+HpSVd+CEVd (8.9 %), CTV (7.8 %), HpSVd+CEVd (4.4 %), CTV+CLas+HpSVd (4.4 %), CLas+HpSVd (2.2 %), CLas+HpSVd+CEVd (2.2 %), CTV+CEVd (1.1 %) y CLas+CEVd (1.1 %).

La infección simultánea en las especies muestreadas, sugiere que los síntomas observados no pueden ser relacionados a un solo patógeno, debido a que puede haber interacción entre ellos. Chia-Hsin *et al.*, 2008 reportó en Taiwan que el 30 % de plantas con síntomas asociados a CLas fueron positivas únicamente a este patógeno, mientras que el 70 % fue causado por la infección por más de un patógeno.

Debido a esto se recomienda evaluar la interacción de estos patógenos en cada una de las especies de cítricos debido a que en la actualidad es común asociar síntomas a un solo patógeno, los cuales han sido caracterizados en países que no presentan las mismas condiciones fitosanitarias y climatológicas que México.

Incidencia de síntomas asociados a tristeza en una huerta de cítricos en la Concepción, Tihuatlán Ver.

En las evaluaciones realizadas en marzo y agosto se encontró mayor porcentaje de plantas muertas en naranjo (13.7 % y 20.3 %), mientras que en mandarina “Tuxpeña” se determinó 7 % y 8.4 % y para Fairchild no se presentaron plantas muertas (Cuadro 9). Los resultados obtenidos podrían deberse a la susceptibilidad al CTV de naranjo valencia en comparación con mandarina Fairchild y Tuxpeña, de acuerdo a Cambra *et al.*, (2000) la severidad de CTV está influenciada por la especie, mientras que Moreno *et al.*, (2008) mencionan que naranjo (*C. sinensis*) es la especie más susceptible a razas severas, sin embargo, también puede estar influenciada por la presencia de otros patógenos (CLas, CEVd-cit y HpSVd-cit).

Naranjo Valencia presentó mayor porcentaje de plantas asintomáticas con 21.4 % en marzo, y 46 % para agosto. Sin embargo, para mandarina Fairchild el porcentaje

disminuyó durante el periodo de evaluación de 42.9 % al 20.1 %. Un comportamiento similar se observó en mandarina Tuxpeña 54.5 % a 3.6 %.

Por lo consiguiente en naranjo Valencia el porcentaje de plantas asintomáticas disminuyó a 33.9 %, mientras que para mandarina Tuxpeña y Fairchild el porcentaje de plantas asintomáticas aumentaron a 73.4 % y 87.9 % respectivamente (Cuadro 9). El aumento de plantas asintomáticas puede ser debido a la estacionalidad de los síntomas, de acuerdo a Moreno *et al.*, (2008) mencionan que los síntomas de CTV en el hospedero son muy variables y se ven afectadas por las condiciones ambientales, las especies hospederas y la agresividad de la cepa. Los mismos autores mencionan que mandarina es tolerante a la enfermedad, mientras naranjo no presenta síntomas a sepas atenuantes mientras que en cepas severas presentan declinamiento y amarillamiento de plantas.

Cuadro 9. Porcentaje (%) de plantas muertas, sintomáticas y asintomáticas en huerta de naranjo, mandarina Fairchild y Tuxpeña en la Concha, Veracruz.

Especies	Meses					
	Marzo			Agosto		
	Muertas	Con síntomas	Asintomáticas	Muertas	Con síntomas	Asintomáticas
Naranjo	13.7	21.4	64.7	20.3	46	33.5
Valencia						
Mandarina	0	42.9	56.7	0	20.1	73.4
Fairchild						
Mandarina	7	54.5	38.3	8.4	3.6	87.9
Tuxpeña						

De acuerdo con Roistacher (2004) todas las variedades de cítricos son afectadas por tristeza de los cítricos, sin embargo las variedades de naranjo son las más propensas a la presencia de declinamiento repentino al ser injertados sobre naranjo agrio, mientras que pomelos son susceptibles a aislados causantes de picadura en el tallo y las variedades de mandarina son tolerantes a la mayoría de aislamientos de CTV. En el presente estudio se determinó la presencia de CTV, CLas, HpSVd - cit y CEVd - cit en la huerta evaluada, sin embargo, es importante mencionar que otros patógenos pueden estar interactuando en el declinamiento de árboles y en la sintomatología observada. De acuerdo a la literatura es difícil asociar los síntomas de amarillamiento solo a CTV o a CLas, debido a que pueden estar relacionados con deficiencias de zinc, u otros problemas nutrimentales (Timmer *et al.*, 2003) o a daños por *Phytophthora spp.* (Da Graca, 2004).

CONCLUSIONES

Hop stunt viroid – citrus fue el patógeno con mayor incidencia y distribución en los municipios muestreados.

Citrus tristeza virus se encontró ampliamente distribuido en los municipios de Álamo, Papantla, Castillo y Cazones.

Candidatus Liberibacter asiaticus fue el patógeno con menor incidencia, presente en Tuxpan, Tihuatlán, Álamo y Cazones.

Las especies muestreadas están infectadas por más de un patógeno, debido a ellos los síntomas observados en campo no pueden ser asociados a una sola enfermedad.

En la Concepción, Tihuatlán, Ver., las plantas de naranjo dulce, en el periodo marzo – agosto, murieron 23 %, mientras que en mandarina Fairchild no presentó plantas muertas.

LITERATURA CONSULTADA

- Agranovsky, A. A. 1996. Principles of molecular organization, expression, and evolution of closteroviruses: over the barriers. *Adv. Virus. Res.* 47:119–58. doi:10.1016/s0065-3527(08)60735-6.
- Khairulmazmi, A., Kamaruzaman, S., Habibuddin, H., Jugah, K. and Syed, O. S. R. 2008. Occurrence and Spread of Candidatus Liberibacter Asiaticus, the Causal Agent of Huanglongbing Disease of Citrus in Malaysia. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences.* 4(1): 103-111.
- Almeyda-León, I., Rocha, M., Iracheta, M., Orona, F. y Kahlke, C. 2007. Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia.* 41 (1): 87-93.
- Almeyda-León, I., Iracheta-Cárdenas, H., M. M., Argumedo, J. J., Curti-Díaz, S. A., Ruíz-Beltrán, P. and M. A. Rocha-Peña. 2002. Reexamination of citrus viroids of Tahiti lime in Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 152-160.
- Alvarado-Gómez, O. G., Rocha-Peña, M. A., Silva-Vara, S., Martínez-Soriano, J. P. , Lee, R. F. Rivera-Bustamante, R. and Ruíz Beltrán, P. 2000. Citrus Exocortis and Citrus Cachexia Viroids in Comercial Groves of Tahiti Lime in México. Fourteenth IOCV Conference, Viroids. 289-293p.
- Atta, S., Chang-yong, Z., Yan, Z., Meng-ji, C. and Xue-feng, W. 2012. Distribution and Research Advances of *Citrus tristeza virus*. *Journal of Integrative Agriculture* 11(3): 346-358. doi: 10.1016/S2095-3119(12)60019-7.
- Bar-Joseph, M. and Loebenstein, G. 1973. Effects of strain, source plant, and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phy.* 63:716–20. doi: 10.1094/Phyto-63-716.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88, 7–37.
- Cambra, M., Gorris, M. T., Marroquín, C., Román, M. P., Olmos, A., Martínez, P. C., Hermoso de Mendoza, A. H., López, A. and Navarro, L. 2000. Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Res.* 71, 85–95.

- Da Graça J. V. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1991. 29:109-36. doi: annurev.py.29.090191.000545
- Da Graca, J. V. y Korsten, L. 2004. *Citrus huanglongbing*: Review, present status and future strategies. pp 229-245. *In*: Naqvi, S. A. M. H. Compiladores. *Diseases of Fruits and Vegetables*, Vol. 1. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Dawson, W.O., Bar- Joseph, M. Garnsey, S. M. y Moreno, P. 2015. *Citrus Tristeza Virus*: Making an ally from enemy. *Annu. Rev. Phy.*53:137-155. doi: 10.1146/annurev-phyto-080614-120012.
- Dewdney, M. M., and Graham, J. H. 2012. Florida citrus pest management guide: citrus canker. University of Florida. IFAS Extension. Pág.4.
- Duran-Vila, N. y Moreno, P. 2000. Enfermedades de los cítricos. Ed. Mundi- Prensa. 165p.
- Duran-Vila, N., Semancik, J. S.,. 2003. Citrus viroids. En: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., Semancik, J. S. Compiladores. *Viroids*, pp. 178-194.
- FAO.2013. Citrus: Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i3319s.pdf> (Consultado el 25 de Octubre del 2018)
- FAO. 2016. <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S>. Consultado en línea, consultado el 9 de Mayo de 2018.
- Fraser, L. R. y Broadbent, P. 1979. Tristeza. Pag 78 *In*: Fraser, L.R. y Broadbent, P. compiladores. *Virus and related diseases of citrus in New South Wales*. New South Wales, Sydney. 78p.
- FUNDECITRUS. 2009. Clorose variegada dos citros. Fondo de Defensa da Citricultura. San Paulo Br. 12 p.
- Garnsey, S. M., Gonsalves D., Purcifull, D. E. 1977. Mechanical transmission of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 67, 965-968.
Doi: 10.1094/Phyto-67-965.
- Gonzales, L. M. 2004. Enfermedad de Pierce (*Xylella fastidiosa*).*In*: Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Los parásitos de la vid: estrategias de protección razonada. Mundi-Prensa. Madrid, Esp. 391 p.

- Gottwald, T. R., Abreu-Rodríguez, E., Yokomi, R. K., Stansly PA, Riley TK. 2002. Effects of chemical control of aphid vectors and of cross-protection on increase and spread of citrus tristeza virus. *Citrus Virol.* 15:117–30.
- Gottwald T, Polek M, Riley K. 2002. History, present, incidence, and spatial distribution of Citrus tristeza virus in the California Central Valley. In: Duran-Vila N, Milne R G, da Graça J V, eds., Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, CA. pp. 83-94.
- Grosser, J. W., Medina-Urrutia, V., Ananthakrishnan, G., Serrano, P. 2004. Building a replacement sour orange rootstock: somatic hybridization of selected Mandarin pummelo combinations. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 129:530-534.
- Gergerich, R.C., Welliver, R. A., Gettys, S., Osterbauer, N. K., Kamenidou, S., Martin, R. R., Golino, D. A., Eastwell, K., Fuchs, M., Vidalakis, G .and Tzanetakis, I. E. 2015. Safeguarding fruit crops in the age of agricultural globalization. *P. Dis.* 99: 176-187. doi: 10.1094/PDIS-07-14-0762-FE.
- Goto, M. 1990. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. Academic Press, INC. 342p.
- Hadidi A., Flores R., Randles J. W. and Semancik J. S. 2003. Viroids. Editorial Science Publisher, Inc. pp 178-194.
- Halbert, S. E. 2004. The discovery of huanglongbing in Florida. Pag. 20. In: Proceedings of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop. Florida Citrus Mutual. Orlando, FL.
- Harper, S. J. 2013. *Citrus tristeza virus*: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Front. Microbiol.* 4:93.
- Hall, D. G. 2008. Biology, history and world status of *Diaphorina citri*. In: 1er Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp.) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), Hermosillo, Sonora, México. 11 pp.
- Hartung, J. S., Halbert S.E., Pelz-Stelinski, K., Brlansky, R. H., Chen, C., Gmitter, F. G. 2010. Lack of evidence for trans-mission of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ through cit-rus seed taken from affected fruit. *P. Dis.* 94: 1200-1205.
- Herrera-Isidrón, L., Ochoa-Sánchez, J. C., Rivera-Bustamante, R., and Martínez-Soriano, J. P. 2009. Sequence diversity on four ORFs *Citrus tristeza*

virus correlates with pathogenecity. *Viol. J.*, 6: 116. doi: 10.1186/1743-422X-6-116.

Hernández, Luis. Martín., Urías, L. M. A., Gómez J. R., J. López, A. I., Velázquez Monreal J. J. y Orozco Santos M. El Huanglongbing y su vector *Diaphorina citri* en limón persa en nayarit: recomendaciones para su manejo. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Pacífico Centro Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Libro Técnico 3. Pp 38.

Hilf, M. E. 2011. Colonization of citrus seed coats by 'Candidatus Liberibacter asiaticus': implications for seed transmission of the bacterium. *Phytopathology*. 101: 1242-1250.

Jagoueix S., Bové, J. M. and Garnier, M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal Systematic Bacteriology*. 44: 379–86.

Jagoueix, S., Bové, J. M. and Garnier, M. 1996. PCR detection of the two 'Candidatus' Liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes* 10: 43– 50.

Jagoueix, S., Bové, J.M. and Garnier, M. 1994. The phloem-limited bacterium of Greening is a member of the alpha subdivision of the proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44: 379-386.

Knapp, J. L., Lee R. H. S, Hoy, M., Clark, R., Kesinger, M. 2004. The Asian citrus psyllid and citrus greening disease. Florida, Agricultural IPM: Fruit (citrus) Florida. IFAS, University of Florida. Disponible en: http://ipm.ifas.ufl.edu/Agricultural_IPM/asian.shtml. (Consultado en Agosto del 2018).

Karasev, A. V., Boyko V. P., Gowda, S., Nikolaeva, O. V., Hilf, M. E. 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology*. 208:511–520. doi: 10.1006/viro.1995.1182.

Lee R.F. 2004. Certification Programs for Citrus. Pp 291-395. In: Naqvi S.A.M.H. (eds) *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I*. Springer, Dordrecht. doi: 10.1007/1-4020-2606-4_6.

- Lin, C. Y., Wu, M. L., Shen, T. L., Yen, H. H. and Hung, T. H. 2015. Multiplex detection, distribution, and genetic diversity of *Hop stunt viroid* and *Citrus exocortis viroid* infecting citrus in Taiwan. *Viol. Jour.* 12:11. doi: 10.1186/s12985-015-0247-y.
- Loeza, K. E., Palacios, T. E. C., Ochoa, M. D. L., Mora, A. G., Gutierrez, E. M. A., Febres, V. J., Moore, G. A. and Álvarez, R. R. 2005. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Veracruz and Tamaulipas States, Mexico. *In*: Hilf, M. E.; Duran, A. N. and Rocha, P. M. Compiladores. Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. California, USA. 407-411p.
- Lopes, S. A., Bertolini, E., Frare, G. F., Martins, E. C., Wulff, N. A., Teixeira, D. C., Fernandes, N. G. and Cambra, M. 2009. Graft transmission efficiencies and multiplication of 'Candidatus *Liberibacter americanus*' and 'Ca. *Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. *Phytopathology.* 99:301-306.
- Lopes, S. A., Luis, Q. B., Oliveira H. T., Frare, G. F., Martins, E. C., Ayres, A., J. 2013. HLB research in Brazil – from etiology to disease management. Proceedings of the 19th Conference IOCV. pp. 47–50
- Lopes, S. A., Luiz, Q. B. Oliveira, H. T., Cifuentes-Arenas, J. C., Raiol-Junior, L. L. 2017. Seasonal Variation of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' Titers in New Shoots of Citrus in Distinct Environments. *Plant disease.* 101: 583-590pp. doi: 10.1094/PDIS-06-16-0859-RE.
- López-Arroyo, J. I., Loera-Gallardo, J., Rocha-Peña M.A., Canales, R., Hernández, I., Reyes, M.A., Berlanga, A. y Miranda, M.A. 2008. Pulgón café de los cítricos, *Toxoptera citricida* (Hemiptera: Aphididae), pp. 279-292. *In*: H. C. Arredondo y L. A. Rodríguez. Compiladores. Casos de control biológico en México. Mundi-Prensa. México, D.F.
- Magomere, T. O., Obukosia, S. D., Mutitu, E., Ngichabe, C., Olubayo, F., Shibairo, S. 2009. Molecular characterization of 'Candidatus *Liberibacter*' species/strains causing huanglongbing disease of citrus in Kenya. *Elec. J. of Bio.* 12(2).
- Manjunath, K.L., Halbert, S.E., Ramadugu, C., Webb, S. and Lee, R. F. 2008. Detection of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its Importance in the

- Management of Citrus Huanglongbing in Florida. *T. Ame. Phy. Soc.* 98(4): 387-396.
- Manjunath, K. L., Ramadugu C, Majil, V. M., Williams, S., Irey, M., Lee, R. F. 2010. First report of the citrus Huanglongbing associated bacterium 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from sweet orange, Mexican lime, and Asian citrus psyllid in Belize. *Plant. Dis.* 94: 781–781.
- Marroquín, C., Olmos, A., Gorris, M.T., Bertolini, E., Martínez, M.C., Carbonell, E.A., Hermoso de Mendoza, A.H. y Cambra, M. 2004. Estimation of the number of aphids carrying Citrus tristeza virus that visit adult citrus trees. *Virus Res.* 100, 101–108.
- McClellan, A. P. D. 1960. Seedling-yellows in South African citrus trees. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 3, 259–279.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J. y Peña, L. 2008. Citrus tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular P. Pathol.* doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X.
- Murcia, N., Bani, H. S. M., and Serra, P. 2015. Citrus Viroids: Symptom Expression and Performance of Washington Navel Sweet Orange Trees Grafted on Carrizo. *Plant Dis.* 99:125-136. doi: 10.1094/PDIS-05-14-0457-RE
- Murray, R. G. E , Stackebrandt, E. 1995. Taxonomic Note: Implementation of the Provisional Status Candidatus for Incompletely Described Prokaryotes. *Int. J. of Syst Bact.* 45: 186-187. doi: 10.1099/00207713-45-1-186
- NAPPO. 2013. Norma regional de medidas fitosanitarias 16. Medidas integradas para la movilización de material propagativo de cítricos. North American Plant Protection Organization. North Carolina, USA. Disponible en línea: http://nappo.org/files/8914/5083/2412/RSPM16_10-09-2013-s.pdf.
- Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Garnsey, S. M. y Lee, R. F. (1998) Serological differentiation of Citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant. Dis.* 82, 1276–1280.

- Nyland, G.A., Goheen, A.C., Lowe, S. K., Kirkpatrick, H. C. 1973. The ultrastructure of a rickettsialike organism from a peach-tree affected with phony disease. *Phytopathology* 63, 1275-1278.
- Oberheim, A. P., Brown, S. E., McLaughlin, W. A. 2011. The identification and distribution of citrus greening disease in Jamaica. Proceedings of the 2nd International Conference on Huanglongbing. Florida Citrus Mutual, Orlando. pp.114.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M. T., Terrada, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research*, 27, 1564-1565.
- Pelz-Stelinski, K. S., Brlansky, H. R., Ebert, T. A., Rogers, M. E. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian citrus psyllid. *J. Econ. Entomol.* 103: 1531-1541
- Rivas-Valencia, Patricia, Loeza-Kuk, Emiliano, Domínguez-Monge, Santiago, y Lomas-Barrié, Claudia Tania. 2017. Chronic infection of the citrus tristeza virus in *Citrus sinensis*, *C. aurantium* trees in a restrictive thermal regime in Yucatán. *Rev. Chap. Serie horticultura*, 23(3), 188-202.
- Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G., Ruiz-García, N., Ochoa-Martínez, D. L., Gutiérrez-Espinosa, M. A., y Febres, V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislados del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Rev. M C Agr.*, 1(4): 493-507.
- Robles, G. M. M., Orozco, S. M.; Manzanilla, R. M. Á. y Velázquez, M. J. J. 2014. El Huanglongbing (HLB). 242-283 pp. In: (Citrus aurantifolia), Orozco-Santos, M.; Robles-González, M. M.; Velázquez-Monreal, J. J. y Manzanilla-Ramírez, M. Á. Compiladores. El limón mexicano. Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México.
- Robles, Serna, R.1985. Presencia de exocortis en los cítricos de Tamaulipas. Memoria del XII Congreso Nacional de Fitopatología. Guanajuato, México. 38 pp.

- Rocha-Peña, M. A., and K. F. Byerly-Murphy 1998. Manejo integrado de la tristeza de los cítricos: Escenario potencial en México. Memorias 1er Simposio Internacional Protección Fitosanitaria. Hermosillo, Sonora, México.
- Rocha-Peña, M. A., Lee, R.F., Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M. y Yokomi, R. K. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease*. 79: 437- 445.
- Roistacher, C. N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome. 286 pp.
- Roistacher, C. N. 2004. Diagnosis and Management of Virus and Virus like Diseases of Citrus. In: Naqvi S. A. M. H. Compiladores. Diseases of Fruits and Vegetables Vol. I. Nagpur, Maharashtra, India. 691p.
- Roistacher, C. N., Nauer, E. M. and Wagner, R. C. 1980. Transmissibility of cachexia, dweet mottle, psorosis, tatterleaf and infectious variegation viruses on knife blades and its prevention. In Proc. 8th Conf IOCV, p. 225-229. Riverside, IOCV.
- Sanchez, E., Rodrigues, S., Donadio, L. C., Ricardo, O, Toller, E. 2007. viroids in Brazil. *Sci.Agri*. 64: 582-588.
- Sandoval, R. J. A., Curti, D. S. A. 2011. Producción de planta de calidad de cítricos. INIFAP. Folleto Técnico N° 59. 42p.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M. A., Albiach-Martí, M.R., Dawson, W.O. 2002. Mutational analysis on the replication signals in the 3'-nontranslated region of *Citrus tristeza virus*. *Virology*. 300:140–52. doi: 10.1006/viro.2002.1550
- SCOPE. 2018. Sistema Coordinado para la Vigilancia de Plagas Reglamentadas y su Epidemiología. Disponible en <http://sinavef.senasica.gob.mx/mdf/> . Consultado 3 de agosto de 2018.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2001). NOM-031-FITO 2000: *Campaña contra el virus tristeza de los cítricos*. México: Diario Oficial de la Federación. Disponible en línea: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=762092&fecha=10/08/2001

- Semancik, J. S., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R., Duran-Vila, N. 1988. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69: 3059–3068
- SENASICA. 2014. Pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). 1ra Edición. Ficha Técnica 37. 28p.
- SENASICA.2018. Quinto informe mensual campaña contra Huanglongbing de los cítricos. Disponible en línea: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/340214/Informe_mayo_2018_HL_B.pdf. (Consultado en Octubre del 2018)
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2017. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en línea: http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp. (Consultado en mayo 2018).
- Silva-Vara, S. Peña, R. M. A., Peña-Martínez, R., Villegas-Jiménez, N., Byerly-Murphy, K. F. y Rocha-Peña, M. A. 2001 .Distribución del Virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *AGROCIENCIA*. 35:(4) 441-450.
- Serra, P., Gago, S., Duran-Vila N. 2008. A single nucleotide change in *Hop Stunt Viroid* modulates Citrus Cachexia symptoms. *Virus Res.* 138:130-134. doi: 10.1016/j.virusres.2008.08.003
- Tanaka, T. 1952. Monograph on the satsuma orange (History of the introduction of the satsuma orange into the United States). pp. 31-32.
- Timmer, L. W., Garnsey, S. M. and Graham, J. H. 2000. Compendium of citrus diseases. Second edition. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA Pag.92.
- Tirtawidjaja, S. 1980. Citrus virus research in Indonesia. Pag. 129-132 in: Proc. of the 5th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. W. C. Price, ed. Univ. Florida Press, Gainesville, FL.
- Teixeira, D. C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E. C., Wulff, N. A., Eveillard-Jagoueix, S., Yamamoto, P. T., Ayres, A. J., y Bové, J. M. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbning

- disease of citrus in Sao Paulo state, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 22, 139–150
- Trujillo A. J. 2010. Situación Actual, Regulación y Manejo del HLB en México. Memorias del 2° Taller Internacional del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los cítricos. Mérida, Yucatan, México p. 141-149.
- Trujillo-Arriga J., Sánchez, A. H., Robles, G. P., de la Rosa A. A., Delgadillo, V. I., Márquez, S. M. 2010. Antecedentes y situación actual de Huanglongbing de los cítricos en México. Memoria 1er Simposio Nacional Sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los cítricos y el HLB en México: 1-7p.
- Van der Merwe, A.J. and F.G. Andersen. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening?. *Fmg. S. Afr.* 12: 439-440.
- Villegas, M. A., Mora, Aguilera, Antonio. Avances de la fruticultura en México. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal* , 33(1):179-186.
- Van Vuuren S. P. 1993. Variable transmission of African greening to sweet orange. *Proc. 12th Conf. IOCV, Riverside, CA.* Pp. 264-268.
- Weathers, L.G. and Hartung, M.K. 1964. Transmission of citrus viruses by dodder, *Cuscuta subinclusa*. *Plant Dis. Repr.* 48: 102–103.
- Yokomi, R.K. y Garnsey, S.M. 1987. Transmission of citrus tristeza virus by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica.* 19: 169–172.
- Yokomi, R. K., Garnsey, S. M., Lee, R.F. y Youtsey, C.O. 1991. Spread of decline-inducing isolates of citrus tristeza virus in Florida. *Proc. Int. Soc. Citriculture, 1992,* 2: 778-780.
- Yokomi, R. K., Lastra, R., Stoetzel, M. B., Damsteegt, V. D., Lee, R. F., Garnsey, S. M., Gottwald, T. R., Rocha-Pena, M. y Niblett, C. L. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in central American and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. *J. Economic Ent.*, 87: 1078-1085.
- Zhao, X. Y. 1981. Citrus yellow shoot (huanglungbin) in China: A review. *Proc. Int. Soc. Citricult.* 1: 466-469.

APÉNDICE

Número de muestra	Localidad	Municipio	Especie	Coordenadas	C L a s	CTV	HpS Vd	C E V d
39	Tamatoco	Álamo	Mandarina Dancy	21°04.063 -97°50.070	-	+	+	+
40	La Independencia	Álamo	Naranja Valencia	21°00.915 -97°51.764	-	+	+	-
41	La Llave	Álamo	Naranja Valencia	20°53.778 -97°53.032	-	+	+	+
42	La Camelia	Álamo	Naranja Valencia	20°54.055 -97°45.675	-	+	+	-
43	Tortuga	Álamo	Naranja Valencia	20°57.850 -97°40.097	-	+	+	-
44	Cañas Granadilla	Álamo	Naranja Valencia	20°49.570 -97°34.315	-	+	+	-
45	San Miguel	Álamo	Naranja Valencia	20°56.727 -97°33.286	-	+	+	+
98	Paso del Perro	Álamo	Naranja Valencia	20°50.280 -97°.47.921	+	+	+	+
99	Monte Verde	Álamo	Naranja Valencia	21°06.719 -97°42.597	+	+	+	+
100	Monte Verde	Álamo	Naranja Valencia	21°06.702 -97°42.605	-	+	+	-
101	San Miguel	Álamo	Mandarina Mónica	20°53.666 -97°31.357	-	+	+	-
102	La Via	Álamo	Mandarina Mónica	20°53.663 -97°31.469	-	+	-	+
103	Hidalgo Amajac	Álamo	Lima Persa	20°54.760 -97°37.082	-	+	+	-
104	La Vega	Álamo	Naranja Valencia	20°55.145 -97°38.318	-	+	+	+
105	Jardín Viejo	Álamo	Pomelo	20°54.513 -97°39.000	+	+	+	+
					3	15	14	8

N° de muestra	Comunidad	Municipio	Especie	Coordenadas	C L a s	CT V	Hp Sv d	C E V d
34	El Ojite	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°41.115 -97°39.210	-	+	+	-
35	La Defensa	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°39.695 -97°43.357	-	+	+	-
36	La Defensa	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°39.702 -97°43.379	-	+	+	-
37	La Puerta	Castillo de Teayo	Mandarina	20°41.406 -97°41.474	-	+	+	+
38	El Moralillo	Castillo de Teayo	Naranja	20°47.243 -97°43.249	-	+	+	-
85	Lima Vieja	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°37.654 -97°38.032	-	+	+	-
86	Lima Vieja	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°47.336 -97°38.471	-	+	+	+
87	Castillo de Teayo	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°44.675 -97°39.452	-	+	+	-
88	Castillo de Teayo	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°44.635 -97°39.473	-	+	+	-
89	Casa quemada	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°46.436 -97°41.445	-	+	+	-
90	El Bejucal	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°48.360 -97°39.049	-	+	+	-
91	El Bejucal	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°48.045 -97°39.464	-	+	+	-
92	Las Américas	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°48.901 -97°36.985	-	+	+	-
93	Las Américas	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°48.413 -97°36.636	-	-	+	-
94	Ejido de Teayo	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°45.931 -97°41.412	-	+	+	-
95	Ejido de Teayo	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°45.779 -97°41.016	-	+	+	-

96	El Ojital	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°42.683 -97°39.736	-	+	+	-
97	El Ojital	Castillo de Teayo	Naranja Valencia	20°42.686 -97°39.739	-	+	+	-
					0	17	18	2

N° de muestra	Comunidad	Municipio	Especie	Coordenadas	C L a s	CT V	Hp SV d	C E V d
1	Cazones	Cazones	Mandarina Ortanique	20°45.254 -97°19.254	-	+	+	-
2	Km 25	Cazones	Naranja Valencia	20°45.513 -97°19.706	+	+	+	-
3	Km 19	Cazones	Mandarina	20°47.076 -97°18.203	-	+	+	+
4	Km 30	Cazones	Naranja	20°43.149-97°19.380	-	-	+	+
5	Punto cero	Cazones	Naranja	20°42.938 -97°23.084	-	+	+	-
17	El Bohemio	Cazones	Lima persa	20°42.190 -97°16.651	-	+	+	-
18	El Bohemio	Cazones	Lima Persa	20°42.623 -97°16.244	+	-	+	-
19	El Bohemio	Cazones	Lima persa	20°42.773 -97°16.195	-	+	+	-
20	El Bohemio	Cazones	Lima persa	20°40.847-97°19.288	+	-	+	+
21	El Bohemio	Cazones	Lima persa	20°42.708 -97°16.913	-	+	+	-
22	El Cabellal	Cazones	Naranja Valencia	20°40.847-97°19.288	-	+	+	-
23	El Cabellal	Cazones	Naranja Valencia	20°40.847-97°19.288	+	+	+	-
28	Crucero Km 31	Cazones	Naranja	20°42.449 -97°22.067	-	+	+	-
46	Limón chiquito	Cazones	Naranja Valencia	20°41.903 -97°17.936	-	-	+	+
47	Migueles	Cazones	Naranja Valencia	20°41.623 -97°15.597	+	+	+	-
48	Migueles	Cazones	Lima Persa	20°41.603 -97°15.601	-	+	+	+
49	Los Migueles	Cazones	Naranja Valencia	20°41.807 -97°15.628	-	+	+	-
50	Los Migueles	Cazones	Pomelo	20°41.906 -97°15.646	-	+	+	-
51	Rancho Palma	Cazones	Naranja valencia	20°42.927 -97°14.830	-	+	+	-
52	Rancho Nuevo	Cazones	Pomelo	20°40.570 -97°11.938	-	+	+	-
53	Rancho Nuevo	Cazones	Pomelo	20°40.537 -97°11.950	-	+	+	-
					5	17	21	5

N° Muestra	Comunidad	Municipio	Especie	Coordenadas	C T V	H L B	Exo cort is	Cac hexi a
6	La concha	Tihuatlán	Naranja	20°39.791 -97°23.061	+	-	-	+
7	La Concha	Tihuatlán	Naranja	20°39.792-97°23.061	+	-	-	+
9	La Concha	Tihuatlán	Mandarina Mónica	20°39.880 -97.27.04	-	-	-	+
10	La Concha	Tihuatlán	Mandarina Mónica	20°39.880 -97.23.108	-	-	+	+
11	La Concha	Tihuatlán	Naranja	20°39.876-97°23.067	+	+	-	+
12	La Concha	Tihuatlán	Mandarina		-	-	-	+
13	La concha	Tihuatlán	Mandarina Fairchaild	20°39.789 -97°22.934	+	-	+	+
14	La Concha	Tihuatlán	Mandarina Tuxpeña	20°39.797 -97°22.929	-	-	-	+
15	La Concha	Tihuatlán	Mandarina Tuxeña	20°39.824 -97°22.916	+	-	-	+
16	La Concha	Tihuatlán	Pomelo	20°39.125 -97°23.698	+	-	+	-
77	Ejido del Sauce	Tihuatlán	Naranja Valencia	20°35.533 -97°33.956	-	-	-	+
78	Copal	Tihuatlán	Naranja Valencia	20°35.925 -97°34.653	-	-	-	+
79	Copal	Tihuatlán	Naranja Valencia	20°36.901 -97°33.691	-	-	-	-
80	Miahupán San Nicolas	Tihuatlán	Naranja Valencia	20°38.253 -97°36.577	-	-	-	+
81	La Independencia	Tihuatlán	Naranja Valencia	20°37.921 -97°36.707	-	-	-	+
82	El Mamey	Tihuatlán	Naranja Valencia	20°38.049 -97°39.165	-	-	-	+
83	El Mamey	Tihuatlán	Naranja Valencia	20°38.052 -97°39.161	-	-	+	+
84	Las Palmas	Tihuatlán	Naranja Valencia	20°37.654 -97°38.031	+	-	-	+
					7	1	4	16

N° Muestra	Comunidad	Municipio	Especie	Coordenadas	C T V	H L B	Exoc ortis	Ca ch exi a
24	Venustiano Carranza	Tuxpan	Naranja	21°09.476 -97°28.277	+	-	-	+
25	Venustiano Carranza	Tuxpan	Naranja	21°09.476 -97°28.277	+	-	-	+
59	Francisco I. Madero	Tuxpan	Naranja Valencia	20°44.481 -97°24.107	-	-	-	+
60	Francisco I. Madero	Tuxpan	Naranja Valencia	20°44.629 -97°23.873	-	-	-	+
61	Francisco I. Madero	Tuxpan	Naranja Valencia	20°44.649 -97°23.9	-	+	-	+
62	San José El Grande	Tuxpan	Naranja Valencia	20°44.909 -97°25.758	-	-	-	+
63	San José El Grande	Tuxpan	Naranja Valencia	20°44.880 -97°25.795	-	-	-	+
64	El Jobo	Tuxpan	Naranja Valencia	20°47.076 -97°25.275	-	-	-	-
65	El Progreso Cabellal	Tuxpan	Naranja Valencia	20°47.138 -97°24.856	-	-	-	-
66	El Progreso Cabellal	Tuxpan	Naranja Valencia	20°47.655 -97°25.406	-	-	-	+
67	El Zapote	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°46.005 -97°26.482	-	-	-	-
68	Ejido Higueral	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°56.792 -97°30.282	-	-	-	-
69	Ejido Higueral	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°56.802 -97°30.193	-	-	-	+
70	Ejido El Lindero	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°59.833 -97°34.788	-	-	-	-
71	Ejido el Lindero	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°59.834 -97°34.781	+	-	-	-
72	Frijolillo	Tuxpan	Mandarina Fairchild	20°55.166 -97°29.311	-	-	+	+
73	Frijolillo	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°55.034 -97°29.236	-	-	-	-
74	Frijolillo	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°54.847 -97°29.090	-	-	-	-
75	Chicolor	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°51.002 -97°30.216	-	-	-	-
76	Chicolor	Tuxpan	Mandarina Mónica	20°50.966 -97°30.179	-	-	-	-
					3	1	1	10

Número de muestra	Localidad	Municipio	Especie	Coordenadas	C L a s	C T V	Hp S V d	C E V D
29	Papantla	Papantla	Pomelo	20°27.382 -97°11.944	-	+	-	-
30	Papantla	Papantla	Pomelo	20°27.361 -97°11.954	-	+	+	-
31	Papantla	Papantla	Naranja	20°27.350 -97°12.030	-	+	+	+
32	Papantla	Papantla	Naranja	20°27.309 -97°12.234	-	+	+	+
33	Papantla	Papantla	Naranja	20°27.312 -97°12.242	-	+	+	-
54	Rancho El Cedro	Papantla	Naranja	20°28.913 -97°12.165	-	+	+	-
			Valencia					
55	Rancho El Cedro	Papantla	Naranja	20°28.959 -97°12.156	-	+	+	-
			Valencia					
56	El Cedro	Papantla	Naranja	20°28.902 -97°11.951	-	+	+	-
			Valencia					
57	El Cedro	Papantla	Naranja	20°28.906 -97°12.020	-	+	+	-
			Valencia					
58	El Cedro	Papantla	Naranja	20°28.649 -97°09.564	-	+	+	-
			Valencia					
					0	1	9	2
						0		

