



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECTAR EL AGENTE
CAUSAL DE LA ENFERMEDAD HLB EN CÍTRICOS DE LA
HUASTECA HIDALGUENSE**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

CHRISTIAM ESPINOZA SÁNCHEZ



DIRECCION GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DIRECCIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES



CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2018

Técnicas moleculares para detectar el agente causal de la enfermedad HLB en cítricos de la Huasteca Hidalguense

Tesis realizada por **CHRISTIAM ESPINOZA SÁNCHEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de

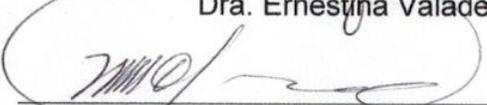
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



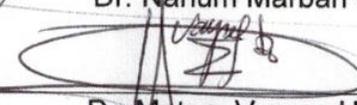
Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR:



Dr. Nahúm Marbán Mendoza

ASESOR:



Dr. Mateo Vargas Hernández

CHAPINGO, EDO. DE MÉXICO, JUNIO DE 2018

Contenido

ABREVIATURAS Y SIGLAS	vi
DEDICATORIA	viii
AGRADECIMIENTOS	ix
DATOS BIOGRÁFICOS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE CUADROS	xiv
CAPÍTULO I.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1 HIPÓTESIS	17
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	17
1.2.1 Objetivos Específicos	17
CAPÍTULO II REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
2.1 Taxonomía de los cítricos.....	18
2.2 El cultivo de los cítricos	21
2.3 Importancia de los cítricos	22
2.4 Enfermedades de los cítricos	25
2.5 Huanglongbing	31
2.6 Organismos asociados al HLB	32
2.6.1 <i>Ca. Liberibacter</i> spp.	32
2.6.2 Fitoplasmas	35
2.7 Sintomatología de HLB.....	42
2.8 El papel de los insectos como vectores de fitopatógenos	44
2.9 Insecto vector de <i>Ca. L. asiaticus</i> y <i>Ca. L. americanus</i>	45
2.9.1 Taxonomía <i>Diaphorina citri</i> Kuwayama	45
2.9.2 El Psílido Asiático de los Cítricos	45
2.10 Insecto vector de <i>Ca. Liberibacter africanus</i>	48
2.10.1 Taxonomía de <i>Trioza erytreae</i>	48
2.10.2 El Psílido Africano de los Cítricos.....	48

2.11 Vectores de <i>Ca. Fitoplamas asteris</i>	50
2.12 Situación actual del HLB.....	50
2.13 Manejo del HLB	53
2.14 Impacto del Huanglongbing	55
2.15 Referencias bibliográficas.....	58
CAPITULO III TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECTAR EL AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD HLB EN CÍTRICOS DE LA HUASTECA HIDALGUENSE	72
3.1 INTRODUCCIÓN.....	73
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	76
3.2.1 Ubicación.....	76
3.2.2 Extracción de DNA de muestras vegetales	84
3.2.3 Extracción de DNA de Psílicos.....	85
3.2.4 Cuantificación del DNA.....	86
3.2.5 Determinación de la calidad del DNA	86
3.2.6 Determinación de las condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>	87
3.2.7 Determinación de las condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de <i>Ca. Fitoplasma asteris</i>	88
3.2.8 Detección de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i> y <i>Ca. Fitoplasma asteris</i> por PCR.....	90
3.2.9 RFLPs de fragmentos obtenidos con los primers universales.....	91
3.2.10 Separación de fragmentos digeridos en gel de acrilamida	92
3.2.11 Análisis de datos RFLPs	93
3.2.12 Secuenciación	93
3.2.13 Aislamiento bacteriano	94
3.3 RESULTADOS	96
3.3.1 Extracción de DNA de muestras vegetales	96
3.3.2 Extracción de DNA de muestras de psílicos.	96
3.3.3 Determinación de la calidad del DNA	97

3.3.4 Muestras evaluadas en gradiente de temperatura	98
3.3.5 Detección con PCR de <i>Ca. Liberibacter asiaticus</i>	100
3.3.6 Prueba de detección de fitoplasmas con PCR y PCR anidada	102
3.3.7 Digestiones enzimáticas de la región 16S del DNAr	102
3.3.8 Análisis de datos	104
3.3.9 Secuenciación	111
3.3.10 Aislamiento bacteriano	111
3.4 DISCUSIÓN.....	112
3.5 CONCLUSIONES.....	116
3.6 LITERATURA CITADA	117
ANEXOS.....	121

ABREVIATURAS Y SIGLAS

A₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
AgNO₃	Nitrato de Plata
APS	Persulfato de Amonio
BLAST	Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local
DNA_r	Acido desoxiribonuceico ribosomal
dNTP	Desoxinucleótidos Trifosfato
EDTA	(<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>) Acido etilendiaminotetracetico
et al	Del latin “et alia” o “et alii” que significa “y otros”
EtBr	Bromuro de etidio
EtOH	Etanol
g	Gramo (-s)
h	Hora (-s)
HPLC	(<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>) Cromatografía líquida de alta presión
kb	Kilobases
mA	Miliamperes
Min	Minuto (-s)
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitros
mM	Milimol (-s)
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
Ng	Nanogramo (-s)
Nm	Nanómetro (-s)
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Reacción en cadena de la polimerasa
Pb	Pares de bases
PM	Peso molecular
pM	Picomoles
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
rpm	Revoluciones por minuto
rx	Reacción (-s)
s	Segundo (-s)
RFLPs	Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción
TAE	Tris-acetato EDTA (amortiguador)
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato EDTA
TEMED	NNNN-Tretramethylethylene-diamine for electrophoresis
T_m	Temperatura de alineamiento
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Uv	Ultravioleta

V	Voltios
x	Veces la concentración
[FINAL]	Concentración FINAL
°C	Grado Celsius
μL	Microlitro (-s)
μM	Micromol (-s)

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido coincidir en tiempo y vida con aquellas personas de las que he aprendido las lecciones más importantes en mi vida.

A mi esposa Celenita, soporte de mis sueños y dulce compañera de mi vida, sin tu apoyo no hubiese podido lograr este objetivo, gracias por darme el regalo más grande del mundo, nuestra hija. A mi pequeña Enyd Eleanny, mi hermosa princesa, que me enseñó un mundo nuevo de amor y alegría sembrando en mí el deseo de entregarle todo cuanto soy y cuanto seré, te amo pequeña.

A mis padres María Guadalupe Sánchez Coronel y Manuel Alejandro Espinoza Hernández por haberme cuidado desde el momento en que llegué a este mundo y por el apoyo incondicional que me brindaron en cada paso que he dado desde entonces.

A mis hermanos Xindy Emmanuel y Edward Alexander Espinoza Sánchez por todo cuanto han compartido conmigo, por todo el respaldo que he recibido de ellos y porque siempre han estado cuando más los he necesitado.

A mi sobrina Emma Alessandra, porque además de ser mi sobrina, eres el corazón de mi hermano, aquel con el que ríe y llora, aquel con el que desde que llegaste vive como jamás lo hizo antes.

A mi Papá Vale (QEPD) porque creo fervientemente que está conmigo a cada paso que doy, aconsejándome, como siempre lo hizo. A mi mamá Tina, porque me ha dado el placer de disfrutar del amor de una segunda madre.

A mis primos, Jonathan, Jennifer, Luis “Sangronio”, Maykary, Xiadany, Citlaly, Junuethe, Vivían, Tristan, Mayán, Erick, Valentín, a mis sobrinos Eduardo y Yolotzin, a mis tíos Valentín, Genny, Toño, Lina, Xóchitl, Nacho, Homero y Ernesta porque han estado en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su financiamiento a través de la beca que me permitió realizar mis estudios de postgrado.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, que me abrigó desde el momento en que llegué, porque gracias a ella pude vislumbrar realidades antes veladas para mí y más importante aún, porque en ella encontré a una nueva amiga.

Al Dr. Nahúm Marbán Mendoza por las palabras que nos compartió a mis compañeros y a mí, que nos invita a ser más reflexivos en el quehacer de nuestra profesión.

Al Dr. Mateo Vargas porque me hizo comprender sin saberlo, que los retos que la vida te presenta en la forma que a ella se le antoje, son por mucho superables.

Al Ing. Edi Arroyo Cruz, Coordinador de la Campaña contra el HLB, del CESAVEH, porque sin conocerme previamente me brindó un invaluable apoyo en la realización de las colectas para la presente tesis.

A mis compañeros de la Generación 58 de la Maestría en Protección Vegetal: Aldo Bustamante, Iván Herbé, Paola Cubillos, Javier Flores, Ramiro Hernández e Imelda Jarquín porque me brindaron su amistad y durante mi estancia en Chapingo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Christiam Espinoza Sánchez, nació el 16 de marzo de 1983 en la Ciudad de Huejutla de Reyes, Hidalgo. Realizó sus estudios básicos en la Escuela Lázaro Cárdenas del Río en esa misma ciudad y la educación secundaria en la Escuela Secundaria General Héroe Antonio Reyes.

Realizó sus estudios de nivel medio superior en el Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 5 mismos que culminó en el año de 2001. Posteriormente realizó sus estudios profesionales en el Instituto Tecnológico de Huejutla donde se graduó como Lic. en Biología en el año 2008.

En el año 2016 ingresó a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica de los cítricos según Swingle y Reece (1967).	19
Figura 2. Especies pertenecientes al género <i>Citrus</i> según Swingle y Reece 1967.	20
Figura 3. Producción/Rendimiento de Fruta cítrica a nivel mundial (FAOSTAT, 2014).	22
Figura 4. Producción de cítricos a nivel nacional (SIAP, 2016).....	23
Figura 5. Áreas productoras de cítricos de la República Mexicana (SENASICA, 2017).	24
Figura 6. Producción de cítricos (<i>Citrus aurantifolia</i> Christm, <i>Citrus sinensis</i>) (SIAP, 2016).	25
Figura 7. Limón persa con presencia de síntomas de HLB causado por fitoplasmas (Espinoza, 2017).	42
Figura 8. A) Sintomatología del HLB en limón mexicano (<i>Citrus aurantifolia</i> Christm), moteado asimétrico (izquierda) (Espinoza, 2017), B) acorchamiento de nervaduras (derecha) (CESAVETAM, 2013)	43
Figura 9. Situación actual del HLB a nivel mundial (SENASICA, 2017).	51
Figura 10. Situación actual del HLB en México con base en el monitoreo a nivel municipal acumulado hasta el mes de agosto de 2017 (SENASICA, 2017).	52
Figura 11. Presencia del HLB en la región Huasteca Hidalguense (SENASICA, 2017).	53
Figura 12. A) Muestra sintomática al HLB en limón mexicano colectadas en el municipio de Huejutla, Hgo. (Espinoza, 2017) B) Planta de limón mexicano presentando manchas angulares (CESAVEH, 2017). C) Síntomas de HLB en Limón mexicano (Gómez, 2014) y D) Evolución de los síntomas de HLB en limón mexicano (Robles-González, 2013).	78
Figura 13. Ubicación geográfica de las muestras vegetales e insectiles colectadas para el presente proyecto de tesis.	83
Figura 14. Gel de agarosa 1% mostrando la calidad del DNA extraído en algunas de las muestras evaluadas en el presente proyecto; la flecha señala bandas de DNA de alto peso molecular. Todas las muestras referidas en la presente figura corresponden a muestras de naranja colectadas en el municipio de Orizatlán.	98
Figura 15. Gradiente de temperatura de izquierda a derecha M= Marcador de peso molecular, 1) Muestra positiva a fitoplasma, 2) muestra al azar, 3 y 4) muestra positiva a HLB.	98

- Figura 16.** Gradiente de temperatura de izquierda a derecha M= Marcador de peso molecular, 1= Muestra positiva a fitoplasma, 2= muestra al azar, 3= Muestra de psílido y 4= muestra positiva a HLB. 99
- Figura 17.** Prueba de gradientes de muestras amplificadas con los primers primers P1/P7 y fU5/rU3 en dos muestras sintomáticas a *Candidatus* Fitoplasma. (Muestra 93 y 94), una muestra de coco con síntomas de Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en la cual se aprecia el fragmento amplificado de aproximadamente 850 pb y una muestra de durazno con posible infección de fitoplasma. El marcador de peso molecular es de 1 kb. 100
- Figura 18.** Gel de agarosa mostrando resultados negativos de PCR utilizando los primers específicos A2/J5 en la detección de *Candidatus* Liberibacter asiaticus en algunas muestras de cítricos y psíidos. Se utilizó el marcador peso molecular de 1Kb como referencia (carril de la derecha). 101
- Figura 19.** Amplificación de fragmentos de DNA con los primers R16F0 y R16R0 de algunas de las muestras de cítricos observándose el fragmento esperado de aproximadamente de 1485 pb (flecha anaranjada); pero además un fragmento de aproximadamente de 500 pb (flecha negra). En el gel se incluyeron 5 Muestras positivas para HLB (círculo rojo). El marcador de peso molecular es de 1 kb 101
- Figura 20.** Amplificación negativa para la detección del fitoplasma *Candidatus* Fitoplasma asteris con los iniciadores P1/P7 y fU5/rU3, respectivamente en algunas muestras de cítricos 102
- Figura 21.** Perfiles RFLPs con la enzima *HaeIII* para algunas muestras sintomáticas de cítricos con HLB (en blanco) y fitoplasma (azul), psíidos (amarillo) y controles (verde). Las flechas señalan algunos polimorfismos. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia. 103
- Figura 22.** Perfiles RFLPs con la enzima *HinfI* para algunas muestras sintomáticas de cítricos con HLB (en blanco) y fitoplasma (azul), psíidos (amarillo) y controles (verde). Las flechas señalan algunos polimorfismos. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia. 103
- Figura 23.** Perfiles RFLPs con la enzima *HhaI* para algunas muestras sintomáticas de cítricos con HLB (en blanco) y fitoplasma (azul), psíidos (amarillo) y controles (verde). Las flechas señalan algunos polimorfismos. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia. 104
- Figura 24.** Dendrograma generado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *HaeIII*. Muestras sintomáticas a HLB por *Candidatus* Liberibacter en círculo rojo y *Candidatus* Fitoplasma en círculo azul. 106

Figura 25. Dendrograma generado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *Hhal*. Muestras sintomáticas a HLB por *Candidatus Liberibacter* en círculo rojo y *Candidatus Fitoplasma* en círculo azul. 107

Figura 26. Dendrograma generado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *Hinfl*. Muestras sintomáticas a HLB por *Candidatus Liberibacter* en círculo rojo y *Candidatus Fitoplasma* en círculo azul. 108

Figura 27. Dendrograma generado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *Hhal*, *Hinfl*, *Haelll*. Los grupos formados ayudaron a determinar la infección del HLB de muestras asintomáticas. Muestras sintomáticas a HLB por *Candidatus Liberibacter* en círculo rojo y *Candidatus Fitoplasma* en círculo azul. 110

Figura 28. Fragmento de los resultados de la secuenciación de la muestra número 19 sintomática al HLB en la que se observa la baja calidad de los mismos. 111

Figura 29. Los aislamientos en agar nutritivo de las muestras sintomáticas resultaron negativos tal como se muestra en la imagen anterior. 112

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Síntomas visuales y alteraciones histológicas de los principales patógenos que afectan a los cítricos.....	27
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de los fitoplasmas (Wei et al., 2007; Velasquez-Valle et al., 2014)	37
Cuadro 3. Plantas hospederas de <i>Diaphorina citri</i> (De La Federación, 2009). 47	
Cuadro 4. Diferencias entre <i>D. citri</i> y <i>T. erythrae</i>	49
Cuadro 5. Impacto estimado en México bajo un escenario de alta incidencia de HLB (SENASICA, 2017).	56
Cuadro 6. Epidemias de Huanglongbing en el mundo (Gottwald, 2010; Robles-González et al., 2013).	57
Cuadro 7. Muestras de plantas de cítricos con síntomas y experimentales (asintomáticas) a infección con <i>Candidatus Liberibacter</i> y <i>Candidatus Fitoplasma asteris</i>	77
Cuadro 8. Datos de colectas realizadas en la Región Huasteca Hidalguense. 78	
Cuadro 9. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> con los primers R16f0/R16R0 y para A2/J5.	88
Cuadro 10. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación del fragmento de fitoplasmas de 1800 pb.	89
Cuadro 11. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación del fragmento anidado de fitoplasmas de 850 pb.	90
Cuadro 12. Reactivos y procesos para la preparación de geles de acrilamida.92	
Cuadro 13. Muestras secuenciadas representativas para el estudio.	94
Cuadro 14. Muestras utilizadas para los aislamientos bacterianos.	95
Cuadro 15. Cantidad y calidad de DNA obtenidas de muestras de cítricos analizadas (3 g).	96
Cuadro 16. Cantidad y calidad de DNA obtenidas de muestras de psílicos analizadas.	97
Cuadro 17. Muestras de cítricos y psílicos no digeridas por las enzimas <i>HaeIII</i> , <i>HhaI</i> y <i>Hinfl</i>	105

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La citricultura se ha expandido rápida y considerablemente durante los últimos años por lo que hoy en día figura entre los principales cultivos frutales en el mundo excediendo las 9 millones de Has, con un rendimiento superior a las 120 millones de toneladas. Los países más importantes en la producción de cítricos son China, Brasil, E.U.A., México y España, así mismo, la naranja y las mandarinas figuran como los cítricos más cultivados mundialmente (FAO, 2016).

En México el cultivo de los cítricos tiene gran relevancia (Arratia-Castro *et al.*, 2014) al estar presente en 23 entidades federativas, el 80% de la superficie de cultivos citrícolas se destina a cítricos dulces como naranja, toronja y mandarina (SAGARPA, 2016). La producción nacional en el 2016 ascendió a 7, 843, 775.14 ton con un valor neto de \$ 17, 491, 729, 480 obtenidas de 535, 435.21 has cultivadas (SIAP, 2016). En la región Huasteca Hidalguense la citricultura es una de las principales actividades agrícolas de la que dependen alrededor de 6, 500 productores y que generan aproximadamente \$ 37, 353 ,000 en 57, 781.88 ton de producción anual (SIAP, 2016).

El Huanglongbing (HLB) figura entre las enfermedades más importantes de los cítricos, de origen bacteriano, que provoca considerables pérdidas en los cultivos por lo que se considera como una de las enfermedades más devastadoras (Bové, 2006; Halbert y Manjunath, 2004; Roistacher, 1996). Esta enfermedad ha sido asociada a una alfa proteobacteria, Gram-negativa limitada al floema, no cultivable (Bové, 2006); se reportó por primera vez en China (Yamamoto *et al.*, 2006), posteriormente en Taiwan y las islas Filipinas (Otake, 1990). Posteriormente, en 1920 se detectó una nueva especie de *Candidatus* en Sudáfrica (Van Der Merwe y Andersen, 1937; Halbert, 2005). En el continente

Americano la presencia del HLB (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) fue reportada por primera vez en Marzo de 2004 en las proximidades de la ciudad Araraquara, Sao Paulo, Brasil (Coletta-Filho *et al.*, 2004), en ese mismo municipio fue comprobada la presencia de una nueva especie de *Candidatus Liberibacter americanus* (Texeira *et al.*, 2005b). En México la enfermedad se reportó en el año 2009, en el municipio de Tizimín, Yucatán, diseminándose rápidamente hacia Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche y Colima estados importantes en la producción de cítricos (NAPPO, 2009).

El género *Candidatus Liberibacter* es transmitido entre los cítricos por insectos vectores, principalmente *Diaphorina citri* (Kuwayama) presente en Asia y América, y *Trioza erytreae* confinado únicamente al continente Africano; no obstante, el control de la enfermedad está basado principalmente en el uso de material libre de la enfermedad (Bové, 2007) .

Por otro lado, en 2007 se identificaron naranjos infectados con HLB con hojas moteadas, y frutos sintomáticos que fueron negativos para presencia de *Ca. Liberibacter spp.* en China se reportó la presencia de *Candidatus Fitoplasma Asteris* en varias muestras de hojas de cítricos (mandarina, naranja dulce y pomelo) que presentaron síntomas típicos de HLB / moteado (Chen *et al.*, 2009). Basado en su secuencia 16s rDNA, estos fitoplasmas están estrechamente relacionados con el fitoplasma guandul escoba de bruja, (Teixeira *et al.*, 2008). Actualmente existe fuerte evidencia que sugiere la infección de HLB es debida a dos diferentes fitoplasmas, ambos pertenecientes al grupo del amarillamiento del aster (Arratia-Castro *et al.*, 2014).

La susceptibilidad de los cítricos a patógenos como a *Ca. Liberibacter* así como también a las condiciones ambientales extremas debido al cambio climático ponen en riesgo el recurso vegetal (Texeira *et al.*, 2005), por tanto, la detección oportuna e información actualizada generada a partir de métodos eficientes de detección podrían ayudar a tomar medidas de control tanto para los vectores como para *Ca. Liberibacter*, por lo que en este trabajo se propone la identificación

de *Ca. Liberibacter* en cítricos de la región Huasteca Hidalguense por medio de análisis moleculares.

1.1 HIPÓTESIS

La enfermedad del Huanglongbing (HLB) presente en cítricos de la Huasteca Hidalguense es causada por la especie *Ca. Liberibacter*. La identificación de esta bacteria mediante técnicas moleculares permitirá confirmar su presencia en los cultivos.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Detectar e Identificar a la bacteria *Ca. Liberibacter asiaticus* con técnicas moleculares en muestras de cítricos y psílicos vectores de la región Huasteca Hidalguense.

1.2.1 Objetivos Específicos

- Colectar material vegetal de plantas sintomáticas y asintomáticas de HLB en los municipios que comprenden la región Huasteca Hidalguense.
- Detectar e identificar en plantas y psílicos la presencia de *Ca. Liberibacter* spp. con PCR utilizando primers universales y específicos.
- Diferenciar mediante RFLPs los fragmentos de PCR obtenidos con el par de primers universales a fin de reconocer los diferentes tipos de amplicones.
- Secuenciar los diferentes amplicones derivados de los agrupamientos RFLPs, que corresponden al gen 16S RNA, y conocer su identidad genética mediante análisis de alineamiento por BLAST.
- Generar un mapa de prevalencia de *Ca. Liberibacter* spp. de la región Huasteca Hidalguense.

CAPÍTULO II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Taxonomía de los cítricos

La clasificación intragénica del Género *Citrus* presenta gran complejidad debido a los frecuentes procesos de hibridación y apomixis (poliembrionía nuclear) (García *et al.*, 1999; Xiang y Roose, 1998) lo cual ha originado una controversia en cuanto a especies se refiere; así, Linnaeus (1753) y Hooker (1875) mencionan la existencia de tres especies de cítricos; por otro lado Tanaka (1954) reporta la existencia de por lo menos 145 especies y más tarde, el propio Tanaka (1969) modificó sus observaciones al reportar 159 especies.

Otros taxónomos realizaron sus propias interpretaciones o modificaron las preexistentes y tomaron números de especies intermedias (Oliver, 1861; Lushington, 1910; Guillaumin, 1911; Swingle, 1943). Actualmente las clasificaciones de cítricos más empleadas son las de Swingle, (1967) y la de Tanaka (1954, 1961).

Los cítricos por norma general pertenecen al orden Geraniales, familia Rutaceae y subfamilia Aurantioideae, esta última se considera un grupo monofilético (Scott *et al.*, 2000; Groppo *et al.*, 2008; Morton, 2009). De acuerdo a Groppo *et al.* (2008) Aurantioideae debería reconocerse como tribu e incluirse junto a Rotoideae, Toddalioideae y Flindersioideae como subfamilia. De acuerdo con Swingle y Reece (1967) la subfamilia Aurantioideae se divide en las tribus Clauseneae y Citreae, la primera, más primitiva que Citreae, esta última tribu se compone de tres grupos de los cuales los cítricos verdaderos son los más importantes y, junto a este, se encuentran los seis géneros más cercanos a los cítricos (*Fortunella*, *Eremocitrus*, *Poncirus*, *Clymenia*, *Microcitrus* y *Citrus*; Figura 1).

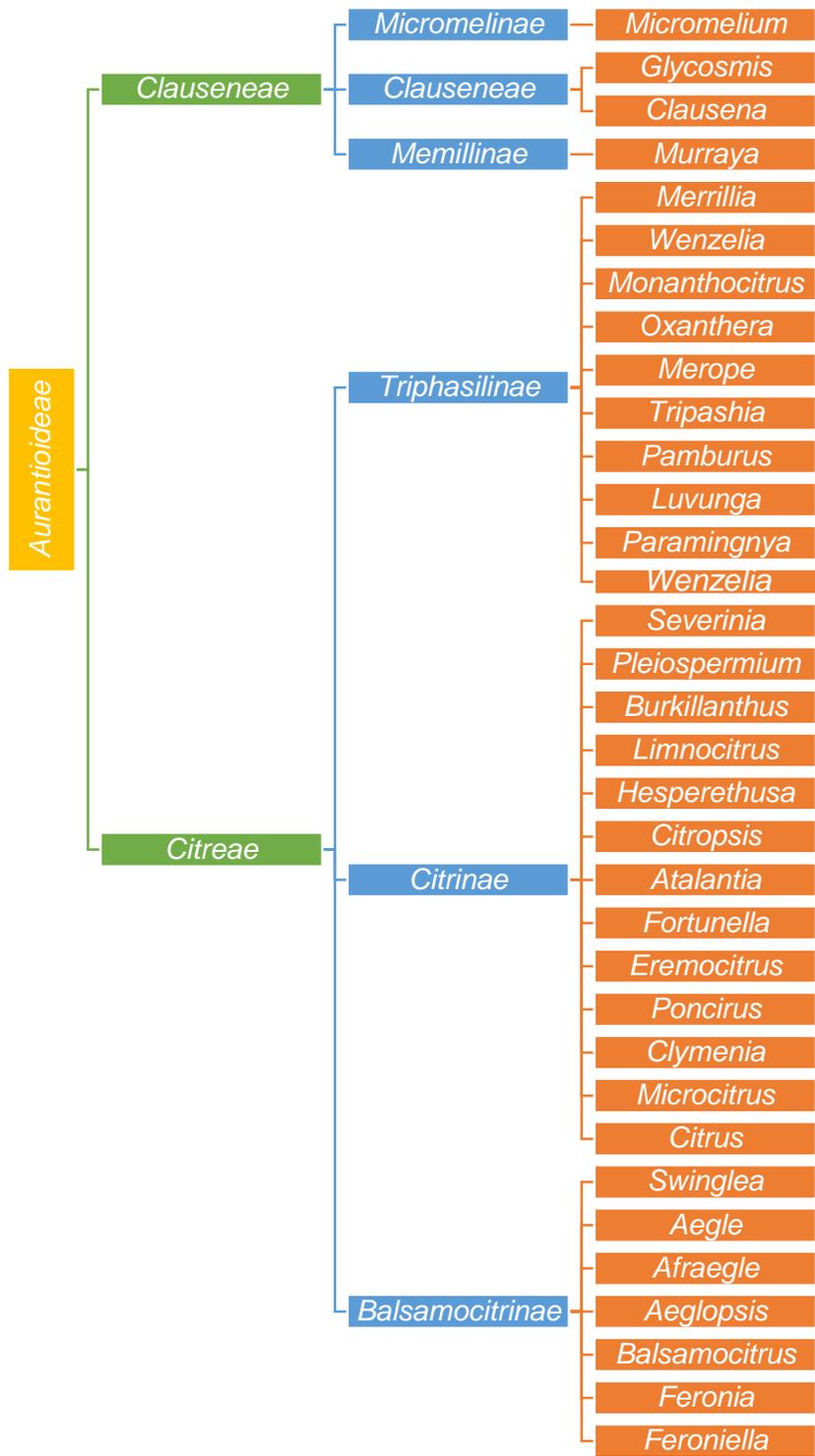


Figura 1. Clasificación taxonómica de los cítricos según Swingle y Reece (1967).

De los géneros que conforman los cítricos verdaderos (*Citrus*, *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Fortunella*, *Microcitrus* y *Poncirus*) y que pertenecen a la subtribu *Citrinae* solo tres adquieren importancia comercial *Poncirus*, *Fortunella* y *Citrus* (Moore, 2001), de los cuales, citrus es el más importante de los tres y está compuesto de plantas de mediano a gran desarrollo, sus especies se muestran en la Figura 2.

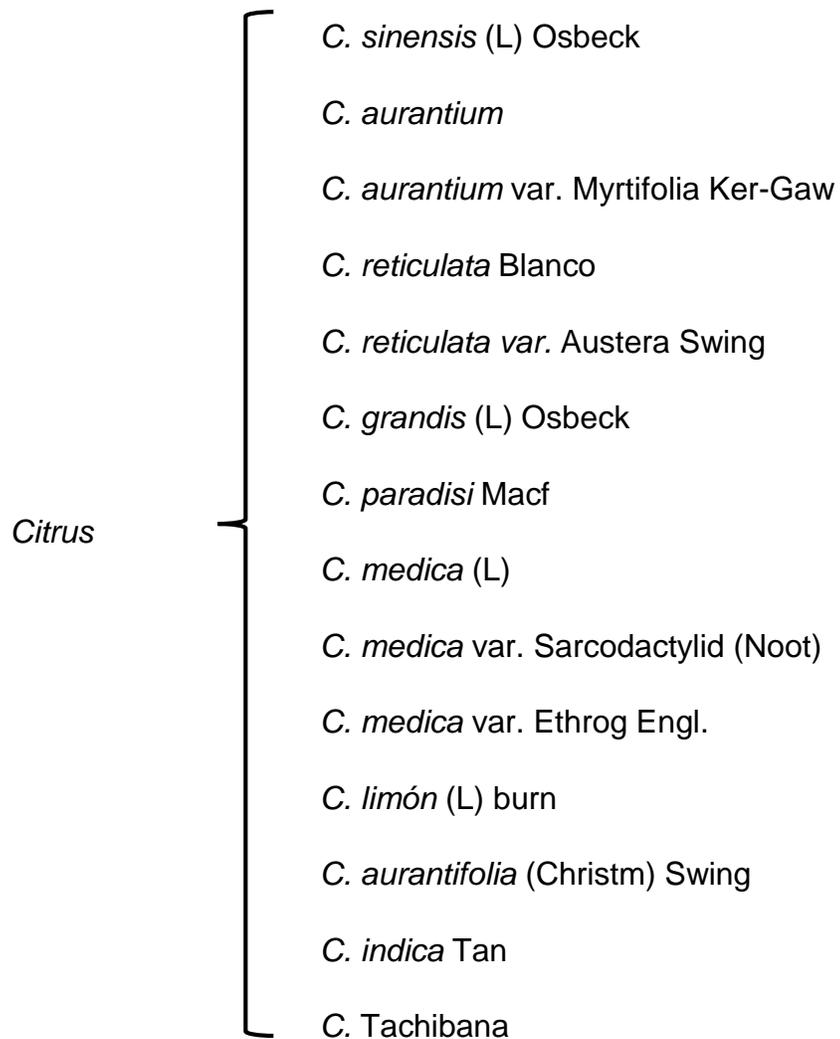


Figura 2. Especies pertenecientes al género *Citrus* según Swingle y Reece 1967.

Poncirus trifoliata (L) Rat, *Fortunella japonica* (Thumb) Swingle y *Fortunella margarita*; también, al igual que los *Citrus* mencionados anteriormente figuran entre los cítricos de mayor importancia para la citricultura mundial (Pralorán, 1977).

2.2 El cultivo de los cítricos

El origen de los cítricos es un conocimiento perdido, según las hipótesis más aceptadas estos se originaron miles de años atrás en el sureste de Asia y su expansión paulatina con el tiempo logró ubicarlo en casi todo el mundo, de igual manera, se desconocen sus rutas de dispersión por los continentes (Calabrese, 1992). Otros autores ubican el centro de origen de los cítricos en el noreste de la India y norte de Burma (Gmitter y Hu, 1990). Cristóbal Colón en su segundo viaje (1493) introdujo en América los primeros cítricos, particularmente en Tahití en donde sembró semillas de naranja dulce, naranja agria, limones, citrones y limas (Hui, 1999; Walheim, 1996).

A finales siglo XIX se registraron las primeras plantaciones comerciales de cítricos para el consumo en fresco y desde sus inicios se han extendido a una gran superficie de cultivo, para lo cual, se han desarrollado técnicas que se basan en la óptima adaptación del cultivo a las condiciones agroclimáticas y la calidad de los productos obtenidos (Zaragoza, 1993). En la actualidad los cítricos se extienden generalmente por las regiones tropicales y subtropicales que se encuentran entre los paralelos 44°N y 41°S (Agustí, 2003).

En México, la introducción de los cítricos se dio cerca del río Tonalá, en Veracruz, donde un soldado-cronista sembró unas semillas de naranja durante un viaje de exploración (Del Castillo, 1955), mientras que la citricultura moderna surge en MonteMorelos a finales del siglo XIX con la explotación a gran escala gracias a plantas de naranjo dulce injertadas en patrones de naranja agria (Olvera, 1991; Cantú, 1959).

Las especies modernas de los cítricos fueron desarrolladas en China que cuenta también con la mayor cantidad de variedades de plantas de este género tanto como de sus problemáticas sanitarias a nivel mundial (Hui, 1999).

2.3 Importancia de los cítricos

Actualmente, la producción y el consumo de cítricos a nivel mundial ha pasado por un periodo de enorme crecimiento y desarrollo, la producción de naranjas, tangerinas, limas y limones se ha expandido rápidamente lo que promovió un rápido crecimiento en la industria cítrica permitiendo grandes ingresos a los países productores; por lo anterior los cítricos figuran entre los principales cultivos frutales en el mundo al superar las 9 millones de Has y una producción superior los 120 millones de toneladas, China es el principal productor de cítricos del mundo, seguido por Brasil, E.U.A., India, México y España. Los cítricos más cultivados son la naranja (56%), y las mandarinas (17%) (FAO, 2016). Los datos de producción de cítricos son mostrados en la Figura 3.

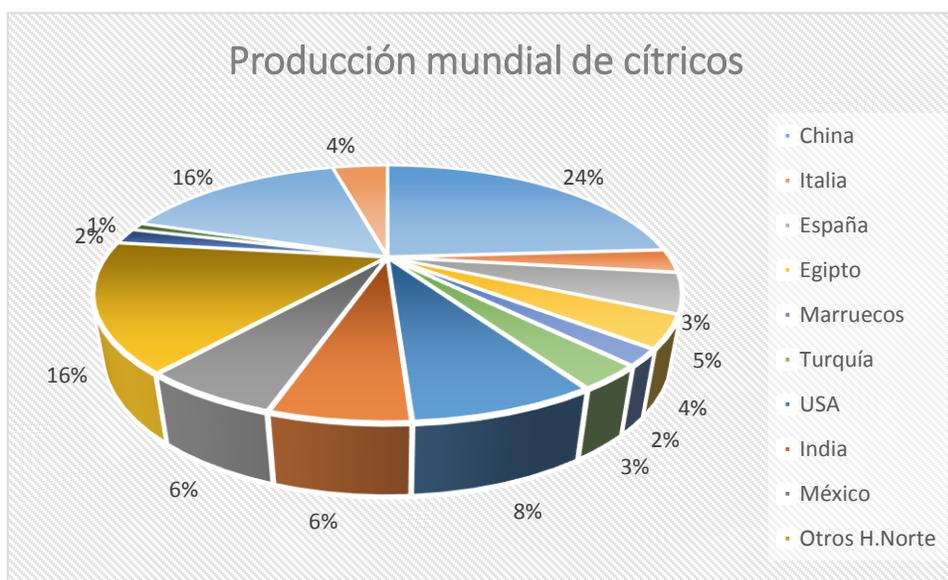


Figura 3. Producción/Rendimiento de Fruta cítrica a nivel mundial (FAOSTAT, 2014).

Los cítricos figuran entre los árboles frutales más importantes cultivados en México (Arratia-Castro *et al.*, 2014), ya que, desde hace algunos años la citricultura es una de las actividades económicas más importantes en nuestro país, practicada en áreas de clima tropical y subtropical en más de 23 entidades federativas, el 80% de la superficie de cultivos está destinada a los cítricos dulces como naranja, toronja y mandarina (SAGARPA, 2016). México produjo un total de 7, 843, 775.14 ton en el 2015 (Figura 4), con un valor neto de \$ 17, 491, 729, 480; el área cultivada con cítricos a nivel nacional es de 535, 435.21 has, de las cuales 58.8 % corresponden a naranja (*Citrus cinensis* L.), 30.7 % limón (*Citrus aurantifolia* Christm) y limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka), 3.7 % mandarina (*Citrus reticulata*), 3.2 % toronja (pomelo) (*Citrus paradisi*), 2.2 % tangerina (*Citrus tangerina*), 0.9 % tangelo (*Citrus reticulata x Citrus paradisi*) y 0.2 % lima (*Citrus aurantifolia*) (Figura 5) (SIAP, 2016), lo que nos coloca en el quinto lugar en producción y el décimo en la exportación de los mismos (FAO, 2016).

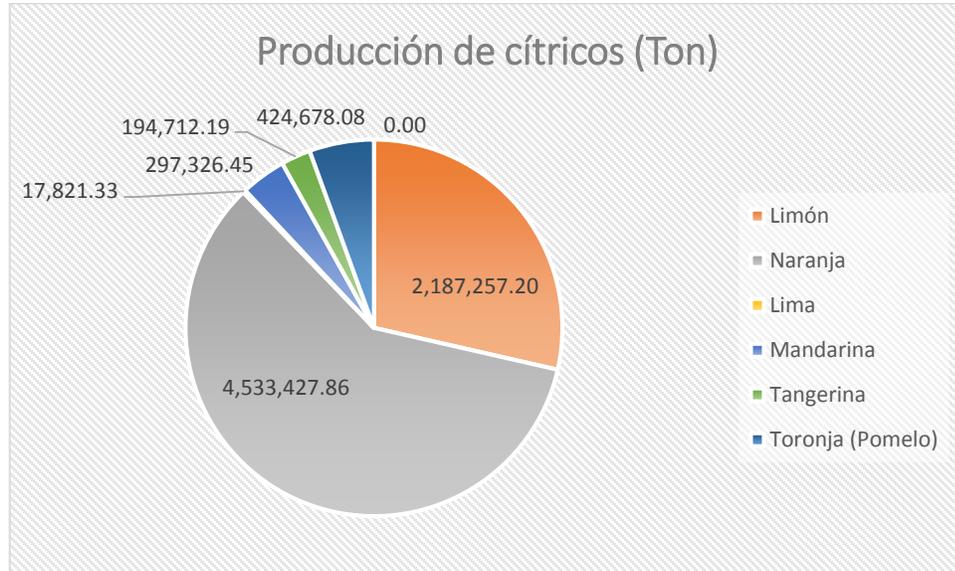


Figura 4. Producción de cítricos a nivel nacional (SIAP, 2016).

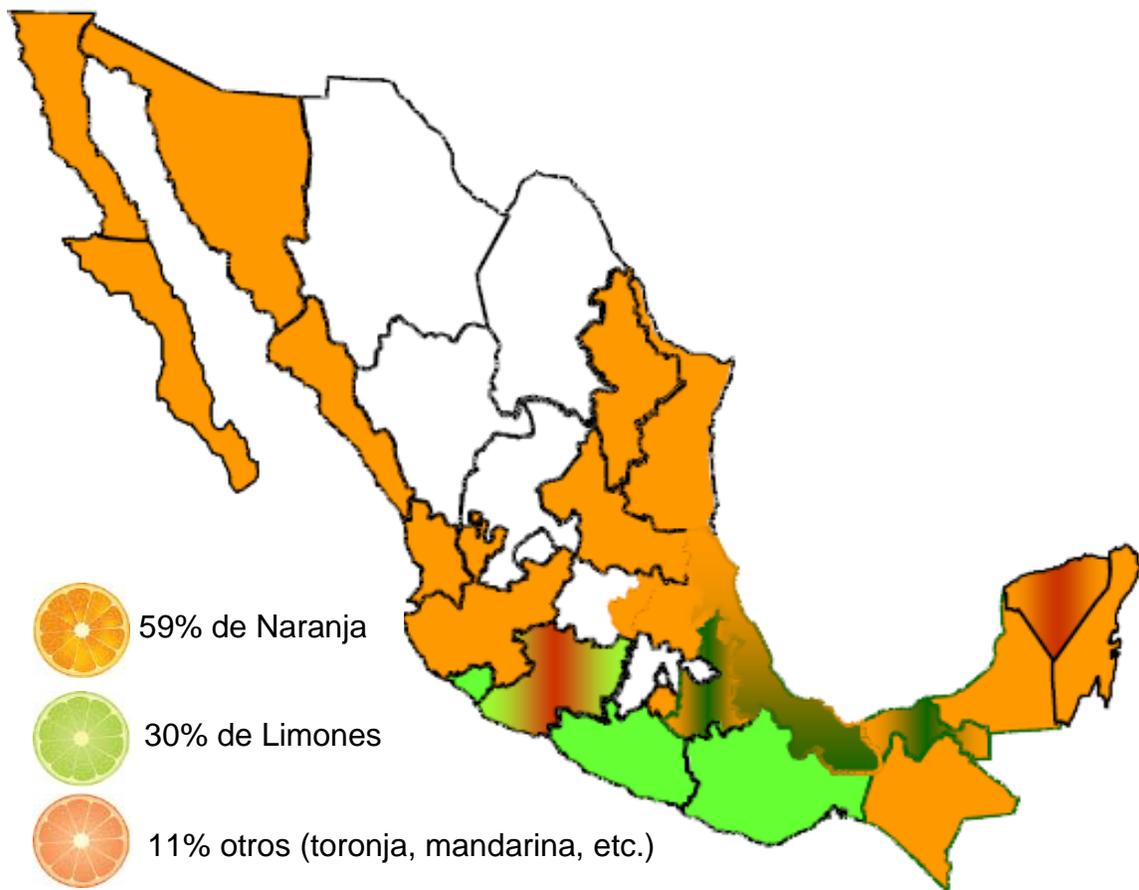


Figura 5. Áreas productoras de cítricos de la República Mexicana (SENASICA, 2017).

En México, la citricultura genera un aproximado de 70 mil empleos directos y más de 250 mil indirectos, representando para el país y las familias de los trabajadores una importantísima actividad agrícola (Trujillo *et al.*, 2008).

En el estado de Hidalgo la producción de cítricos generó en el 2016 utilidades de \$ 63, 684, 520 en un área de 5, 680.50 has; de esta superficie cultivada el 87.6% se encuentra ubicada en la región Huasteca Hidalguense generando cerca del 90% de los ingresos por comercialización de cítricos en el estado (SIAP, 2016).

En la región Huasteca Hidalguense la citricultura es una de las principales actividades agrícolas de la que dependen alrededor de 6,500 productores y que generan aproximadamente \$ 37, 353, 000 en 57, 781.88 ton de producción anual (Figura 6) (SIAP, 2016).

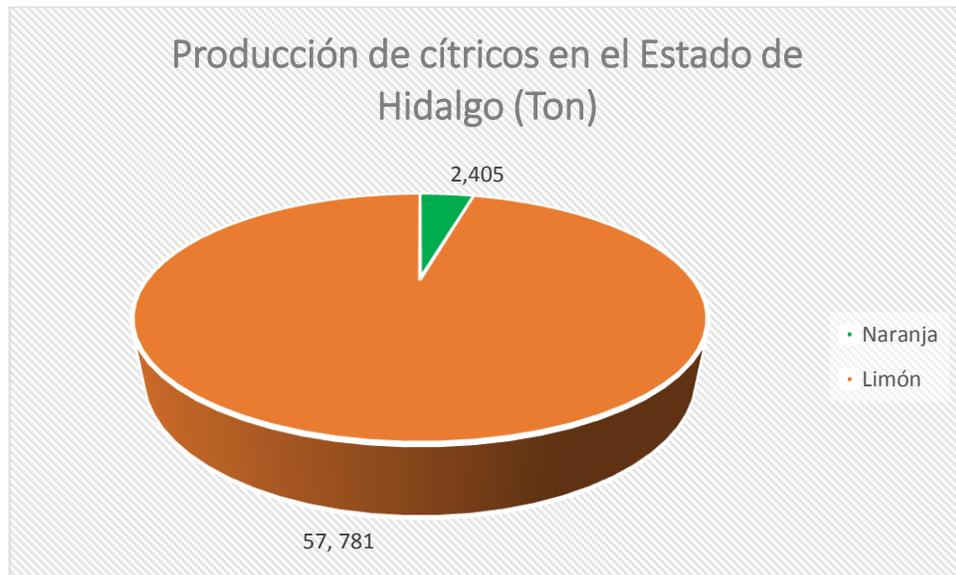


Figura 6. Producción de cítricos (*Citrus aurantifolia* Christm, *Citrus sinensis*) (SIAP, 2016).

2.4 Enfermedades de los cítricos

Agrios (2006) considera que para quienes se relacionan directamente con los cultivos, así como sus procesos de producción y distribución, el buen desarrollo de las plantas es de gran importancia ya que la manufactura de la materia prima vegetal determina la subsistencia de los agricultores y trabajadores de las industrias; sostiene además que la sanidad vegetal concierne a todos los individuos no solo a los productores.

En México existen áreas cítricas en las cuales normalmente se cultiva bajo una serie de problemas fitopatológicos que merman la producción; además, estas áreas cítricas bajo la presión de plagas y enfermedades cuarentenarias se ven seriamente amenazadas. Por lo anterior, en México se han realizado diversos trabajos que han logrado describir varios patógenos y plagas (Durán y Moreno (2000). Algunas problemáticas son ocasionadas por diferentes tipos de organismos vivos como bacterias, fitoplasmas, hongos, nematodos, virus y viroides (Agrios, 2006). En el Cuadro 1 se muestran las principales problemáticas de los cítricos, así como los agentes patogénicos descritos.

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

Agente causal	Síntoma	Alteraciones histológicas	Enfermedad que causan	Referencia
Closterovirus Citrus Tristeza Virus.	Colapso rápido, picado, amarillamiento de plántulas	Formación de goma en los vasos conductores.	Virus de la Tristeza de los Cítricos.	(Loeza-Kuk <i>et al.</i> , 2005).
<i>Citrus leprosis virus.</i>	Debilitamiento de la planta, caída prematura de la fruta y, cuando la planta presenta una infección intensa, la enfermedad puede conducir a la muerte de la planta.	Hiperplasia e hipertrofia en células del parénquima esponjoso.	Leprosis de los cítricos	(Marques <i>et al.</i> , 2010).
Ca. L asiaticus Ca. L. africanus Ca. L americanus Ca. Fitoplasma asteris	Moteado difuso de forma irregular en el dosel del árbol, hojas y frutos pequeños, amargos y madurez irregular, amarillamiento de brotes, caída de hojas,	Deformacion del floema, actividad cambial anormal y acumulación de almidones en las células con actividad parenquimatosas.	Huanglongbing (HLB)	(Etxeberria <i>et al.</i> , 2009) (Johnson <i>et al.</i> , 2014)

	acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, pérdida de raíces, caída prematura de frutos, taponado de venas.			(McCollum <i>et al.</i> , 2016) (SENASICA, 2012)
Amarillamiento letal de la lima persa	Aclaramiento de nervaduras, amarillamiento foliar, enanismo.	Alta concentración de cristales y polifenoles en parénquima cortical, hiperplasia y colapso en floema.	Amarillamiento letal de la lima persa	(Uc-Vázquez <i>et al.</i> , 2005).
Blight de los cítricos	Marchitez permanente, hojas y frutos pequeños, floración tardía.	Tapones de calosa y goma en el xilema de forma filamentosa y amorfa.	Blight de los cítricos	(Lindbeck y Brlansky, 2000)

Citrus Exocortis Viroid (CEVd)	Escamación y rajaduras en la corteza del tronco y enanismo.	Oscurecimiento de las células del parénquima, hiperplasia e hipertrofia, muerte celular en nervadura de las hojas.	Virus de exocortis de los cítricos	(Gómez, 1998)
Citrus cachexia viroid	Enanismo, picado del tallo, clorosis foliar intensa.	Depósito de goma y decoloración en el floema.	Caquexia-xiloporosis de los cítricos	
<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. pauca	Clorosis foliar, manchas color café claro en el envés, frutos de tamaño pequeño.	Formación de tílides, gomas y masas bacterianas en los tejidos afectados.	Clorosis variegada de los cítricos	(Rossetti <i>et al.</i> , 1997).
<i>Candidatus</i> Fitoplasma	Amarillamiento, filodia, virescencia, enanismo.	Hiperplasia e hipertrofia en tubos cribosos, disminución de almidón en el floema.	Fitoplasmas	(Siddique <i>et al.</i> , 1998).

<i>Citrus Porosis</i> <i>Ophiovirus</i>	Descortezamiento del tronco y ramas, manchas anulares en las hojas.	Acumulación de goma en el xilema cercano al cambium vascular.	Psoriasis de los cítricos	(Wallace, 1978)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> subsp. citri	Lesiones circulares e irregulares dependiendo de la edad de estas, halo amarillo en hojas.		Cáncro de los cítricos	(Scattolini <i>et al.</i> , 2007)

2.5 Huanglongbing

El HLB corresponde a una enfermedad sistémica transmitida por insectos (*Diaphorina citri* y *Trioza eritreae*), aunque es posible su transmisión por medio de injertos con un periodo de latencia prolongada (Halbert y Manjunath, 2004; Manjunath *et al.*, 2008). Es causada por una bacteria limitada al floema, en el cual reside en forma inequitativa (Coletta-Filho *et al.*, 2010; Halbert y Manjunath, 2004). Inicialmente descrita por Garnier *et al.* (1984), es una de las enfermedades más importantes en los cítricos de los cuales amenaza la producción sostenible en el mundo (Bassanezi *et al.*, 2011 Flores-sánchez *et al.*, 2015; Salcedo, 2010; Wang y Trivedi, 2013); es una enfermedad bacteriana que provoca grandes pérdidas en los cultivos considerándose una de las más devastadoras (Roistacher, 1996; Halbert y Manjunath, 2004; Bové, 2006). El Huanglongbing se reportó por primera vez en China a finales del siglo XIX (Yamamoto *et al.*, 2006; Zhao, 1982), en 1920 se detectó en Taiwan y las islas Filipinas (Otake, 1990 y en ese mismo año es detectada una nueva especie de *Candidatus* en Sudáfrica (*Ca. L. africanus*) (Van Der Merwe y Andersen, 1937).

En un principio el HLB fue llamado enfermedad del enverdecimiento de los cítricos debido a su severidad y ha demostrado ser un verdadero problema en cítricos de Asia, África y la península de Arabia, así también en la islas Mauricio, Reunión y Madagascar (Bastianel *et al.*, 2005).

En Asia se calcula que hay unos 50 millones de árboles infectados; de 1960 a 1970 murieron alrededor de 3 millones de árboles en Indonesia, aproximadamente 10 millones en África del Sur, y en Arabia Saudita todos los naranjos y mandarinos murieron como consecuencia del HLB (Duran y Moreno, 2000).

En México la enfermedad del Huanglongbing fue reportada por primera vez en julio del año 2009 (Trujillo, 2010) la cual se presentó en la localidad de El Cuyo, municipio de Tizimín, en el Estado de Yucatán (SENASICA, 2009). La enfermedad se dispersó rápidamente y fue reportada posteriormente en los

estados de Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche y Colima (NAPPO, 2009). La capacidad de dispersión del agente causal logró ubicar al HLB en 15 de los 23 Estados caracterizados por la producción de cítricos en la República Mexicana (SAGARPA, 2012).

Actualmente no se conoce cura para los árboles infectados con el HLB (Gottwald, *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015) mismos que rápidamente se vuelven improductivos y, finalmente mueren entre tres y ocho años después de que aparecen los síntomas (Bové, 2006). Algunos estudios han sugerido niveles de tolerancia a la bacteria por parte de algunas especies o variedades de cítricos; Folimonova *et al.* (2009) menciona que en general mandarinas, naranjas dulces y pomelos son más susceptibles al HLB, y que por el contrario naranjas agrias, limones, limas y citranges presentan menor susceptibilidad. Por otro lado, Stover *et al.* (2010) señala que el género *Poncirus trifoliata* es capaz de tolerar y/o suprimir a *Candidatus Liberibacter* en forma significativa.

2.6 Organismos asociados al HLB

2.6.1 *Ca.Liberibacter* spp.

La enfermedad del HLB ha sido asociada a *Ca. Liberibacter* spp., bacterias Gram-Negativas limitadas específicamente al floema, aunque los postulados de Koch no han podido ser comprobados debido a la dificultad que presenta la bacteria para ser cultivada (Bové, 2006), esta proteobacteria recibió el estado provisional como *Candidatus* (Jagoueix *et al.*, 1996). Estas cepas bacterianas se adaptan eventualmente a hospedantes considerados en un inicio como resistentes por lo que adquiere un amplio rango de prevalencia e infección en estas plantas (Gottwald *et al.*, 2007).

La presencia del HLB (*Ca. Liberibacter asiaticus*) fue reportada por primera vez en el Continente Americano en marzo de 2004 en las proximidades de la ciudad Araraquara, Sao Paulo, Brasil (Coletta-Filho *et al.*, 2004), en ese mismo municipio

fue comprobada la presencia de una nueva especie de *Candidatus, Ca. Liberibacter americanus* (Teixeira *et al.*, 2005b).

De las tres especies que causan la enfermedad del HLB, *Ca. Liberibacter asiaticus* es la más virulenta y con la distribución más amplia a nivel mundial (Ramadugu *et al.*, 2016), además presenta menor sensibilidad al calor y tiene la capacidad de infectar a temperaturas de hasta 35 a 37°C por periodos prolongados (Bové, 2006; Teixeira *et al.* 2005) pero incapaz de hacerlo a 38°C, mientras que *Ca Liberibacter americanus* no puede infectar a temperaturas superiores a 30°C siendo su rango óptimo 24 a 30°C (Lopes *et al.*, 2009). *Ca. Liberibacter americanus* por su parte muestra mayor severidad en áreas frescas (20 a 25°C) con humedades menores a 25% y su presencia en altitudes menores a 200 msnm es casi nula (Teixeira *et al.*, 2005a). Por lo anterior Lopes *et al.* (2009) mencionan que es probable la identificación de la especie incidente por medio de las temperaturas reinantes en el área infectada.

2.6.1.1 Taxonomía de *Ca. Liberibacter* spp.

Reino: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: α Proteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Ca. Liberibacter*

Especie: *Ca. Liberibacter asiaticus* (Jagoueix *et al.*, 1994)

Ca. Liberibacter americanus

(Teixeira *et al.*, 2005b)

Ca. Liberibacter africanus

(Jagoueix *et al.*, 1994)

El estudio de la bacteria es difícil ya que debido a su naturaleza las inoculaciones y transmisiones requieren de material infectado como fuente de inóculo, aunque la bacteria puede transmitirse de planta a planta por medio del insecto vector (Psílido Asiático de los Cítricos: PAC) (Halbert y Manjunath, 2004; Manjunath *et al.*, 2008), dodder (*Cuscuta pentagona*) (Garnier y Bové, 1984) o bien por injerto (Coletta-Filho *et al.*, 2010; Lopes y Frare, 2008).

2.6.2 Fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias con un genoma pequeño carentes de pared celular (Bové *et al.*, 2003; Christensen *et al.*, 2005), en cambio poseen una membrana simple como cubierta (Bertaccini *et al.*, 2005). Son habitantes limitados al floema de plantas infectadas, es en ese sitio donde son capaces de atravesar los poros de las células cribosas para distribuirse a toda la planta (Whitcomb y Tully, 1989), asociados a más de 700 enfermedades en cientos de especies de plantas (Lee *et al.*, 2000; McCoy *et al.* 1989). Actualmente se consideran un clado monofilético de los Mollicutes (Lim y Sears, 1992) y son transmitidos por insectos vectores de las familias Cicadellidae (chicharritas/saltamontes) y Fulgoridae (fulgóricos) (Gasparich, 2010).

2.6.2.1 Clasificación taxonómica de fitoplasmas

En un principio, los fitoplasmas fueron clasificados de acuerdo a sus propiedades biológicas y, con base en estas características, fueron clasificados en tres grupos: agentes de decaimiento, proliferación y finalmente virescencia (Cervantes-Diaz *et al.*, 2004). El desarrollo de técnicas moleculares han permitido detectar eficazmente un gran número de fitoplasmas, además el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) facilitan el estudio de las interrelaciones genéticas entre los fitoplasmas (Davis y Sinclair, 1998; IRPCM, 2004), de acuerdo a estos la clasificación taxonómica de los fitoplasmas es la siguiente:

Super reino: Bacteria

Filum : Tenericutes

Clase: Mollicutes

Orden: Acholeplasmatales

Familia: Acholeplasmataceae

Genero: *Ca. Phytoplasma*

En la actualidad los fitoplasmas han sido clasificados en grupos de acuerdo a los análisis de RFLPs, que además han coincidido con los análisis filogenéticos y los análisis de secuencias (Wei *et al.*, 2007) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de los fitoplasmas (Wei *et al.*, 2007; Velasquez-Valle *et al.*, 2014).

Grupo Sr	Cepa	Especies Candidatas	Número de acceso GenBank	Referencia
I-A	Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AYWB) <i>rrnA</i>	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	NC_007716	Bai <i>et al.</i> (2006)
I-A	Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AYWB) <i>rrnB</i>	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	NC_007716	Bai <i>et al.</i> (2006)
I-B	Onion yellows phytoplasma mild strain (OY-M) <i>rrnA</i> (HLB-La Paz, Mex.)	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	NC_005303	Oshima <i>et al.</i> (2004)
I-B	Onion yellows phytoplasma mild strain (OY-M) <i>rrnB</i>	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	NC_005303	Oshima <i>et al.</i> (2004)
I-B	' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> '	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	M30790	Lee <i>et al.</i> (2004a)
I-C	Clover phyllody phytoplasma strain CPh	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	AF222065	2000 (GenBank submission)
I-D	Aster yellows phytoplasma strain PaWB	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	AY265206	2003 (GenBank submission)
I-E	Blueberry stunt phytoplasma strain BBS3	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	AY265213	2003 (GenBank submission)
I-F	Aster yellows phytoplasma strain ACLR-AY	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	AY265211	2003 (GenBank submission)
II-A	Peanut witches'-broom phytoplasma		L33765	Gundersen <i>et al.</i> (1994)

II-B	Lime	Ca. <i>Phytoplasma aurantifolia</i>	U15442	Zreik <i>et al.</i> (1995)
II-C	Cactus witches-broom phytoplasma		AJ293216	Cai <i>et al.</i> (2002)
II-D	'Papaya yellow crinkle australasiae'	Ca. <i>Phytoplasma australasiae</i>	Y10097	White <i>et al.</i> (1998)
III-A	Western X-disease phytoplasma	Ca. <i>Phytoplasma prumi</i>	L04682	1999 (GenBank submission)
III-B	Clover yellow edge phytoplasma		AF189288	1999 (GenBank submission)
IV-A	Coconut lethal yellowing phytoplasma (LYJ-C8)	Ca. <i>Phytoplasma palme</i>	AF498307	Harrison <i>et al.</i> (2002a)
IV-B	<i>Phytoplasma</i> sp. LfY5(PE65)-Oaxaca	Ca. <i>Phytoplasma palme</i>	AF500334	Harrison <i>et al.</i> (2002b)
IV-D	<i>Carludovica palmata</i> leaf yellowing phytoplasma	Ca. <i>Phytoplasma palme</i>	AF237615	Cordova <i>et al.</i> (2000)
V-A	El yellows	Ca. <i>Phytoplasma ulmi</i>	AY197655	Lee <i>et al.</i> (2004b)
V-B	'Ca. <i>Phytoplasma ziziphi</i> ' strain JWB-G1	Ca. <i>Phytoplasma ziziohi</i>	AB052876	Jung <i>et al.</i> (2003a)
V-C	Alder yellows phytoplasma strain ALY882	Ca. <i>Phytoplasma vitis</i>	AY197642	Lee <i>et al.</i> (2004b)
V-G	'Ca. <i>Phytoplasma ziziphi</i> '-related strain JWB-Kor1		AB052879	Jung <i>et al.</i> (2003a)
VI-A	Clover proliferation	Ca. <i>Phytoplasma trifolii</i>	AY390261	Hiruki y Wang (2004)

VII-A	Ash yellows	Ca. Phytoplasma fraxini	AF092209	Griffiths <i>et al.</i> (1999)
VIII-A	Loofah witches'-broom phytoplasma	Ca. Phytoplasma luffae	AF353090	2001 (GenBank submission)
IX-A	Pigeon pea witches'-broom phytoplasma		AF248957	2000 (GenBank submission)
IX-D	Almond witches broom	Ca. Phytoplasma phoenicium	AF515636	Verdin <i>et al.</i> (2003)
X-A	Apple proliferation	Ca. Phytoplasma maliu	AJ542541	Seemüller y Schneider (2004)
X-C	Pear decline	Ca. Phytoplasma pyriu	AJ542543	Seemüller y Schneider (2004)
X-D	Spartium witches broom	Ca. Phytoplasma spartii	X92869	Marccone <i>et al.</i> (2004a)
X-F	European Stone fruit yellowRice	Ca. Phytoplasma pronorum	AJ542544	Seemüller y Schneider (2004)
XI-A	Rice yellows dwarf	Ca. Phytoplasma oryzae	AB052873	Jung <i>et al.</i> (2003b)
XII-A	Stolbur	Ca. Phytoplasma solani	AJ964960	Firrao <i>et al.</i> (2005) (Incidental citation)
XII-B	Australian grapevine yellows	Ca. Phytoplasma australiense	L76865	Davis <i>et al.</i> (1997)
XII-C	Strawberry lethal yellows phytoplasma	Strawberry lethal yellows phytoplasma	AJ243045	Padovan <i>et al.</i> (2000b)
XII-D	Japanese hydrangea phyllody	Ca. Phytoplasma japonicum	AB010425	Sawayanagi <i>et al.</i> (1999)
XII-E	Strawberry yellows	Ca. Phytoplasma fragariac	DQ086423	Valiunas <i>et al.</i> (2006)
XIII-A	Mexican periwinkle virescence phytoplasma		AF248960	2000 (GenBank submission)

XIV-A	Bermudagrass whittleleaf	Ca. <i>Phytoplasma cynodontis</i>	AJ550984	Marcone <i>et al.</i> (2004b)
XV-A	Hibiscus witches broom	Ca. <i>Phytoplasma brasiliense</i>	AF147708	Montano <i>et al.</i> (2001)
XVI-A	Sugar cane yellows leaf	Ca. <i>Phytoplasma graminis</i>	AY725228	Arocha <i>et al.</i> (2005)
XVII-A	Papaya bunchy top	Ca. <i>Phytoplasma caricae</i>	AY725234	Arocha <i>et al.</i> (2005)
VIII-A	Potato purple top wilt	Ca. <i>Phytoplasma americanum</i>	DQ174122	Lee <i>et al.</i> (2006)
XIX-A	Chesnut witches broom	Ca. <i>Phytoplasma castaneae</i>	AB054986	Jung <i>et al.</i> (2002)
XX-A	Buckthorn witches broom	Ca. <i>Phytoplasma rhamnii</i>	X76431	Marcone <i>et al.</i> (2004a)
XXI-A	Pine shoor proliferation	Ca. <i>Phytoplasma pini</i>	AJ632155	Schneider <i>et al.</i> (2005)
XXII-A	Coconut lethal decline	Ca. <i>Phytoplasma cocosnigeriae</i>	Y14175	Tymon <i>et al.</i> (1998)
XXIII-A	Buckland valley grapevine yellows phytoplasma		AY083605	Constable <i>et al.</i> (2002)
XXIV-A	Sorghum bunchy shoot phytoplasma		AF509322	Blanche <i>et al.</i> (2003)
XXV-A	Weeping tea witches'-broom phytoplasma		AF521672	2002 (GenBank submission)
XXVI-A	Sugar cane phytoplasma D3T1		AJ539179	2003 (GenBank submission)
XXVII-A	Sugar cane phytoplasma D3T2		AJ539180	2003 (GenBank submission)
XXVIII-A	Derbid phytoplasma		AY744945	2004 (GenBank submission)
XXIX-A	Allocasuarina mulleriana phytoplasma	<i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i>	AY135523	
XXX-A	Tanzania lechal decline	<i>Ca. Phytoplasma cocosnigeriae</i>	X80117	

2.6.2.2 Fitoplasmas causando síntomas del HLB

Hasta hace poco el HLB era asociado solo con las bacterias *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus* y *Ca. Liberibacter americanus* (Bové, 2006); sin embargo, en 2007 se identificaron árboles de naranja con las manchas moteadas características de una infección por *Ca. Liberibacter* (Figura 7); sin embargo, fueron negativas a la presencia de alguna de las especies del patógeno; análisis sobre las muestras sintomáticas dieron como resultado la presencia de fitoplasmas para esas muestras sintomáticas al HLB (Arratia-Castro *et al.*, 2014). Los fitoplasmas son un patógeno cercanamente relacionado al fitoplasma guandul escoba de bruja de acuerdo a su secuencia 16S RNA (Teixeira *et al.*, 2008). Chen *et al.* (2009) ha reportado la presencia del grupo *Ca. Fitoplasma asteris* en muestras de cítricos con el moteado y amarillamiento típicos en plantas sintomáticas con HLB en Guandong, China, de igual manera se reportaron en Brasil *Ca. Fitoplasma phoenicium* y *Ca. Fitoplasma aurantifolia* también en China (Chen *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2008); por otro lado, en México se identificaron dos cepas distintas de fitoplasmas causantes del HLB pertenecientes a los subgrupos 16SRI-B y 16SRI-S del grupo del amarillamiento del áster (16SRI) '*Ca. Fitoplasma asteris*' (Arratia-Castro *et al.*, 2014). Ambos subgrupos además son patógenos de otros cultivos, el 16SRI-S de amplia distribución en México se encontró en cultivo de chile en Sinaloa y Guanajuato (Santos-Cervantes *et al.*, 2008) y en cultivos de papa en Sinaloa, Guanajuato, Baja California, Coahuila y Jalisco (Santos-Cervantes *et al.*, 2010) mientras que 16SRI-B ha sido detectado en plantas de tomate en la Península de Baja California (Holguín-Peña *et al.*, 2007).



Figura 7. Limón persa con presencia de síntomas de HLB causado por fitoplasmas (Espinoza, 2017).

2.7 Sintomatología de HLB

Seguida a la infección de la planta por *Ca. Liberibacter* y dependiendo de la edad de esta al ser inoculada pueden pasar meses o incluso años antes de que los síntomas de la enfermedad del HLB sean visibles, INIFAP (2012) menciona que en árboles jóvenes los síntomas aparecen entre 6 y 12 meses después de la infección sin embargo, estos árboles asintomáticos forman una eficaz fuente de inóculo que contribuye a dificultar el manejo de la enfermedad (McCollum *et al.*, 2016) hasta que son detectados y eliminados, o mueren por efecto de la infección entre tres y ocho años después del inicio de la misma (Bové, 2006).

Actualmente el HLB puede ser diagnosticado mediante la sintomatología que muestran las plantas infectadas y posteriormente confirmadas por medio de amplificación de DNA con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Chen *et al.*, 2009). El diagnóstico sintomático tiene un inconveniente, la inespecificidad de los síntomas del HLB hacen que las identificaciones iniciales se dificulten debido al parecido que tienen con deficiencias nutricionales y otras enfermedades, así mismo, bajas concentraciones bacterianas y su distribución en el hospedero hacen más difícil una detección consistente (Li *et al.*, 2007).

Una vez que la bacteria ha crecido en el floema del hospedero ocasiona desórdenes en el mismo, los primeros síntomas foliares visibles son manchas moteadas (Figura 8), amarillamiento de brotes y caída de hojas (Jhonson *et al.*, 2014), acorchamiento y engrosamiento de nervaduras (Figura 9)(SENASICA, 2012) frutos de menor tamaño y frecuentemente asimétricos (McCollum *et al.*, 2016), además hojas pequeñas, obstrucción (taponado) de venas, malformación y decoloración de los frutos, pérdida de raíces, caída prematura de la fruta y eventualmente la muerte del árbol (Duan *et al.*, 2009; Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007; Wang y Trivedi, 2013).



Figura 8. A) Sintomatología del HLB en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm), moteado asimétrico (izquierda) (Espinoza, 2017), B) acorchamiento de nervaduras (derecha) (CESAVETAM, 2013)

Los síntomas como maduración irregular en frutos que comienza en la parte apical del mismo solo se han presentado en limón mexicano (Robles *et al.*, 2010), asimismo, es posible encontrar semillas color café oscuro de tamaño pequeño y con forma irregular (Bové, 2006; Robles, 2008).

En Brasil y Florida los síntomas son más severos en naranjo dulce y mandarina, sin embargo en México los cítricos agrios como limón persa, limón mexicano, limón volkameriano y naranja agria presentan síntomas más severos que los que se presentan naranjas dulces y mandarinas (Esquivel-Chávez *et al.*, 2010)

2.8 El papel de los insectos como vectores de fitopatógenos

En la actualidad el desarrollo de los cultivos se ve afectado en gran medida por la acción de los insectos, las pérdidas que generan en los diversos cultivos son cuantiosas como en el maíz que puede disminuir su rendimiento de un 80 a un 100% por acción de *Spodoptera frugiperda* (Del Rincón et al., 2006) o *Compsus viridivittatus* que causa pérdidas del orden de 20 y 30% en cítricos (ICA, 2005). Estos efectos negativos se maximizan cuando los insectos afectan de manera indirecta fungiendo como vectores de parásitos o patógenos (Cardona, 2010). Por su parte, algunos fitopatógenos requieren para su dispersión de medios que les permitan su diseminación, el pasar de una planta enferma a una sana, evitando de esta manera el riesgo de su extinción, por ello en algunos casos poseen una forma única de moverse entre hospederos (MacKenzie, 1985). Los insectos que frecuentan a hospederos de patógenos o se alimentan del floema de este, se infectan y tienen la capacidad de transmitir estos agentes patogénicos tales como hongos, virus, bacterias, nematodos, espiroplasmas, rikettsias y micoplasmas, aunque es más importante en el caso de virus, espiroplasmas y de fitoplasmas (Larios, 1987).

2.9 Insecto vector de *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus*

2.9.1 Taxonomía *Diaphorina citri* Kuwayama

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Clase Insecta

Orden Hemiptera

Suborden Sternorrhyncha

Superfamilia Psylloidea

Familia Psyllidae

Género *Diaphorina*

Especie *Citri*

Clasificador Kuwayama

Nombre común: Psílido Asiático de los
cítricos (García, 2009)

2.9.2 El Psílido Asiático de los Cítricos

El Psílido Asiático de los Cítricos (PAC) '*Diaphorina citri*' se considera como la plaga de mayor importancia de los cítricos a nivel mundial, sin embargo el mayor peligro radica en su capacidad de transmitir las bacterias *Ca. Liberibacter* (Halbert y Manjunath, 2004) para las especies asiática y americana, *Diaphorina citri* (Kuwayama) y *Trioza eritreae* (Del Guercio) para la especie africana (Garnier *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2007; Hall, 2008). El comportamiento del vector el responsable directo de la amplia distribución de la bacteria en el mundo (Teixeira *et al.*, 2005a).

Trioza eritreae posee la característica de ser sensible al calor y clima seco viéndose favorecido por temperaturas de 20 a 24°C con altitudes superiores a los 500 msnm (Garnier *et al.*, 2000).

El rango de temperatura óptima el desarrollo de *D. citri* está entre los 24 y 28°C, temperaturas constantes de 16°C son desfavorables para los adultos (Liu y Tsai, 2000; Fung y Chen, 2006a), posee un comportamiento típico, cuando las hojas son movidas, están sobrepobladas o deficientes condiciones para su desarrollo efectúan un vuelo de 3 a 5 m; en algunas ocasiones pueden alcanzar alturas de 5 a 7 m, razón por la cual pueden ser arrastrados por las corrientes de aire a distancias que van desde los 0,5 a 4 km o más (Fung y Chen, 2006b; Hall *et al.*, 2008) representando un alto riesgo para la diseminación de la enfermedad hacia cultivos vecinos libres de la misma.

Un efecto directo de los psílicos sobre el hospedero, sean ninfas o adultos, es la alimentación sobre brotes tiernos inyectando una toxina que ocasiona la malformación de los mismos brotes y hojas (Liu y Tsai, 2000), además, extraen gran cantidad de savia lo cual provoca el desarrollo de fumagina que interfiere con la actividad fotosintética de la planta, en condiciones de alta incidencia pueden causar abscisión en hojas o brotes terminales (Tsai *et al.* 2002, Halbert y Manjunath 2004).

El psílido utiliza como hospederos a diversas especies de rutáceas, sin embargo, muestra preferencia por *Murraya paniculata* y *Citrus aurantifolia* para alimentación y reproducción (Aubert y Hua, 1990), la disponibilidad de brotes de *M. paniculata* es un factor importante en la presencia de altas poblaciones de psílicos aún en ausencia de brotes en huertos comerciales (Ortega-Arenas *et al.*, 2013). Existen además otras plantas hospederas del PAC que son sujetas de control fitosanitario como lo dicta la NOM-EM-043-FITO-2009, algunas de las cuales se registran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Plantas hospederas de *Diaphorina citri* (De La Federación, 2009).

Nombre Científico	Nombre Común
<i>Bergera (Murraya) koenigii</i> (L.)	Limonaria
<i>Citrus reticulata</i> X <i>C. paradisi</i>	Tangüelos
<i>Citrus reticulata</i> X <i>C. sinensis</i>	Tangors
Citranges (<i>Poncirus</i> X <i>C. sinensis</i>)	Citranges
<i>Citrus amblycarpa</i> Ochse	Mandarino Amblycarpa
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	Limón Mexicano
<i>Citrus aurantium</i> L.	Naranja Agrio
<i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck	Pomelo
<i>Citrus jambhiri</i> Lushington	Limón Rugoso
<i>Citrus junos</i> Sieb. ex Tanaka	Yuzu
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Limón Persa
<i>Citrus limetta</i> Risso	Lima de “chiche”
<i>Citrus limettioides</i>	Lima dulce”
<i>Citrus limon</i> (L.) Burm.	Limón
<i>Citrus macrophylla</i>	Limón Macrofila
<i>Citrus madurensis</i> (= X <i>Citrofortunella microparpa</i>)	Calamondin
<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack	limonaria

Actualmente *Diaphorina citri* se encuentra establecida en todas las zonas productoras de cítricos en Centro y Sudamérica (Cermeli *et al.* 2000, Halbert y Núñez 2004, Villalobos *et al.* 2004), Florida en E.U. (Halbert y Manjunath, 2004; Halbert y Núñez, 2004) y México (Thomas, 2002; SENASICA, 2012).

En México el PAC fue reportado por primera vez en el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo (Thomas, 2002), su dispersión hacia las áreas citrícolas fue rápida, ya que, en junio del año 2008 fue detectado en Tijuana, Baja California que marcó la invasión total a la citricultura nacional (Flores-Sánchez *et al.*, 2015).

Teóricamente tanto *D. citri* como *T. erytrae* pueden adquirir la bacteria tras alimentarse de 15 a 30 min y alcanzar una efectividad del 100% en adquisición transcurrida una hora en alimentación tras lo cual permanecen infectivos durante toda su vida (Manjunath *et al.*, 2008).

2.10 Insecto vector de *Ca. Liberibacter africanus*

2.10.1 Taxonomía de *Trioza erytrae*

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Clase Insecta

Orden Hemiptera

Suborden Sternorrhyncha

Superfamilia Psylloidea

Familia Triozidae

Género *Trioza*

Especie *erytrae* (Del Guercio, 1918)

Nombre común: Psílido Africano de los Cítricos

2.10.2 El Psílido Africano de los Cítricos

Trioza erytrae, de origen africano, es un psílido descrito originalmente como mosca blanca, *Aleurodes erytrae* (Del Guercio, 1918). Las características morfológicas son muy diferentes al Psílido Asiático de los Cítricos, *T. erytrae* tiene las alas transparentes a diferencia de *D. citri*, sus ninfas se encuentran individualmente en agallas formadas en el envés de las hojas. La distribución del psílido africano de los cítricos se ha extendido desde el sur del Sahara hasta

la Península Arábiga y los archipiélagos alrededor del continente africano (Reunión, Madeira, Mauricio y Canarias) (Monzó *et al.*, 2015).

Otra característica diferencial entre *D. citri* y *T. erytrae* es que esta última adopta una posición con el abdomen elevado formando un ángulo de 35° con respecto a la superficie de la hoja mientras que la primera forma un ángulo de 45° (Passos-Carvalho y Aguiar, 1997) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diferencias entre *D. citri* y *T. erytrae*.

<i>Diaphorina citri</i>	<i>Trioza erytrae</i>
Ovoposición en los tallos de los brotes terminales.	Ovoposición en la lámina foliar.
Desarrollo ninfal en tallos de los brotes terminales y peciolos.	Desarrollo ninfal en las hojas.
No produce agallas y los síntomas generados son distorsión en las hojas.	Produce agallas abiertas en el envés que se proyectan en el haz.
Los adultos de esta especie forman un ángulo de 45° al alimentarse.	El ángulo que forman al alimentarse es de 35°.

El ciclo de vida de cada generación puede variar entre 43 a 115 días de acuerdo a las condiciones ambientales y disponibilidad de alimento, con un periodo de pre-ovoposición de 3 a 7 días, incubación de huevos entre 6 y 15 días, un desarrollo ninfal de 17 a 43 días y una vida promedio en estado adulto de 17 a 50 días (Catling, 1973). *T. erytrae* sobrevive únicamente en hospederos de la familia Rutaceae, y principalmente del género *Citrus* (Padrón y Hernández, 2002).

Hasta hace poco *Trioza erythrae* había sido reportada únicamente en África; sin embargo, actualmente se mencionó su presencia en el norte de la Península Ibérica (Pérez-Otero *et al.*, 2015).

2.11 Vectores de *Ca. Fitoplasmas asteris*

Los fitoplasmas tienen como vectores a miembros de la superfamilia Membracoidea (Dietrich *et al.*, 2001) entre los cuales sobresale la familia *Cicadellidae*, comúnmente llamadas chicharritas o saltahojas.

2.12 Situación actual del HLB

Actualmente el HLB se encuentra ampliamente distribuido en 39 países alrededor del mundo, *Ca. Liberibacter africanus* se distribuye en África y Asia mientras que *Ca. Liberibacter americanus* se encuentra únicamente en Brasil (Figura 10).

El Psílido Asiático de los cítricos y *Ca. Liberibacter asiaticus* son los más frecuentes e importantes en las zonas citrícolas afectadas con HLB (Bové, 2006). Se encuentra distribuido en Asia, Sudamérica, así como en Centroamérica y Norteamérica (SIRVEF, 2017).

El HLB se encuentra presente en 435 municipios en 23 estados de la República Mexicana; 348 de ellos son considerados cítricos los cuales representan el 48% del total, el resto de los municipios con positivos cuentan únicamente con plantas de cítricos en áreas urbanas (Figura 11), así mismo, la presencia de la enfermedad en la superficie comercial Nacional (572, 000 has) es del 15% (SENASICA, 2017).

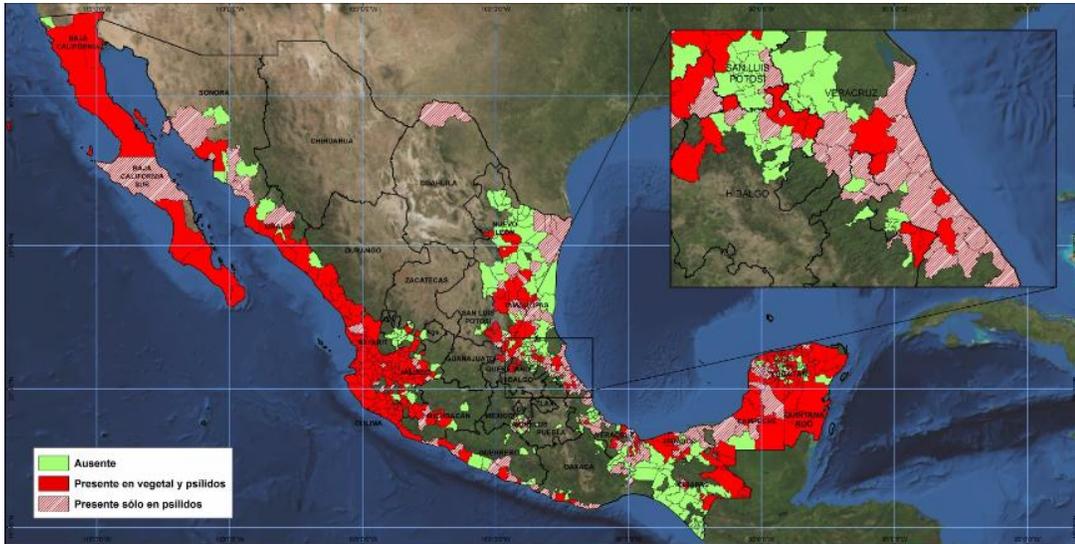


Figura 10. Situación actual del HLB en México con base en el monitoreo a nivel municipal acumulado hasta el mes de agosto de 2017 (SENASICA, 2017).

Desde su aparición en el 2015 el HLB se ha diseminado en la región Huasteca Hidalguense pese a las estrategias de contención aplicadas, y actualmente se presentan infecciones en 5 de los 10 municipios que la conforman, Orizatlán, Huejutla, Atlapexco y Huautla (SENASICA, 2017) (Figura 12).

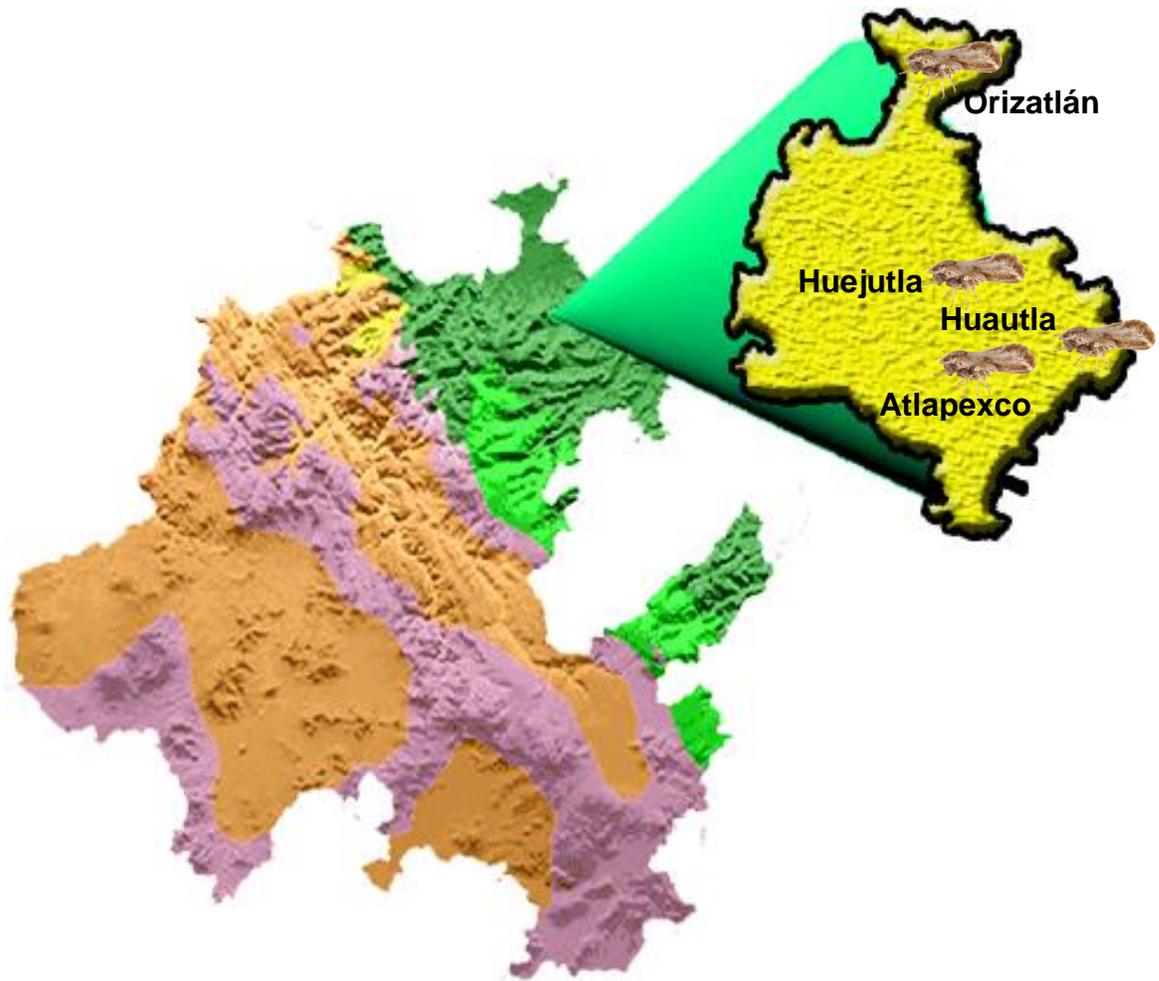


Figura 11. Presencia del HLB en la región Huasteca Hidalguense (SENASICA, 2017).

2.13 Manejo del HLB

La dificultad del control del HLB se debe a la poca resistencia que presentan al patógeno los cultivos de cítricos y a la efectividad de los métodos de control (Gottwald *et al.*, 2007; Bové, 2006).

El manejo de la enfermedad del HLB se basa en tres métodos principales, el control del insecto vector *Diaphorina citri* mediante métodos químicos y biológicos, la destrucción inmediata de los árboles infectados por *Ca. Liberibacter*, y finalmente el establecimiento de viveros certificados ya que es

esencial el desarrollo de material sano para el uso y conservación de los recursos genéticos de los cítricos (Carini *et al.*, 2001).

Desde la aparición de la enfermedad del Huanglongbing se desarrollaron estrategias para controlar su diseminación como la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-043-FITO-2009 que establece las medidas fitosanitarias para disminuir el riesgo de introducción y dispersión del patógeno (SENASICA, 2010).

En México se optó por un esquema de manejo regional del PAC para reducir la diseminación del Hlb, para ello se crearon 90 Áreas Regionales de Control (ARCO's) que se establecieron en áreas cítricas propensas a la aparición de brotes o epidemias por el impacto de los niveles poblacionales del PAC. El control del vector es realizado a través de productos químicos principalmente y en menor medida el control biológico (Pacheco *et al.*, 2012; Ruiz-Cancino *et al.*, 2008), sin embargo, el control químico tiene efectos secundarios como el desequilibrio ecológico y el desarrollo de resistencia de los insectos a los productos o bien, la aparición de plagas secundarias y efectos nocivos hacia enemigos naturales (Rodríguez-Palomera *et al.*, 2012).

Algunos de estos insecticidas como la abamectina e imidacloprid con aplicaciones al follaje proporcionan un control de hasta 90% de eficacia biológica en ninfas con veinte días de efectos residuales y el spiromesifen con hasta 14 días de residualidad y hasta un 88 % de eficacia (Sánchez, 2010).

El control biológico se ha abordado con la aplicación de hongos entomopatógenos como *Isaria javanica* y *Metarhizium anisopliae* en Campeche, Hidalgo, Nayarit, Quintana Roo y Yucatán (SENASICA, 2017), además de la liberación del parasitoide *Tamarixia radiata* para lo que México cuenta con un par de laboratorios de reproducción masiva que aseguran la liberación coordinada en diferentes áreas cítricas del país (Arredondo, 2013).

No se han encontrado evidencias de que los enemigos naturales de *D. citri* tales como *Chilocorus cacti* (L.), *Cycloneda anguinea* (L.), *Scymnus distinctus* Casey (Coleoptera: Coccinellidae), *Exochomus cubensis* Dimn, *Chrysopa* sp. (Neuroptera: Chrysopidae) y *Ocyptamus* sp. (Diptera: Syrphidae) tengan efecto directo sobre su dinámica poblacional (Ortega-Arenas *et al.*, 2013).

En la actualidad se han realizado tratamientos de calor controlados para curar la infección por HLB causado por *Ca. Liberibacter asiaticus*, para ello se usan exposiciones térmicas continuas a 40 o 42°C por 48 horas como mínimo, dando como resultado una significativa reducción de la bacteria o la eliminación de la misma en plántulas infectadas con HLB (Hoffman *et al.*, 2013).

En florida, por otro lado, se combinan programas de nutrición foliar con el control del vector para disminuir la propagación del HLB y reducir los efectos devastadores de la enfermedad (Gottwald, 2010).

2.14 Impacto del Huanglongbing

La enfermedad del Huanglongbing y su manejo ocasionan pérdidas en el rendimiento y valor de la producción (FAO, 2013); mientras la enfermedad progresa la planta se debilita, el rendimiento merma y la calidad del jugo es pobre lo que la vuelve económicamente no rentable; le bastan a la enfermedad de 7 a 10 años para acabar con un huerto debido a la rapidez con que se disemina (Gottwald, 2010).

Lugares como Florida, Estados Unidos, presentan huertos con una incidencia de infección del 100% desde su detección en 2005, lo cual manifiesta la rapidez con la que el HLB puede ocasionar daños, esto ha elevado los costos de producción del producto en un 50% por el manejo de la enfermedad y el vector (Gottwald *et al.*, 2007). De la misma manera, Magomere *et al.* (2009) menciona que en los cítricos en Kenia, las ramas tuvieron una mínima o nula producción comercial registrándose pérdidas del 100% en el rendimiento.

Ca. L. asiaticus y *Ca. L. americanus* fueron catalogados por E.U. como “agentes selectos” con potencial para el bioterrorismo debido a los efectos devastadores que presentan, además, en Europa se encuentran cuarentenados (Teixeira *et al.*, 2005a).

Las pérdidas reportadas en diversos escenarios mundiales reflejan el potencial de la enfermedad, en Brasil las pérdidas generadas por el patógeno en naranja dulce van desde un 17% a un 42% (Bassanezi *et al.*, 2009; Bassanezi *et al.*, 2011), en Colima, México el limón mexicano y limón persa, han sido severamente afectados al presentar pérdidas de un 62% y 17.3% respectivamente (Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2015). En México el impacto severo sería devastador para la economía nacional como se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Impacto estimado en México bajo un escenario de alta incidencia de HLB (SENASICA, 2017).

Establecimiento del patógeno	Pérdidas en producción	Pérdida de empleos (jornales)	Pérdida en materia prima para la industria	Pérdidas en generación de divisas
1 año	14%			
3 años	24%	12.2 millones		
5 años	38%	19.3 millones	2.77 millones	USD 106 millones (cítricos dulces) USD 51 millones (cítricos agrios).

Las pérdidas de peso, diámetro y grados brix atribuidas al HLB de cítricos cultivados en Brasil se calculan hasta en un 42% (Bassanezi *et al.*, 2009).

El HLB presenta un alto impacto epidémico y con incidencias que van desde niveles de un 26% en Brasil hasta el 100% en China; en México, particularmente en Colima, un 90% de incidencia final de árboles sintomáticos y el 100% de incidencia en el cultivo en plantaciones de limón mexicano de 4 a 10 años de edad (Gottwald, 2010; Robles-González *et al.*, 2013) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Epidemias de Huanglongbing en el mundo (Gottwald, 2010; Robles-González *et al.*, 2013).

Localización	Patosistema	Edad de plantación	Incidencia final de árboles sintomáticos
Sudáfrica	<i>L. africanus</i> / <i>T. eritreae</i>	5	98%
Isla Reunión	<i>L. asiaticus</i> / <i>D. citri</i>	7	96%
China (Guangxi)	<i>L. asiaticus</i> / <i>D. citri</i>	13	>98%
China (Guangxi)	<i>L. asiaticus</i> / <i>D. citri</i>	9	100%
Indonesia (Bali)	<i>L. asiaticus</i> / <i>D. citri</i>	1.75	76%
Vietnam	<i>L. asiaticus</i> / <i>D. citri</i>	3	96.3%
Brasil (Sao Paulo) (34 plantaciones)	<i>L. asiaticus</i> + <i>L. americana</i> / <i>D. citri</i>	3	26-37%
Florida (8 plantaciones)	<i>L. asiaticus</i> / <i>D. citri</i>	3-4	15.2-23.6%%

2.15 Referencias bibliográficas

- Agrios G. 2005. Fitopatología. segunda Edición. Grupo. Noriega. México DF México. 3.
- Agustí M. 2003. Citricultura. Mundi-Prensa. Madrid. ES.
- Arocha Y., M. Lopez, B. Pinol, M. Fernandez, B. Picornell, R. Almeida, I. Palenzuela, M. R. Wilson, P. Jones. 2005. 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**(6), 2451-2463.
- Arratia-Castro A. A., M. E. Santos-Cervantes, E. Fernández-Herrera, J. A. Chávez-Medina, G. L. Flores-Zamora, E. Camacho-Beltrán, J. Méndez-Lozano, N. E. Leyva-López. 2014. Occurrence of 'Candidatus Phytoplasma asteris' in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection*, **62**, 144-151.
- Arredondo B. H. 2013. Control Biológico: Componente de las Áreas Regionales de Control del PAC. *Memorias de la Reunión Nacional de Sanidad Vegetal. México, DF*, 16-19.
- Aubert B., X. Y. Hua. 1990. Monitoring flight activity of *Diaphorina citri* on citrus and *Murraya* canopies. *Rehabilitation of citrus industry in the Asia Pacific Region. Proc. 4th International Asia Pacific Conference on Citrus Rehabilitation, Chiang Mai, Thailand*. pp. 4-10.
- Bai X., J. Zhang, A. Ewing, S. A. Miller, A. J. Radek, D. V. Shevchenko, K. Tsukerman, T. Walunas, A. Lapidus, J. W. Campbell. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of bacteriology*, **188**(10), 3682-3696.
- Bassanezi R. B., L. H. Montesino, M. C. G. Gasparoto, A. Bergamin Filho, L. Amorim. 2011. Yield loss caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. *European journal of plant pathology*, **130**(4), 577-586.
- Bassanezi R. B., L. H. Montesino, E. S. Stuchi. 2009. Effects of Huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, **125**(4), 565.
- Bastianel C., M. Garnier-Semancik, J. Renaudin, J. M. Bové, S. Eveillard. 2005. Diversity of "Candidatus Liberibacter asiaticus," based on the omp gene sequence. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(11), 6473-6478.
- Bertaccini A., J. Fránová, S. Botti, D. Tabanelli. 2005. Molecular characterization of phytoplasmas in lilies with fasciation in the Czech Republic. *FEMS Microbiology Letters*, **249**(1), 79-85.
- Blanche K., L. Tran-Nguyen, K. Gibb. 2003. Detection, identification and significance of phytoplasmas in grasses in northern Australia. *Plant Pathology*, **52**(4), 505-512.

- Bové J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology*, 7-37.
- Bové J. M., J. Renaudin, C. Saillard, X. Foissac, M. Garnier. 2003. Spiroplasma citri, a plant pathogenic mollicute: relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. *Annual review of phytopathology*, **41**(1), 483-500.
- Cai H., H. R. Chen, F. Li, B. H. Kong. 2002. First report of a phytoplasma associated with cactus witches[']-broom in Yunnan (China). *Plant Pathology*, **51**(3), 394-394.
- Calabrese F. 1992. The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. *Proc Int Soc Citricult.* pp. 35-38.
- Cantú C. R. 1959. Monte-Morelos: Capital Naranjera de México. Archivo personal de Guillermo García Welsh en la Biblioteca de la Srita. Natalia García Jiménez. Montemorelos, Nuevo León. México.
- Cardona C. 2010. Insectos como vectores de enfermedades en palma de aceite. *Revista Palmas*, **31**(especial), 383-387.
- Carini F., F. De Pasquale, A. M. D'Onghia. 2001. Conservation strategies of citrus germplasm in vitro and in vivo. *Options Mediterraneennes. Serie B: Etudes et Recherches*, **33**, 67-72.
- Catling H. D. 1973. Notes on the biology of the South African citrus psylla, Trioza erytrae (Del Guercio)(Homoptera: Psyllidae). *Journal of the entomological Society of Southern Africa*, **36**(2), 299-306.
- Cermeli M., P. Morales, F. Godoy. 2000. Presencia del psílido asiático de los cítricos Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en Venezuela. *Resultados de investigación en frutales: cítricos, mango aguacate y musáceas*, 54.
- Cervantes-Diaz L., E. Zavaleta-Mejia, R. I. Rojas-Martinez, I. Alanis-Martinez, D. L. Ochoa-Martinez, P. Sanchez-Garcia. 2004. First report of phytoplasma occurrence in Alstroemeria sp. plants in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **22**(1), 134-139.
- CESAVETAM. 2013. Centro de Sanidad Vegetal Tampico. Campaña contra el Huanglongbing de los cítricos. *Recuperado de <http://cesavetam.wixsite.com/hlbtamps/sintomas-del-hlb>*.
- Coletta-Filho H., M. Targon, M. Takita, J. De Negri, J. Pompeu Jr, M. Machado, A. Do Amaral, G. Muller. 2004. First report of the causal agent of Huanglongbing ("Candidatus Liberibacter asiaticus") in Brazil. *Plant Disease*, **88**(12), 1382-1382.
- Coletta-Filho H. D., E. F. Carlos, K. C. S. Alves, M. A. R. Pereira, R. L. Boscariol-Camargo, A. A. De Souza, M. A. Machado. 2010. In planta multiplication and graft transmission of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' revealed by Real-Time PCR. *European journal of plant pathology*, **126**(1), 53-60.
- Constable F. E., J. R. Whiting, K. S. Gibb, R. H. Symons. 2002. A new grapevine yellows phytoplasma from the Buckland Valley of Victoria, Australia. *Vitis*, **41**(3), 147-153.
- Cordova I., C. Oropeza, H. Almeyda, N. A. Harrison. 2000. First report of a phytoplasma-associated leaf yellowing syndrome of palma jipi plants in southern Mexico. *Plant Disease*, **84**(7), 807-807.

- Chen J., X. Pu, X. Deng, S. Liu, H. Li, E. Civerolo. 2009. A phytoplasma related to 'Candidatus Phytoplasma asteris' detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, PR China. *Phytopathology*, **99**(3), 236-242.
- Christensen N. M., K. B. Axelsen, M. Nicolaisen, A. Schulz. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in plant science*, **10**(11), 526-535.
- Davis R., W. Sinclair. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, **88**(12), 1372-1376.
- Davis R. E., E. L. Dally, D. E. Gundersen, I.-M. Lee, N. Habili. 1997. "Candidatus Phytoplasma australiense," a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **47**(2), 262-269.
- De La Federación D. O. 2009. Diario oficial de la federación. *NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-047-FITO-2009, Por la que se establecen las acciones fitosanitarias para mitigar el riesgo de introducción y dispersión del Huanglongbing (HLB) de los cítricos (candidatus liberibacter spp.) en el territorio nacional.* .
- Del Castillo B. D. 1955. *Historia verdadera de la conquista de la Nueva España*. Espasa-Calpe.
- Del Guercio G. 1918. *Note ed osservazioni di entomologia agraria*. Istituto agricolo coloniale italiano.
- Del Rincón Castro M. C., J. Méndez Lozano, J. E. Ibarra. 2006. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomológica Mexicana*, **45**(2).
- Dietrich C., R. Rakitov, J. Holmes, W. Black. 2001. Phylogeny of the major lineages of Membracoidea (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, **18**(2), 293-305.
- Duan Y., L. Zhou, D. G. Hall, W. Li, H. Doddapaneni, H. Lin, L. Liu, C. M. Vahling, D. W. Gabriel, K. P. Williams. 2009. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **22**(8), 1011-1020.
- Duran N., P. Moreno. 2000. Huanglongbing (ex-Greening). *Enfermedades de los cítricos*. Editorial Mundi-Prensa. México.
- Espinoza C. 2017. Síntomas del HLB en limón persa (fotografía). Orizatlán, Hidalgo. Julio, 2017.
- Esquivel-Chávez F., G. Valdovinos-Ponce, G. Mora-Aguilera, R. Gómez-Jaimes, J. J. Velázquez-Monreal, J. I. López-Arrollo. 2010. Análisis histológico y epide-miológico del limón mexicano y limón persa asociados a síntomas del hlb (huanglongbing). En memoria del 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 99-103 p.

- Etxeberria E., P. Gonzalez, D. Achor, G. Albrigo. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **74**(1), 76-83.
- FAO. 2016. Apple fruit statistics 2015. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- FAO. 2013. Citrus: Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. Santiago de Chile.
- FAOSTAT. 2014. The State of Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Firrao G., K. Gibb, C. Stretten. 2005. Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus Phytoplasma'. *Journal of Plant pathology*, 249-263.
- Flores-Sánchez J. L., G. Mora-Aguilera, E. Loeza-Kuk, J. I. López-Arroyo, S. Domínguez-Monge, G. Acevedo-Sánchez, P. Robles-García. 2015. Yield loss caused by Candidatus Liberibacter asiaticus in Persian lime, in Yucatan Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **33**(2), 195-210.
- Folimonova S. Y., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, S. Gowda, W. O. Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology*, **99**(12), 1346-1354.
- Fung Y., C. Chen. 2006a. Effects of temperature and host plant on population parameters of the citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). *Formosan Entomol*, **26**, 109-123.
- Fung Y. C., C. N. Chen. 2006b. Effects of temperature and host plant on population parameters of the citrus psyllid (*Diaphorina citri* Kuwayama). *Formosan Entomol*, **26**, 109-123.
- García D. 2009. *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), vector de la bacteria que causa el Huanglongbing (HLB–Greening). *Buenos Aires (Argentina): Ministerio de la Producción, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*.
- García R., M. Asins, J. Forner, E. Carbonell. 1999. Genetic analysis of apomixis in Citrus and Poncirus by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **99**(3-4), 511-518.
- Garnier M., N. Danel, J. M. Bové. 1984. The greening organism is a gram negative bacterium. *Proc. 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. University of California, Riverside, CA*. pp. 115-124.
- Garnier M., S. Jagoueix-Eveillard, P. R. Cronje, H. F. Le Roux, J. M. Bove. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of 'Candidatus Liberibacter africanus subsp. capensis'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**(6), 2119-2125.
- Gasparich G. E. 2010. Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biologicals*, **38**(2), 193-203.
- Gmitter F. G., X. Hu. 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary citrus species (rutaceae). *Economic Botany*, **44**(2), 267-277.

- Gómez A. O. G. 1998. Viroides de los cítricos: implementación de técnicas moleculares de detección y determinación de infección natural en el campo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Gottwald T. R. 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual review of phytopathology*, **48**, 119-139.
- Gottwald T. R., J. V. da Graça, R. B. Bassanezi. 2007. Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, **6**(1), 1-18.
- Griffiths H. M., W. A. Sinclair, C. D. Smart, R. E. Davis. 1999. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: 'Candidatus Phytoplasma fraxini'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **49**(4), 1605-1614.
- Grosso M., J. R. Pirani, M. L. F. Salatino, S. R. Blanco, J. A. Kallunki. 2008. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany*, **95**(8), 985-1005.
- Guillaumin A. 1911. Rutacées. *Lecomte, H. Flora Générale de l'Indochine, I*, 629-687.
- Gundersen D. E., I.-M. Lee, S. A. Rehner, R. E. Davis, D. T. Kingsbury. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of bacteriology*, **176**(17), 5244-5254.
- Halbert S. E., K. L. Manjunath. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida entomologist*, **87**(3), 330-353.
- Halbert S. E., C. A. Núñez. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. *Florida Entomologist*, **87**(3), 401-402.
- Hall D. G., M. G. Hentz, R. C. Adair Jr. 2008. Population ecology and phenology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida citrus groves. *Environmental Entomology*, **37**(4), 914-924.
- Harrison N. A., W. Myrie, P. Jones, M. L. Carpio, M. Castillo, M. M. Doyle, C. Oropeza. 2002a. 16S rRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Annals of Applied Biology*, **141**(2), 183-193.
- Harrison N. A., M. Narváez, H. Almeyda, I. Cordova, M. L. Carpio, C. Oropeza. 2002b. First report of group 16SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of Mexico. *Plant pathology*, **51**(6), 808-808.
- Hiruki C., K. Wang. 2004. Clover proliferation phytoplasma: 'Candidatus Phytoplasma trifolii'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**(4), 1349-1353.
- Hoffman M. T., M. S. Doud, L. Williams, M.-Q. Zhang, F. Ding, E. Stover, D. Hall, S. Zhang, L. Jones, M. Gooch. 2013. Heat treatment eliminates 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology*, **103**(1), 15-22.
- Holguín-Peña R. J., R. C. Vázquez-Juárez, J. P. Martínez-Soriano. 2007. First report of a 16SrI-B group phytoplasma associated with a yellows-type disease affecting tomato plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease*, **91**(3), 328-328.

- Hooker J. D. 1875. *The Flora of British India*. L. Reeve.
- Hui S. 1999. Sweet oranges: The biogeography of *Citrus sinensis*.
- Instituto Colombiano Agropecuario 'ICA'. 2005. Las Moscas de la Fruta. Grupo Tran Bogotá, 69p.
- INIFAP. 2012. Tecnología para el Manejo Integrado del psílido *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psillydae) en cítricos en Sonora.
- IRPCM. 2004. Spiroplasma Working Team—Phytoplasma taxonomy group (2004)'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243-1255.
- Jagoueix S., J. M. Bove, M. Garnier. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **44**(3), 379-386.
- Jagoueix S., J. M. Bové, M. Garnier. 1996. PCR detection of the two «Candidatus» liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and cellular probes*, **10**(1), 43-50.
- Johnson E. G., J. Wu, D. B. Bright, J. H. Graham. 2014. Association of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Path.* 63:290-298.
- Jung H. Y., T. Sawayanagi, S. Kakizawa, H. Nishigawa, S. Miyata, K. Oshima, M. Ugaki, J. T. Lee, T. Hibi, S. Namba. 2002. 'Candidatus Phytoplasma castaneae', a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **52**(5), 1543-1549.
- Jung H. Y., T. Sawayanagi, S. Kakizawa, H. Nishigawa, W. Wei, K. Oshima, S. Miyata, M. Ugaki, T. Hibi, S. Namba. 2003a. 'Candidatus Phytoplasma ziziphi', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **53**(4), 1037-1041.
- Jung H. Y., T. Sawayanagi, P. Wongkaew, S. Kakizawa, H. Nishigawa, W. Wei, K. Oshima, S. Miyata, M. Ugaki, T. Hibi. 2003b. 'Candidatus Phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **53**(6), 1925-1929.
- Larios C. 1987. Insectos como vectores de fitopatógenos y la determinación de umbrales económicos del daño. CATIE, Turrialba. Costa Rica.
- Lee I.-M., D. Gundersen-Rindal, R. Davis, K. Bottner, C. Marccone, E. Seemüller. 2004a. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **54**(4), 1037-1048.
- Lee I. M., R. E. Davis, D. E. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology*, **54**(1), 221-255.

- Lee M., K. D. Bottner, G. Secor, V. Rivera-Varas. 2006. 'Candidatus Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **56**(7), 1593-1597.
- Lee M., M. Martini, C. Marcone, S. F. Zhu. 2004b. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**(2), 337-347.
- Li J., P. Trivedi, N. Wang. 2015. Field evaluation of plant defense inducers for the control of citrus huanglongbing. *Phytopathology*, **106**(1), 37-46.
- Li W., J. S. Hartung, L. Levy. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of "Candidatus Liberibacter species" associated with citrus Huanglongbing. *Plant Disease*, **91**(1), 51-58.
- Lim P. O., B. B. Sears. 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *Journal of Bacteriology*, **174**(8), 2606-2611.
- Lindbeck A., R. Bransky. 2000. Cytology of fibrous roots from citrus blight-affected trees. *Plant disease*, **84**(2), 164-167.
- Linnaeus C. 1753. *Species plantarum*, vol. 2. Holmiae [Stockholm]: impensis Laurentii Salvii.
- Liu Y. H., J. H. Tsai. 2000. Effects of temperature on biology and life table parameters of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae). *Annals of applied biology*, **137**(3), 201-206.
- Loeza-Kuk E., E. Palacios-Torres, D. Ochoa-Martínez, G. Mora-Aguilera, M. Gutierrez-Espinoza, V. Febres, G. Moore, R. Alvarez-Ramos. 2005. Molecular characterization of Citrus tristeza virus isolates from Veracruz and Tamaulipas States, Mexico. *Proc. 16th Int. Org. Citrus Virol. Hilf, ME, N. Durán-Vila, and MA Rocha-Peña*, 407-411.
- Lopes S. A., G. F. Frare. 2008. Graft transmission and cultivar reaction of citrus to 'Candidatus Liberibacter americanus'. *Plant Disease*, **92**(1), 21-24.
- Lopes S. A., G. F. Frare, E. Bertolini, M. Cambra, N. G. Fernandes, A. J. Ayres, D. R. Marin, J. M. Bové. 2009. Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: 'Candidatus Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, 'Ca. L. americanus' is heat sensitive. *Plant Disease*, **93**(3), 257-262.
- Lou B., X. Bai, Y. Bai, C. Deng, M. RoyChowdhury, C. Chen, Y. Song. 2014. Detection and Molecular Characterization of a 16SrII-A* Phytoplasma in Grapefruit (*Citrus paradisi*) with Huanglongbing-like Symptoms in China. *Journal of Phytopathology*, **162**(6), 387-395.
- Lushington A. W. 1910. The genus citrus. *Indian Forester*, **136**(6-7), 323-353.

- MacKenzie D. R. 1985. The movement and dispersal of agriculturally important biotic agents: an International Conference on the Movement and Dispersal of Biotic Agents: a symposium held at Baton Rouge, Louisiana, October 17-19, 1984. *International Conference on the Movement and Dispersal of Biotic Agents, Baton Rouge, La.(USA), 1984*. Claitor's Publishing Division.
- Magomere T. O., S. D. Obukosia, E. Mutitu, C. Ngichabe, F. Olubayo, S. Shibairo. 2009. Molecular characterization of Candidatus Liberibacter species/strains causing huanglongbing disease of citrus in Kenya. *Electronic Journal of Biotechnology*, **12**(2), 5-6.
- Manjunath K. L., S. E. Halbert, C. Ramadugu, S. Webb, R. F. Lee. 2008. Detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Phytopathology*, **98**(4), 387-396.
- Marcone C., K. S. Gibb, C. Streten, B. Schneider. 2004a. 'Candidatus Phytoplasma spartii', 'Candidatus Phytoplasma rhamni' and 'Candidatus Phytoplasma allocasuarinae', respectively associated with spartium witches'-broom, buckthorn witches'-broom and allocasuarina yellows diseases. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **54**(4), 1025-1029.
- Marcone C., B. Schneider, E. Seemüller. 2004b. 'Candidatus Phytoplasma cynodontis', the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **54**(4), 1077-1082.
- Marques J. P., E. W. Kitajima, J. Freitas-Astúa, B. Appezzato-da-Glória. 2010. Comparative morpho-anatomical studies of the lesions caused by citrus leprosis virus on sweet orange. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **82**(2), 501-511.
- McCollum G., M. Hilf, M. Irey, W. Luo, T. Gottwald. 2016. Susceptibility of sixteen citrus genotypes to 'Candidatus Liberibacter asiaticus'. *Plant Disease*, **100**(6), 1080-1086.
- McCoy R. E., A. Caldwell, C. J. Chang, Q. T. A. Chen, L. N. Chiykowski, M. T. Cousin, J. L. Dale, G. T. N. Leeuw, D. A. Golino, K. J. Hackett, B. C. Kirkpatrick, R. Marwitz, H. Petzold, R. C. Sinha, R. F. Whitcomb, I. L. Yang, B. M. Zhu, E. Seemüller. 1989. Spiroplasmas, Acholeplasmas, and Mycoplasmas of plants and Arthropods. *Pages 545-640 in: The Mycoplasma, Vol V. R. F. Whitcomb and G. Tully, eds. Academic Press, New York.*
- Meyer J. M., M. A. Hoy, D. G. Boucias. 2007. Morphological and molecular characterization of a Hirsutella species infecting the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), in Florida. *Journal of invertebrate pathology*, **95**(2), 101-109.
- Montano H. G., R. E. Davis, E. L. Dally, S. Hogenhout, J. o. P. Pimentel, P. Brioso. 2001. 'Candidatus Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(3), 1109-1118.

- Monzó C., A. Urbaneja, A. Tena. 2015. Los psílicos *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae* como vectores de la enfermedad de cítricos Huanglongbing (HLB): reciente detección de *T. erytreae* en la Península Ibérica. *Boletín SEEA*, **1**, 29-37.
- Moore G. A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *TRENDS in Genetics*, **17**(9), 536-540.
- Morton C. M. 2009. Phylogenetic relationships of the Aurantioideae (Rutaceae) based on the nuclear ribosomal DNA ITS region and three noncoding chloroplast DNA regions, *atpB-rbcL* spacer, *rps16*, and *trnL-trnF*. *Organisms Diversity & Evolution*, **9**(1), 52-68.
- NAPPO. 2009. *Sistema de Alerta Fitosanitaria*. Fecha de consulta: 25 de enero de 2017.
- Oliver D. 1861. The Natural Order Aurantiaceæ, with a Synopsis of the Indian Species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **5**(s2), 1-44.
- Olvera J. A. S. 1991. El valle del Pilón: riego, producción e impactos socioeconómicos (1880-1910). pp.146-150. En: Agua, tierra y capital en el Noreste de México. Facultad de Filosofía y Letras de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Primera Edición. Monterrey, Nuevo León. México.
- Ortega-Arenas L. D., Á. Villegas-Monter, A. J. Ramírez-Reyes, E. E. Mendoza-García. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazonas, Veracruz, México. *Acta zoológica mexicana*, **29**(2), 317-333.
- Oshima K., S. Namba. 2004. Survival strategy of a bacterium with a reduced genome suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid, enzyme*, **49**(5), 649.
- Otake A. 1990. Bibliography of citrus greening disease and its vectors attached with indices, and a critical review on the ecology of the vectors and their control. *Jap. Intl. Coop. Agency*, 161.
- Pacheco W. A., M. E. Genovez, C. R. Pozzi, L. M. P. Silva, S. S. Azevedo, R. M. Piatti, E. S. Pinheiro, V. Castro, S. Miyashiro, M. L. Gambarini. 2012. Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**(2), 594-601.
- Padovan A., K. Gibb, D. Persley. 2000b. Association of 'Candidatus *Phytoplasma australiense*' with green petal and lethal yellows diseases in strawberry. *Plant Pathology*, **49**(3), 362-369.
- Padrón F. P., A. C. Hernández. 2002. Presencia de *trioza erytreae* (del Guercgio, 1918)(hemíptera psyllidae) psílido africano de los cítricos en la isla de Tenerife. *Granja. Revista agropecuaria*.
- Passos-Carvalho J., A. M. F. Aguiar. 1997. Pragas dos citrinos na ilha da Madeira. *Direcção Regional da Agricultura da Região Autónoma da Madeira/Instituto Nacional de Investigação Agrária/Estação Agronómica Nacional, Madeira*.
- Pérez-Otero R., J. P. Mansilla, P. Del Estal. 2015. Detección de la psila africana de los cítricos, *Trioza erytreae* (Del Guercio, 1918)(Hemiptera:

- Psylloidea: Triozidae), en la Península Ibérica. *Arquivos Entomológicos*, **13**, 119-122.
- Pralorán J. C. 1977. Los Agrios. 1a. Edición, Edit. Blume; España. Pág. 17,18; 30-42,105-128 y 136.
- Ramadugu C., M. L. Keremane, S. E. Halbert, Y. P. Duan, M. L. Roose, E. Stover, R. F. Lee. 2016. Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in citrus relatives. *Plant Disease*, **100**(9), 1858-1869.
- Robles-González M. M., J. J. Velázquez-Monreal, M. Á. Manzanilla-Ramirez, M. Orozco-Santos, V. M. Medina-Urrutia, J. I. López-Arroyo, R. Flores-Virgen. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, **19**(1), 15-31.
- Robles G. M. M., M. J. J. Velázquez, R. M. A. Manzanilla, S. M. Orozco, V. R. Flores, U. V. M. Medina. 2010. Síntomas del Huanglongbing en limón mexicano. Primeras observaciones. *Memorias del 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México*, **8**, 141-149.
- Rodríguez-Palomera M., J. Cambero-Campos, A. Robles-Bermúdez, C. Carvajal-Cazola, O. Estrada-Virgen. 2012. Enemigos naturales asociados a *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en Nayarit, México. *Acta zoológica mexicana*, **28**(3), 625-629.
- Roistacher C. 1996. The economics of living with citrus diseases: huanglongbing (greening) in Thailand. *Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). University of California, Riverside*. pp. 279-285.
- Rossetti V., M. Gonzalez, L. Donadio, C. MOREIRA. 1997. Histórico. *Clorose Variegada dos Citros. Bebedouro, Estação Experimental de Citricultura*, 1-21.
- Ruiz-Cancino E., J. M. Coronado-Blanco, S. N. Myartseva. 2008. Psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Casos de Control Biológico en México. MP. México.[Links]*, 323-331.
- SAGARPA. 2012. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)*. Consultado enero 2017.
- SAGARPA. 2016. Veracruz, dulce productor de cítricos. <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/veracruz-dulce-productor-de-citricos?idiom=es>. Consultado: junio 2016.
- Salcedo D. 2010. Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana. IICA, México DF (México). 9292482750.
- Sánchez-Borja M. 2010. Biología, ecología y control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae).
- Santos-Cervantes M. E., J. A. Chávez-Medina, J. Acosta-Pardini, G. L. Flores-Zamora, J. Mendez-Lozano, N. E. Leyva-Lopez. 2010. Genetic diversity

- and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico. *Plant disease*, **94**(4), 388-395.
- Santos-Cervantes M. E., J. A. Chávez-Medina, J. Mendez-Lozano, N. E. Leyva-Lopez. 2008. Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with pepper and tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, **92**(7), 1007-1011.
- Sawayanagi T., N. Horikoshi, T. Kanehira, M. Shinohara, A. Bertaccini, M.-T. Cousin, C. Hiruki, S. Namba. 1999. 'Candidatus Phytoplasma japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **49**(3), 1275-1285.
- Scattolini A., M. E. Cassanello, E. Pérez, O. Bentancur. 2007. Evolución del cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri*) en limón con y sin aplicaciones estivales de cobre en las brotaciones previas a la floración. *Agrociencia*, **11**(2), 24-30.
- Scott K., C. McIntyre, J. Playford. 2000. Molecular analyses suggest a need for a significant rearrangement of Rutaceae subfamilies and a minor reassessment of species relationships within Flindersia. *Plant Systematics and Evolution*, **223**(1-2), 15-27.
- Schneider B., E. Torres, M. P. Martín, M. Schröder, H.-D. Behnke, E. Seemüller. 2005. 'Candidatus Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **55**(1), 303-307.
- Seemüller E., B. Schneider. 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**(4), 1217-1226.
- SENASICA. 2012. Ficha Técnica HLB. México D.F. SENASICA.
- SENASICA. 2017. Primer Informe Mensual Nacional: Huanglongbing de los cítricos. Situación fitosanitaria actual.
- SENASICA. 2009. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- SENASICA. 2010. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- SIAP. 2016. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do. Consultado: febrero 2017.
- Siddique A., J. Guthrie, K. Walsh, D. White, P. Scott. 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant disease*, **82**(10), 1112-1120.
- Sir Hooker J. D. 1875. The Flora of British India. *CB, KCSI*, **23**.
- SIRVEF. 2017. Sistema Integral de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. SAGARPA.
- Stover E., R. Shatters Jr, G. McCollum, D. G. Hall, Y. Duan. 2010. Evaluation of Candidatus *Liberibacter asiaticus* titer in field-infected trifoliolate cultivars:

- Preliminary evidence for HLB resistance. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*. pp. 115-117.
- Swingle W. T. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. *The citrus industry*, 190-430.
- Swingle W. T. 1943. The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily. *The citrus industry*, **1**.
- Tanaka C., T. Tanaka. 1954. *Species problem in citrus: A critical study of wild and cultivated units of citrus, based upon field studies in their native homes*. Japanese Society for the Promotion of Science.
- Tanaka T. 1961. *Citologia: semi-centennial commemoration papers on citrus studies*. Osaka: *Citologia Supporting Foundation*.
- Tanaka T. 1969. Misunderstanding with Regards Citrus Classification and Nomenclature.
- Teixeira D. C., J. L. Danet, S. Eveillard, E. C. Martins, W. C. de Jesus Junior, P. T. Yamamoto, S. A. Lopes, R. B. Bassanezi, A. J. Ayres, C. Saillard. 2005a. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. *Molecular and cellular probes*, **19**(3), 173-179.
- Teixeira D. C., C. Saillard, S. Eveillard, J. L. Danet, P. I. da Costa, A. J. Ayres, J. Bové. 2005b. 'Candidatus Liberibacter americanus', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**(Pt 5), 1857-1862.
- Teixeira D. C., N. A. Wulff, E. C. Martins, E. W. Kitajima, R. Bassanezi, A. J. Ayres, S. Eveillard, C. Saillard, J. M. Bové. 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology*, **98**(9), 977-984.
- Thomas D. 2002. Trip report: Status of the brown citrus aphid in the Mexican state of Campeche: April 2002. *USDA-ARS. Kika de la Garza Subtropical Agriculture Research Center. Weslaco, Texas*, **9**.
- Trujillo A. 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*, 141-149.
- Trujillo A. J., Sánchez, A. M. y Robles G. P. 2008. Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos en México. *Memorias del I Taller Internacional sobre el Huanglongbing de los Cítricos (Candidatus liberibacter spp) y el psílido asiático de los cítricos (Diaphorina citri)*, **3**.
- Tsai J. H., Y. H. Liu. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology*, **93**(6), 1721-1725.
- Tsai J. H., J.-J. Wang, Y.-H. Liu. 2002. Seasonal abundance of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in southern Florida. *Florida Entomologist*, **85**(3), 446-451.
- Tymon A. M., P. Jones, N. A. Harrison. 1998. Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers. *Annals of Applied Biology*, **132**(3), 437-452.

- Uc-Vázquez A., D. L. Ochoa-Martínez, E. Cárdenas-Soriano, G. Mora-Aguilera. 2005. Sintomatología e histopatología del amarillamiento letal de la lima persa *Citrus latifolia* Tanaka. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **23**(2), 169-175.
- Valiunas D., J. Staniulis, R. E. Davis. 2006. 'Candidatus Phytoplasma fragariae', a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **56**(1), 277-281.
- Van der Merwe A. J., F. G. Andersen. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Farming S. Afr.*, **12**, 439-440.
- Velásquez-Valle R., L. R. Reveles-Torres, J. A. Mauricio-Castillo, J. Mena-Covarrubias, M. D. Amador-Ramírez, S. Salas-Muñoz, M. Reveles-Hernández, R. Creamer, Y. I. Chew-Madinaveitia, Á. M. Chapa-Oliver. 2014. VIRUS Y FITOPLASMAS DE CHILE: UNA PERSPECTIVA REGIONAL.
- Verdin E., P. Salar, J.-L. Danet, E. Choueiri, F. Jreijiri, S. El Zammar, B. Gelie, J. M. Bove, M. Garnier. 2003. 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**(3), 833-838.
- Villalobos W., C. Godoy, C. Rivera. 2004. Occurrence of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), the vector of Huanglongbing. *Costa Rica. In: Proceedings of the XVI Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Monterrey, MX.* pp. 7-13.
- Walheim L. 1996. *Citrus: complete guide to selecting and growing more than 100 varieties for California, Arizona, Texas, the Gulf Coast and Florida.* Ironwood Press.
- Wallace J. 1978. Virus and viruslike diseases [of citrus]. *Citrus Industry Berkeley. University of California, Division of Agricultural Sciences.*
- Wang N., P. Trivedi. 2013. Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology*, **103**(7), 652-665.
- Wei W., R. E. Davis, I.-M. Lee, Y. Zhao. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**(8), 1855-1867.
- Whitcomb R., E. Tully. 1989. *Mycoplasmas Vol. V.* San Diego: Academic Press, Inc.
- White D. T., L. L. Blackall, P. T. Scott, K. B. Walsh. 1998. Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic diseases of papaya, and their proposed inclusion in 'Candidatus Phytoplasma australiense' and a new taxon, 'Candidatus Phytoplasma australasia'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **48**(3), 941-951.

- Xiang C., M. L. Roose. 1988. Frequency and characteristics of nucellar and zygotic seedlings in 12 citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae*, **37**(1-2), 47-59.
- Yamamoto P. T., M. R. Felipe, L. F. Garbim, J. H. C. Coelho, N. L. Ximenes, E. C. Martins, A. P. R. Leite, M. C. Sousa, D. P. Abrahão, J. D. Braz. 2006. *Diaphorina citri* (Kuwayama)(Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. *Proc. of the Huanglongbing-Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil*. pp. 96.
- Zaragoza A. S. 1993. *Pasado y presente de la citricultura española*. Generalitat Valenciana. Valencia (España).
- Zhao X. Y. 1982. Citrus yellow shoot disease (huanglongbing) in China-a. Review. *Proc. Int. Citriculture, 1981, ICI Japan, Shimizu, Japan*, **1**, 466-469.
- Zreik L., P. Carle, J. M. Bov, M. Garnier. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, "*Candidatus phytoplasma aurantifolia*". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **45**(3), 449-453.

CAPITULO III TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECTAR EL AGENTE CAUSAL DE LA ENFERMEDAD HLB EN CÍTRICOS DE LA HUASTECA HIDALGUENSE

MOLECULAR TECHNIQUES TO DETECT THE CAUSATIVE AGENT OF HLB DISEASE IN CITRUSES OF THE HUASTECA HIDALGO

Espinoza-Sánchez C¹. y Valadez-Moctezuma E.²

Resumen: El Huanglongbing (HLB) es considerada como una de las enfermedades más importantes en la citricultura mundial. Se han asociado cuatro agentes causales *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter americanus* y *Candidatus Fitoplasma asteris*. En el presente estudio se evaluaron muestras vegetales (*Citrus reticulata*, *Citrus limeta* Risso, *Citrus sinensis*, *Citrus latifolia* Tanaka, *Citrus aurantifolia* (Chrism) y *Citrus paradisi* Macf.) y psílidos de los diez municipios que conforman la Huasteca Hidalguense para la identificación molecular del agente causal del HLB. Las muestras se analizaron por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) amplificando la región 16S de DNAr con los primers específicos A2/J5 para *Ca. Liberibacter* y los primers universales R16F0/R16R0, además PCR y PCR anidada con los primers P1/P7 y fU5/rU3 respectivamente para fitoplasmas. Los amplicones fueron digeridos con las enzimas de restricción *HaeIII*, *HhaI* y *HinI* para obtener RFLPs. Los resultados mostraron en promedio tres bandas como productos de digestión y fueron seleccionadas por su peso molecular. La secuenciación de los fragmentos obtenidos no permitió asociar o hacer homologías de parentesco con alguna de las especies asociadas al HLB de los cítricos. La utilización de primers de otras regiones genómicas específicas de *Ca. Liberibacter* son necesarias en futuras investigaciones que aporten información contundente sobre si los síntomas que se presentan en cítricos corresponden a la presencia de *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Fitoplasmas* o a otro agente causal. Los resultados negativos en la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* pueden deberse a que los síntomas no fueron ocasionados por la bacteria o a la falta de sensibilidad de la técnica de PCR tiempo final. Este estudio sugiere con base en los resultados obtenidos, que el análisis se realice con TR-PCR para la detección de los patógenos asociados a HLB, o metagenómica, que son técnicas altamente sensibles y que pueden dilucidar este complejo problema que ha mostrado resultados similares en otras investigaciones.

Palabras clave: HLB, cítricos, Técnicas moleculares, secuenciación.

Abstract: Huanglongbing (HLB) is considered one of the most important diseases in world citriculture. Four causative agents have been associated with it: *Candidatus Liberibacter Asiaticus*, *Candidatus Liberibacter africanus*, *Candidatus Liberibacter americanus* and *Candidatus Phytoplasma Asteris*. This study used plant samples from *Citrus reticulata*, *Citrus limeta* Risso, *Citrus sinensis*, *Citrus latifolia* Tanaka, *Citrus aurantifolia* (Chrism) and *Citrus paradisi* Macf. and psyllids from the ten municipalities that make up the Huasteca Hidalguense were evaluated for the molecular identification of the causal agent of HLB. The samples were analyzed by means of polymerase chain reaction (PCR), by amplifying the 16s region of DNAr with the specific A2/J5 primers for *Ca. Liberibacter* and the universal primers R16F0/R16R0, in addition to PCR and nested PCR with the primers P1/P7 and fU5/rU3 respectively for phytoplasmas. The amplicons were digested with the restriction enzymes *HaeIII*, *HhaI* and *HinI* to obtain RFLPs. The results showed on average three bands as digestion products and were selected by their molecular weight. The sequencing of the fragments obtained did not allow associating or homologous kinship with any of the species reported for the HLB of citrus. The uses of primers from other specific genomic regions of *Ca. Liberibacter* are necessary in future research that provides conclusive information on whether the symptoms that occur in citrus correspond to the presence of *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Phytoplasmas* or to another causative agent. Negative results in the detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* may be due to the fact that the symptoms were not caused by the bacteria or to the lack of sensitivity of the end-point PCR technique used in this study. This study suggests, based upon the results obtained, that the analysis be performed with TR-PCR for the detection of pathogens associated with HLB, or metagenomics, which are highly sensitive techniques that can elucidate this complex problem and that have shown similar results in other studies.

Key words: HLB, citrus, molecular techniques, sequencing.

¹ Tesista: M. en C. en Protección Vegetal, Dpto. de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.

² Directora de tesis: Profesora Investigadora de tiempo completo, Dpto. de Fitotecnia, UACH.

3.1 INTRODUCCIÓN

El origen del género *Citrus* es desconocido, sin embargo, Gmitter y Hu (1990) lo ubican en el noroeste de la India y norte de Burma. Actualmente los cítricos son de gran importancia económica ya que se han expandido rápida y considerablemente en países como China, Brasil, E.U.A., España y México que figuran como los principales productores a nivel mundial (FAO, 2016). En México el cultivo de los cítricos tiene gran relevancia (Arratia-Castro *et al.*, 2014) al estar presente en 23 entidades federativas en donde el 80% de la superficie se destina a cítricos dulces como naranja, toronja y mandarina (SAGARPA, 2016). La producción nacional en el 2016 fue de \$ 17, 491, 729, 480 (SIAP, 2016).

En la región Huasteca Hidalguense la citricultura es una de las principales actividades agrícolas de la que dependen alrededor de 6,500 productores y que generan aproximadamente \$ 37, 353 ,000 en 57, 781.88 ton de producción anual (SIAP, 2016).

De entre las enfermedades que afectan las producciones cítricas el Huanglongbing (HLB) figura entre las enfermedades más importantes, de origen bacteriano, provoca considerables pérdidas en los cultivos por lo que se considera como una de las más devastadoras (Bové, 2006; Halbert y Manjunath, 2004; Roistacher, 1996). La enfermedad se reportó por primera vez en China (Yamamoto *et al.*, 2006) posteriormente en Taiwan y las islas Filipinas (Otake, 1990). En 1920 se detecta una nueva especie de *Candidatus* en Sudáfrica (Van Der Merwe y Andersen, 1937), en el continente Americano la presencia del HLB (*Ca. Liberibacter asiaticus*) fue reportada por primera vez en Marzo de 2004 en las proximidades de la ciudad Araraquara, Sao Paulo, Brasil (Coletta-Filho *et al.*, 2004), en ese mismo municipio fue comprobada la presencia de una nueva especie de *Candidatus*, *Ca. Liberibacter americanus* (Teixeira *et al.*, 2005b)

Por otro lado, naranjos infectados con HLB con hojas moteadas, manchas características y frutos sintomáticos que fueron negativos para presencia de *Ca. Liberibacter* se identificaron en 2007 en Sao Paulo, Brasil (Teixeira *et al.*, 2008a); en China se reportó la presencia de *Ca. Fitoplasma asteris* en varias muestras de hojas de cítricos (mandarina, naranja dulce y pomelo) que presentaron síntomas típicos de HLB / moteado (Chen *et al.*, 2009). Estos fitoplasmas están estrechamente relacionados con el fitoplasma guandul escoba de bruja, basado en su secuencia 16s DNAr (Teixeira *et al.*, 2008a). Actualmente existe fuerte evidencia que sugiere la infección de HLB por dos diferentes fitoplasmas, ambos pertenecientes al grupo del amarillamiento del aster (Arratia-Castro *et al.*, 2014).

Se han desarrollado y mejorado técnicas moleculares para la identificación y diferenciación de ambos patógenos y que se basan en la amplificación del DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR) (Teixeira *et al.*, 2005a; Hocquellet *et al.*, 1999; Jagoueix *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1996), PCR en tiempo real (qPCR) (Li *et al.*, 2006; Shui-Fang *et al.*, 2004) y La Amplificación Isotérmica Mediada por Asas (LAMP) (Okuda *et al.*, 2005). En algunos estudios de detección de HLB se observó que los resultados obtenidos con la PCR en tiempo real fueron alrededor de 1000 veces más sensibles a la detección de *Ca. Liberibacter* que los obtenidos con la PCR convencional (Li *et al.*, 2007).

La técnica de PCR es actualmente la más usada por su elevada sensibilidad y especificidad, además, acoplada a la serología utilizando Anticuerpos monoclonales (AcM) (PCR de inmunocaptura) se utilizó inicialmente en la amplificación de la región 16S RNAr en ausencia del DNA de planta (Jagoueix *et al.*, 1994).

La identificación y detección de *Ca. Liberibacter* y *Ca. Fitoplasma* se basan en la amplificación por medio de una PCR específica de la secuencia de su gen 16S RNAr con diversos primers desarrollados específicamente para la

detección de ambos patógenos (Anexo I y II); Jagoueix (1996) y Teixeira *et al* (2005) reportan los iniciadores OA1/OI2c para *Ca. L. africanus* y OI1/OI2c para *Ca. L. asiaticus*. El género *Liberibacter* puede también ser detectado en el insecto vector, el psilido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* (PAC) por medio de la PCR, amplificando el gen 16S RNAr (Teixeira *et al.*, 2005a). El uso de PCR anidada para la detección de fitoplasmas se ha reportado en diversas investigaciones; Wulff *et al.* (2015) reportan los primers P1/P7 seguido de fU5/rU3 para amplificar un fragmento de 850 pb utilizado para la identificación del grupo de fitoplasmas 16Sr.

Teixeira *et al.* (2005b) reporta que de 43 muestras de hojas sintomáticas colectadas en Araraquara, Brasil, analizadas mediante PCR con los primers OA1/OI1 y el primer OI2c el 100% resultaron negativas cuando el control sintomático infectado con *Ca. L. asiaticus* o *Ca. L. africanus* resultó positivo. Estos resultados se contraponen a los previamente obtenidos en algunos países de África y Asia donde las pruebas de PCR realizadas a hojas sintomáticas fueron siempre positivas (Bové *et al.*, 2000; Garnier *et al.*, 1996; Garnier y Bové, 1996; Jagoueix *et al.*, 1996).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Ubicación

El material vegetal utilizado así como los psíidos, fueron colectados en los 10 municipios que conforman la Región Huasteca Hidalguense, Atlapexco, Huejutla, Calnali, Huazalingo, Jaltocán, Huautla, Xochiatipan, Tlanchinol y Yahualica (Figura 12) con el apoyo del Centro de Sanidad Vegetal del Estado de Hidalgo Región Huejutla. Se consideraron 118 muestras vegetales de las cuales el 15 % presentaban síntomas de moteado asimétrico y amarillamiento de brotes (Cuadro 7), que pueden hacer referencia a la infección por HLB (Figura 12), entre las que se encontraban 4 muestras previamente reportadas como positivas a una infección por fitoplasmas por parte de los laboratorios de Sanidad Vegetal (comunicación personal del Coordinador de la campaña contra el HLB, Ing. Edi Arroyo Cruz). Por otro lado, se colectaron 29 muestras insectiles de los municipios con reportes de la presencia de la enfermedad HLB que fueron Huejutla, Orizatlán, Huautla y Atlapexco (Figura 13). Las muestras fueron etiquetadas de acuerdo a la zona en que fueron colectadas y se colocaron en papel y almacenadas en bolsas plásticas. Cada muestra se etiquetó con los siguientes datos: lugar de colecta, fecha, especie, datos de georreferenciación mismos que se presentan en el Cuadro 8.

Cuadro 7. Muestras de plantas de cítricos con síntomas y experimentales (asintomáticas) a infección con *Candidatus Liberibacter* y *Candidatus Fitoplasma asteris*.

Positivas a <i>Candidatus Liberibacter</i>	Positivas a <i>Caandidatus Fitoplasma</i>	Experimentales (Asintomáticas)
19, 71, 72, 73, 74, 75, 76 80, 81, 82, 86, 108, 113	92, 93, 94, 95	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 ,46, 47 ,48 ,49 ,50 ,51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 77, 78, 79, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 109, ,110, 111, 112, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147



Figura 12. A) Muestra sintomática al HLB en limón mexicano colectadas en el municipio de Huejutla, Hgo. (Espinoza, 2017) B) Planta de limón mexicano presentando manchas angulares (CESAVEH, 2017). C) Síntomas de HLB en Limón mexicano (Gómez, 2014) y D) Evolución de los síntomas de HLB en limón mexicano (Robles-González, 2013).

Cuadro 8. Datos de colectas realizadas en la Región Huasteca Hidalguense

No.	Lugar de colecta		Especie / Variedad	Coordenadas geográficas		Edad estimada de muestra
	Municipio	Localidad				
1	Atlapexco	Atlapexco	Naranja	21.016749	-98.345753	Adulto
2	Atlapexco	Atlapexco	Naranja	21.016820	-98.345820	Joven
3	Atlapexco	Atlapexco	Naranja	21.018320	-98.344630	Adulto
4	Atlapexco	Atlapexco	Lima chichona	21.016720	-98.345610	Adulto
5	Atlapexco	Atlapexco	Limón mex.	21.016720	-98.345610	Joven
6	Atlapexco	Atlapexco	Lima chichona	21.016680	-98.345930	Adulto
7	Atlapexco	Atlapexco	Naranja	21.016690	-98.345950	Joven
8	Atlapexco	Atlapexco	Limón mex.	21.016720	-98.345910	Adulto
9	Atlapexco	Atlapexco	Naranja	21.016720	-98.345610	Joven
10	Atlapexco	Atlapexco	Mandarina	21.019379	-98.343328	Joven
11	Huautla	Huautla	Naranja	21.033280	-98.288440	Adulto
12	Huautla	Huautla	Limón	21.030340	-98.286630	Joven
13	Huautla	Huautla	Naranja	21.033890	-98.287380	Adulto
14	Huautla	Huautla	Naranja	21.030390	-98.286140	Adulto
15	Huautla	Huautla	Limón persa	21.032230	-98.290500	Joven

16	Huautla	Huautla	Mandarina	21.032780	-98.291590	Adulto
17	Huautla	Huautla	Lima	21.032850	-98.291630	Joven
18	Huautla	Huautla	Naranja	21.033440	-98.287770	Adulto
19	Huautla	Huautla	Naranja	21.033890	-98.287380	Joven
20	Huautla	Huautla	Limón	21.032420	-98.288480	Joven
21	Huazalingo	Tlatzonco	Limón mex.	20.964685	-98.470652	Joven
22	Huazalingo	Tlatzonco	Naranja	20.965459	-98.471723	Adulto
23	Huazalingo	Tlatzonco	Limón mex.	20.965449	-98.471810	Adulto
24	Huazalingo	Ixtlahuac	Mandarina	20.959328	-98.490500	Adulto
25	Huazalingo	Ixtlahuac	Naranja	20.958823	-98.493785	Joven
26	Huazalingo	Ixtlahuac	Naranja	20.953991	-98.523306	Joven
27	Huazalingo	San Pedro	Limón persa	20.949408	-98.530504	Adulto
28	Huazalingo	San Pedro	Naranja agria	20.992335	-98.504715	Adulto
29	Huazalingo	San Pedro	Limón persa	20.949458	-98.530595	Adulto
30	Huazalingo	San Juan	Naranja agria	20.953340	-98.524064	Adulto
31	Tlanchinol	Tlanchinol	Lima chichona	20.989625	-98.661486	Joven
32	Tlanchinol	Pahuayo	Naranja	21.180050	-98.704500	Adulto
33	Tlanchinol	Temango	Naranja	21.132709	-98.698181	Joven
34	Tlanchinol	Tlanchinol	Limón mex.	20.994123	-98.656514	Joven
35	Tlanchinol	Temango	Naranja	21.132685	-98.698150	Joven
36	Tlanchinol	Tlanchinol	Mandarina	20.992642	-98.652960	Joven
37	Tlanchinol	Pueblo Hgo.	Naranja	21.144749	-98.698857	Joven
38	Tlanchinol	Pueblo Hgo.	Naranja	21.111645	-98.685552	Joven
39	Tlanchinol	Hueyapa	Naranja agria	21.078352	-98.688006	Adulto
40	Tlanchinol	Ahuacatlán	Naranja	20.900458	-98.660398	Adulto
41	Xochiatipan	Santiago 2°	Limón persa	20.846583	-98.268564	Joven
42	Xochiatipan	Santiago 2°	Mandarina	20.845059	-98.267726	Adulto
43	Xochiatipan	Santiago 2°	Naranja	20.848582	-98.267814	Joven
44	Xochiatipan	Xóchitl	Limón persa	20.910647	-98.283193	Joven
45	Xochiatipan	B. Juárez	Naranja	20.848607	-98.273439	Adulto
46	Xochiatipan	N. Acatepec	Naranja	20.921734	-98.279750	Adulto
47	Xochiatipan	Xochiatipan	Naranja	20.845105	-98.267765	Adulto
48	Xochiatipan	N. Acatepec	Naranja	20.921828	-98.279714	Adulto
49	Xochiatipan	N. Acatepec	Naranja	20.930410	-98.292607	Adulto
50	Xochiatipan	N. Acatepec	Naranja	20.930421	-98.292605	Adulto
51	Yahualica	Pepeyoca	Naranja	20.917964	-98.405484	Joven
52	Yahualica	Coyula	Naranja	20.917671	-98.485144	Joven
53	Yahualica	Pepeyocatitla	Naranja	20.912634	-98.391747	Joven
54	Yahualica	Pepeyocatitla	Naranja	20.912437	-98.391613	Joven
55	Yahualica	Pepeyocatitla	Naranja	20.912356	-98.391381	Joven
56	Yahualica	Huitznopala	Naranja	20.912788	-98.422858	Joven

57	Yahualica	Huitznopala	Naranja	20.919241	-98.422793	Joven
58	Yahualica	Zoquitipan	Limón mex.	20.908730	-98.430870	Joven
59	Yahualica	Zoquitipan	Naranja	20.912698	-98.422857	Adulto
60	Yahualica	Zoquitipan	Naranja	20.905070	-98.437852	Joven
61	Calnali	Camotla	Limón persa	20.900316	-98.529195	Joven
62	Calnali	Techichico	Lima chichona	20.903126	-98.529508	Adulto
63	Calnali	Techichico	Naranja agria	20.900101	-98.529325	Joven
64	Calnali	Calnali	Naranja criolla	20.896934	-98.576669	Joven
65	Calnali	Calnali	Lima	20.898034	-98.588963	Joven
66	Calnali	Calnali	Lima chichona	20.897006	-98.586613	Adulto
67	Calnali	Calnali	Limón persa	20.896958	-98.576721	Adulto
68	Calnali	Calnali	Mandarina	20.898967	-98.598081	Adulto
69	Calnali	Calnali	Naranja	20.899637	-98.578097	Adulto
70	Calnali	Calnali	Limón mex.	20.899661	-98.578149	Joven
71	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
72	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
73	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
74	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
75	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
76	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
77	Orizatlán	Taxiscoatitla	Naranja	21.228200	-98.570700	Joven
78	Orizatlán	Taxiscoatitla	Naranja	21.228202	-98.570704	Joven
79	Orizatlán	Taxiscoatitla	Naranja	21.228200	-98.570700	Joven
80	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602070	Adulto
81	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
82	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
83	Orizatlán	Taxiscoatitla	Naranja	21.228198	-98.570707	Joven
84	Orizatlán	Taxiscoatitla	Naranja	21.228190	-98.570705	Joven
85	Orizatlán	Taxiscoatitla	Naranja	21.228190	-98.570703	Joven
86	Orizatlán	Santa Ana	Naranja	21.204560	-98.602090	Adulto
87	Orizatlán	Los Sabinos	Lima chichona	21.250526	-98.537907	Joven
88	Orizatlán	Potrero	Naranja	21.328224	-98.655978	Joven
89	Orizatlán	Las piedras	Limón mex.	21.362480	-98.504578	Adulto
90	Orizatlán	Potrero	Limón persa	21.330650	-98.658147	Adulto
91	Orizatlán	Hueytlale	Naranja	21.214226	-98.577521	Adulto
92	Orizatlán	Pochotitla 1	Limón persa	21.136397	-98.589747	Adulto
93	Orizatlán	Pochotitla 2	Limón persa	21.136305	-98.589995	Adulto
94	Orizatlán	Pochotitla 3	Limón persa	21.136114	-98.590242	Adulto
95	Orizatlán	Pochotitla 4	Limón persa	21.136127	-98.590249	Adulto
96	Orizatlán	P. Hincada	Toronja	21.250526	-98.537907	Adulto
97	Orizatlán	Nexpa	Limón mex.	21.375772	-98.557785	Adulto

98	Jaltocan	Cuatatzas	Naranja	21.170045	-98.543055	Adulto
99	Jaltocan	La Capilla	Limón mex.	21.151735	-98.523948	Adulto
100	Jaltocan	La Capilla	Limón mex.	21.151156	-98.522804	Adulto
101	Jaltocan	Jaltocan	Lima	21.139678	-98.533729	Adulto
102	Jaltocan	Jaltocan	Naranja	21.136673	-98.536885	Adulto
103	Jaltocan	Jaltocan	limón mex.	21.135635	-98.537299	Joven
104	Jaltocan	Jaltocan	Naranja agria	21.133184	-98.538333	Adulto
105	Jaltocan	Jaltocan	Naranja agria	21.130618	-98.540579	Joven
106	Jaltocan	Jaltocan	Mandarina	21.130262	-98.540909	Joven
107	Jaltocan	Zacapetlayo	Mandarina	21.131418	-98.551406	Adulto
108	Huejutla	Huejutla	Limón mex.	21.155494	-98.400182	Joven
109	Huejutla	Huejutla	Naranja	21.155707	-98.400271	Joven
110	Huejutla	Huejutla	Naranja agria	21.155715	-98.400238	Adulto
111	Huejutla	Huejutla	Mandarina	21.099409	-98.430613	Joven
112	Huejutla	Lemontitla	Lima chichona	21.171838	-98.487864	Adulto
113	Huejutla	Lemontitla	Limón mex.	21.171710	-98.487961	Adulto
114	Huejutla	Lemontitla	Mandarina	21.171691	-98.487922	Joven
115	Huejutla	Rancho Viejo	Lima chichona	21.161990	-98.319383	Adulto
116	Huejutla	Rancho Viejo	Lima chichona	21.161990	-98.319383	Adulto
117	Huejutla	Rancho Viejo	Lima chichona	21.161990	-98.319383	Adulto
118	Huejutla	Huejutla	Naranja	21.150702	-98.396613	Adulto
119	Huautla	Huautla	Psílicos	21.029050	-98.289945	Adulto
120	Huautla	Huautla	Psílicos	21.028984	-98.290110	Adulto
121	Huautla	Huautla	Psílicos	21.028377	-98.289821	Adulto
122	Huautla	Huautla	Psílicos	21.032819	-98.291658	Adulto
123	Huautla	Huautla	Psílicos	21.032225	-98.290509	Adulto
124	Huautla	Huautla	Psílicos	21.033859	-98.303583	Adulto
125	Atlapexco	Atlapexco	Psílicos	21.019373	-98.343217	Adulto
126	Atlapexco	Atlapexco	Psílicos	21.017131	-98.344116	Adulto
127	Atlapexco	Atlapexco	Psílicos	21.016430	-98.345829	Adulto
128	Atlapexco	Atlapexco	Psílicos	21.016790	-98.345769	Adulto
129	Atlapexco	Atlapexco	Psílicos	21.016148	-98.347258	Adulto
130	Atlapexco	Atlapexco	Psílicos	21.022146	-98.349397	Adulto
131	Yahualica	Zoquitipan	Psílicos	20.909043	-98.431908	Adulto
132	Huejutla	Zocuiteco	Psílicos	21.113760	-98.427115	Adulto
133	Orizatlán	Tepantitla	Psílicos	21.228200	-98.575500	Adulto
134	Orizatlán	Tepantitla	Psílicos	21.223400	-98.578200	Adulto
135	Orizatlán	Tepantitla	Psílicos	21.228200	-98.575500	Adulto
136	Orizatlán	Tepantitla	Psílicos	21.223400	-98.578200	Adulto
137	Orizatlán	Hueytlale	Psílicos	21.207400	-98.581600	Adulto

138	Orizatlán	Hueytla	Psíidos	21.207125	-98.581741	Adulto
139	Orizatlán	Orizatlán	Psíidos	21.175289	-98.599777	Adulto
140	Orizatlán	Huitzizilingo	Psíidos	21.184531	-98.680744	Adulto
141	Orizatlán	Huitzizilingo	Psíidos	21.184648	-98.680607	Adulto
142	Orizatlán	Huitzizilingo	Psíidos	21.184732	-98.680091	Adulto
143	Orizatlán	Huitzizilingo	Psíidos	21.171961	-98.656168	Adulto
144	Orizatlán	Santa Ana	Psíidos	21.204377	-98.602490	Adulto
145	Orizatlán	Santa Ana	Psíidos	21.204402	-98.602479	Adulto
146	Orizatlán	Pochotitla	Psíidos	21.136360	-98.589681	Adulto
147	Orizatlán	Pochotitla	Psíidos	21.136303	-98.589600	Adulto

- En las muestras vegetales se considera como adultos a los árboles con más de 5 años de edad.

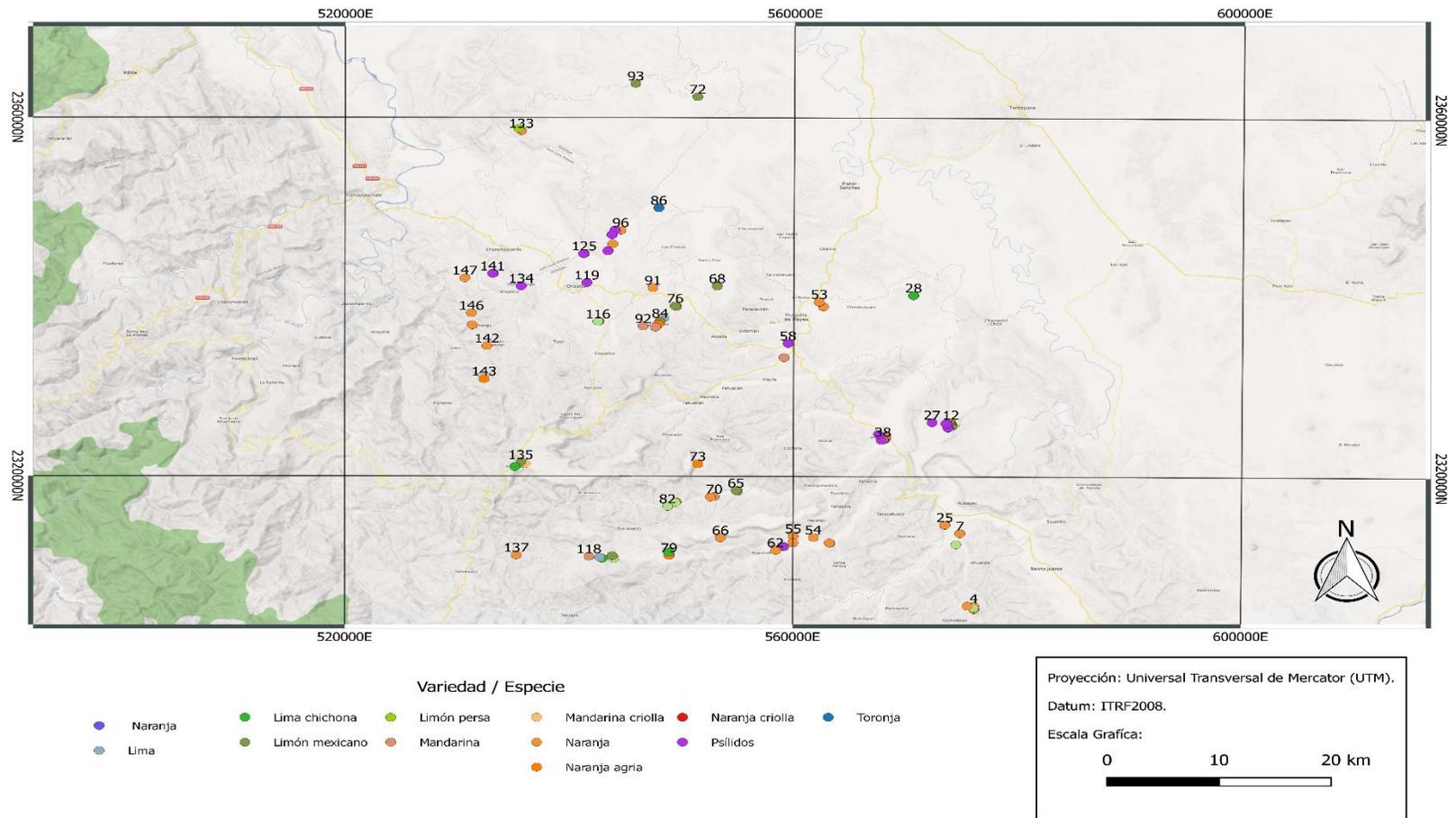


Figura 13. Ubicación geográfica de las muestras vegetales e insectiles colectadas para el presente proyecto de investigación.

3.2.2 Extracción de DNA de muestras vegetales

El DNA utilizado fue extraído de plantas sintomáticas y asintomáticas colectadas en el área de estudio, algunas de ellas previamente reportadas como positivas al HLB por parte del Centro de Sanidad Vegetal del Estado de Hidalgo (CESAVEH). Se utilizaron las nervaduras centrales de las hojas (Bastianel *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007) y brotes con presencia de psílicos en algunos de los casos y siguiendo del protocolo de extracción de DNA con SDS 20% (Weising *et al.*, 2005).

Tres gramos de nervaduras centrales de las hojas se pesaron y maceraron usando nitrógeno líquido, mortero y pistilo. El macerado se transfirió a tubos [®]Falcon de 15 mL con buffer de extracción y 60 µl B-mercaptoetanol 1 % (Biochemical[®]) precalentado a 65 °C, se adicionó 1 mL de SDS al 20%, se incubó en baño maría a 65 °C durante 20 min. Completada la incubación se adicionaron 5 mL de Acetato de Sodio (Potasio), se mezcló por inversión y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron (20 000 x g, 4 °C) y se filtró el sobrenadante con tela Magitel[®] estéril en tubos Falcon[®] nuevos adicionándoles 0.7 volumen de isopropanol frío, el filtrado se incubó durante toda la noche a -20 °C. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 20 000 X g a 4 °C y se descartó el sobrenadante, los tubos (invertidos) se colocaron sobre papel secante durante una hora; la pastilla, se disolvió en 700 µL de buffer TE y se incubó nuevamente a 65 °C durante una hora: la muestra fue transferida a tubos [®]Eppendorf de 1.5 mL adicionándoles 0.1 volumen de Acetato de Sodio 3 M y 0.7 volumen de isopropanol frío, las muestras fueron mezcladas por inversión e incubadas a -20 °C durante la noche. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados 12, 000 X g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se les agregaron 400 µL de Etanol al 70% para realizar un lavado: nuevamente se centrifugó a 12, 000 X g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se colocaron invertidos en papel secante durante una hora. Fueron agregados 300 µL de buffer TE a cada muestra, así como 7.5 µL de RNAsa y colocadas en incubación a 37 °C en el Termoblock Labnet D-1200 durante 2 h. se agregaron a cada tubo 0.05 volumen de Acetato de Sodio 5 M y 0.35 volumen de Etanol

absoluto almacenándolos durante 10 min a -20 °C; se centrifugó a 5 000 X g durante 30 minutos y se rescató el sobrenadante en tubos nuevos, adicionándoles 0.7 volumen de isopropanol frío e incubándolos durante la noche a -20 °C. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 10 min a 5 000 X g, se vació el sobrenadante y se agregaron 400 µL de Etanol al 70% para realizar un segundo lavado, se vació el sobrenadante y se colocaron sobre papel secante durante 30 min, finalmente se agregaron 200 µL de buffer TE y se colocaron a -20 °C hasta su uso.

3.2.3 Extracción de DNA de Psílicos

Para la extracción de DNA de los psílicos se utilizó el protocolo de CTAB 2% (Murray y Thompson, 1980). En un tubo de 2 mL se agregaron 100 µl de CTAB, se introdujeron 5 insectos; algunas muestras estaban conformadas por 3 o 4 psílicos debido a la baja incidencia de los mismos en la planta muestreada y se maceraron con los micromorteros previamente desinfectados, se agregaron 900 µL más de CTAB lavando el micromortero (y así completar 1 mL) y como 2 µL de β-mercaptoetanol. Las muestras se incubaron a baño maría a 96 °C por 60 minutos, y se mezclaron a intervalos de 10 minutos; posteriormente se centrifugaron a 11,000 X g por 5 minutos, el sobrenadante se transfirió con una micropipeta a tubos nuevos de 2 mL cuidando de no traer la fase inferior. En la campana de extracción se agregaron 500 µL de cloroformo-alcohol Isoamilico (24:1) y se agitaron por inversión por 10 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 11,000 X g durante 10 minutos. La fase acuosa (sobrenadante) fue extraída con micropipeta y colocada en tubos nuevos de 2 mL. En la campana de extracción se agregaron 700 µL de cloroformo-alcohol Isoamilico (24:1), los tubos fueron agitados por inversión durante 10 minutos y centrifugados a 11,000 X g por 10 minutos; transferida la fase acuosa (sobrenadante) con una micropipeta a tubos nuevos de 1.5 mL se adicionaron 950 µL de Etanol 100% previamente enfriados a -20 °C, se mezclaron muy suavemente por inversión e incubaron por

2 horas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras se centrifugaron a $11,000\text{ X g}$ durante 30 min y decantaron evitando perder la pastilla que fue resuspendida en $400\text{ }\mu\text{L}$ de agua HPLC e incubada a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Se añadieron a cada tubo $34\text{ }\mu\text{L}$ de NaOAc 3M (Acetato de Sodio 3 Molar) y 1 mL de Etanol 95% e incubados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Posteriormente las muestras se centrifugaron a $11,000\text{ X g}$ durante 5 min y decantaron el sobrenadante. Posteriormente se realizó un lavado agregando $600\text{ }\mu\text{L}$ de Isopropanol 70% y un centrifugado por 10 min a $11,000\text{ xg}$ y se decantó evitando la pérdida de la pastilla. A continuación, se dejó deshidratar la pastilla 1 hora en la cámara de flujo laminar; posteriormente se resuspendió en $30\text{ }\mu\text{L}$ de buffer TE, y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4 Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA se realizó en un Espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 utilizando $2\text{ }\mu\text{L}$ de la muestra stock.

3.2.5 Determinación de la calidad del DNA

Para comprobar la calidad del DNA extraído se cargaron $4\text{ }\mu\text{L}$ de muestras mezclados con $3\text{ }\mu\text{L}$ de buffer de carga en geles de agarosa 1% y corridas a 85 V , en una cámara de electroforesis horizontal. El tiempo de corrida fue de aproximadamente 40 minutos a 85 V . Posteriormente el gel fue colocado en bromuro de etidio ($0.4\text{ a }1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}$) durante 15 minutos y enjuagado en agua destilada durante 5 minutos. Finalmente, la imagen fue rescatada utilizando un fotodocumentador Universal Hood II BIORAD®. Para la estimación de los pesos moleculares en el caso de los productos de PCR realizados posteriormente se utilizó un marcador molecular de 1 kb de GeneRuler™.

3.2.6 Determinación de las condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Ca. Liberibacter asiaticus*

Con la finalidad de optimizar las condiciones de termociclaje para la amplificación con PCR de la bacteria *Ca. liberibacter asiaticus* con los primers universales R16F0 (5' CTG GCT CAG GAT TAA CGC TGG CGG C 3') / R16R0 (5' GGA TAC CTT GTT ACG ACT TAA CCC C 3') (Davis y Lee, (1993) y específicos A2 (5' TAT AAA GGT TGA CCT TTC GAG TTT 3') / J5 5' ACA AAA GCA GAA ATA GCA CGA ACA A 3' (Hocquellet *et al.*, 2000), se realizaron evaluaciones variando temperaturas de alineamiento.

Para determinar la T_m de los primers A2/J5 que amplifican una región exclusiva del gen 16S de aproximadamente 669 o 703 pb (Li *et al.*, 2007) de *Ca. Liberibacter africanus* o *Ca. Liberibacter asiaticus* respectivamente, se realizó un gradiente de temperatura utilizando 4 muestras, dos positivas al HLB, y dos positivas a fitoplasma; esta prueba consistió en una PCR a temperaturas de alineamiento de 50, 51.1, 52, 54.4, 57, 59.6, 60.8, 63.1, 65.2, 66.9, 67.4, 68 °C. La mezcla que se utilizó fue de 5 μ L de buffer 5x (Promega ®), 2.5 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 5 μ L dNTPs 1 mM, 2 μ L de cada oligonucleótido 20 pM, 0.2 μ L de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y 4 μ L de DNA para un volumen final de 25 μ L (Cuadro 9). La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (2 min a 94 °C, 30s a 50-65 °C, 1 min a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C por 10 min.

En el caso de los primers universales R16F0/R16R0 en PCR, se realizó también un gradiente de temperatura utilizando un conjunto de cuatro muestras, una positiva a HLB, una positiva a fitoplasma, una muestra de psílido y una muestra al azar de cítricos. Estos primers amplifican una región considerable del gen 16S de procariontes de aproximadamente 1485 pb (Davis y Lee, 1993). Esta prueba consistió de una PCR a temperaturas de alineamiento de 45, 45.9, 46.6, 48.6, 50.8, 53, 54, 55.9, 57.6, 59.1, 59.5 y 60 °C. La mezcla que se utilizó fue de 5 μ L de buffer 5x (Promega ®), 2.5 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 5 μ L dNTPs 1 mM, 2 μ L de cada oligonucleótido 10 μ M, 0.3 μ L de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y 4

µL de DNA para un volumen final de 25 µL. La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 2 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 40 ciclos de amplificación (2 min a 94 °C, 2 min a 45-60 °C, 3 min a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C por 10 min.

Cuadro 9. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* con los primers R16f0/R16R0 y para A2/J5.

MASTER MIX	Cantidad (vol)/Reacción	Concentración final
Buffer 5X	5 µL	1x
MgCl ₂ Mmol	2.5 µL	2.5 milimol
dNTPs 1Molar	5 µL	200 milimol
F 10 pmol	2 µL	20 pmol
R 10 pmol	2 µL	20 pmol
DNA Taq polimerasa 5 U/µL	0.3 µL	1.5 U
DNA (20 ng/µL)	4 µL	80 ng
Agua HPLC	4.2 µL	

3.2.7 Determinación de las condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Ca. Fitoplasma asteris*

En lo referente a los primers P1 (5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3') / P7 (5' CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3') (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) y fU5 (5' CGG CAA TGG AGG AAA CT 3') / rU3 (5' TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA 3') (Seemüller *et al.*, 1994; Teixeira *et al.*, 2008a) utilizados para la identificación de fitoplasmas del grupo del Amarillamiento del Áster se obtuvieron resultados negativos en las pruebas preliminares por lo que también se requirió de evaluaciones en la TM.

Para determinar la TM de los primers P1/P7 que amplifican parte de los flancos del gen 16S DNAr y la región intergénica 16S-23S RNAr (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995), se sometieron a gradientes de temperatura cuatro

muestras: dos muestras positivas a *Ca. Fitoplasma asteris*, una muestra positiva a Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) y una muestra de durazno con posible infección de fitoplasma. Las temperaturas de alineamiento fueron 50, 50.3, 50.6, 51.4, 52.3, 53.2, 53.6, 54.3, 55, 55.6, 55.8 y 56 °C. La mezcla fue preparada con 2.55 µL de buffer 5x (Promega®), 2 reacciones con 2 µL y 2 reacciones con 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µL dNTPs 1 mM, 0.5 µL de cada oligonucleótido 10 µM, 0.2 µL de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y 1 µL de DNA para un volumen final de 25 µL (Cuadro 10). La PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 10 min de desnaturalización a 96 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (30s a 96 °C, 30s a 50-56 °C, 30s a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C por 10 min. Posteriormente se utilizaron como molde los productos obtenidos de la reacción anterior para determinar la TM en la PCR anidada en donde se utilizaron los primers fU5/rU3 que amplifican un fragmento interno de 850 pb (Seemüller *et al.* 1994; Teixeira *et al.*, 2008a). Se utilizaron las mismas condiciones de mezcla y reacción descritas para P1/P7; como DNA molde se utilizaron 40 ng del fragmento de 1800 pb obtenido en la reacción anterior (Cuadro 11).

Cuadro 10. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación del fragmento de fitoplasmas de 1800 pb.

MASTER MIX	Cantidad (vol)/Reacción	Concentración final
Buffer 5X	2.5 µL	1x
MgCl ₂ Mmol	2.5 µL	2.5 milimol
dNTPs 1Molar	2.5 µL	200 milimol
F (P1) 10 pmol	1 µL	20 pmol
R (P7) 10 pmol	1 µL	20 pmol
DNA Taq polimerasa 5 U/µL	0.2 µL	1.5 U
DNA (20 ng/µL)	2 µL	40 ng
Agua HPLC	13.3 µL	

Cuadro 11. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación del fragmento anidado de fitoplasmas de 850 pb.

MASTER MIX	Cantidad (vol)/Reacción	Concentración final
Buffer 5X	2.5 µL	1x
MgCl ₂ Mmol	2.5 µL	2.5 milimol
dNTPs 1Molar	2.5 µL	200 milimol
F (fU5) 10 pmol	1 µL	20 pmol
R (rU3) 10 pmol	1 µL	20 pmol
DNA Taq polimerasa 5 U/µL	0.2 µL	1.5 U
DNA de fragmento de 1800 pb (20 ng/µL)	2 µL	40 ng
Agua HPLC	13.3 µL	

3.2.8 Detección de *Ca. Liberibacter asiaticus* y *Ca. Fitoplasma asteris* por PCR

Del DNA obtenido de las muestras vegetales y psílicos se realizaron diluciones con agua HPLC para obtener una concentración final de 20 ng/µL. Con 80 ng de DNA se realizó inicialmente la amplificación de las muestras en una reacción de PCR con los primers específicos A2 y J5. La mezcla se preparó con 5 µL de buffer 5x (Promega ®), 2.5 µL de MgCl₂ 25 mM, 5 µL dNTPs 1 mM, 2 µL de cada oligonucleótido 20 pM, 0.2 µL de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y 4 µL de DNA para un volumen final de 25 µL. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 2 min de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (2 min a 94 °C, 30s a 62 °C, 1 min a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C por 10 min.

Para los primers universales (evaluados como segunda opción) R16F0 y R16R0, la mezcla de reacción contenía 5 µL de buffer 5x (Promega ®), 2.5 µL de MgCl₂ 25 mM, 5 µL dNTPs 1 mM, 2 µL de cada oligonucleótido 10 µM, 0.3 µL de Taq

polimerasa Go taq (Promega®) y 4 µL de DNA para un volumen final de 25 µL. Las condiciones programadas en el termociclador fueron: 2 min de desnaturalización a 94 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (2 min a 94 °C, 2 min a 57 °C, 3 min a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C por 10 min.

Finalmente, para la PCR con los primers P1/P7 seguido por una PCR anidada con los primers fU5/rU3 (Cuadro 8 y 9) con fines de detección del fitoplasma, se preparó la master mix con 5 µL de buffer 5x (Promega ®), 2.5 µL de MgCl₂ 25 mM, 5 µL dNTPs 1 mM, 2 µL de cada oligonucleótido 10 µM, 0.3 µL de Taq polimerasa Go taq (Promega®) y 4 µL de DNA para un volumen final de 25 µL. Se siguieron las siguientes condiciones: 10 min de desnaturalización a 96 °C, seguido por 35 ciclos de amplificación (30s a 96 °C, 30s a 55 °C, 30s a 72 °C) y un ciclo final a 72 °C por 10 min. Posteriormente se utilizaron 40 ng del producto obtenido de esta reacción (fragmento de 1800 pb) para utilizarse como molde en la PCR anidada, utilizando los primers fU5/rU3 con las mismas condiciones referidas de mezcla y reacción.

Para visualizar las muestras amplificadas con cada primer se realizó un gel de agarosa 1% y se tiñó con bromuro de etidio (0.4 a 1.0 µg·mL) durante 15 minutos y enjuagado en agua destilada durante 5 minutos. Utilizando el equipo Universal Hood II BIORAD® se realizó la fotodocumentación de los geles.

3.2.9 RFLPs de fragmentos obtenidos con los primers universales

Los productos de PCR amplificados con los primers R16F0/R16R0 de las 118 muestras vegetales y 29 muestras insectiles fueron digeridas con las enzimas de restricción *HhaI*, *HaeIII* y *HinfI* con la finalidad de diferenciarlas en un primer momento a través de perfiles RFLPs. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 2 µL del producto de PCR (aprox 300 ng/µL), 0.2 µL de BSA (10 mg/µL), 2 µL de buffer 10x, 1 µL de enzima (10 U/µL) y agua HPLC para alcanzar un volumen final de 20 µL. Se homogeneizó cada una de las reacciones con un pulso en vórtex y centrifuga. Las reacciones fueron incubadas durante 20 horas

a 37 °C y posteriormente fueron visualizados los resultados de las digestiones mediante electroforesis vertical en gel de acrilamida. Se realizaron un total de 3 repeticiones de cada una de las digestiones para obtener los marcadores RFLPs.

3.2.10 Separación de fragmentos digeridos en gel de acrilamida

Para la visualización tanto de los productos de la amplificación como de las reacciones de digestión se prepararon geles de acrilamida 8% (en una cámara vertical C.B.S. Scientific CO® modelo MVG-216-33 con una fuente de poder E-C Apparatus Vorporations®, EC-105. Los cristales fueron limpiados con etanol 70% y papel Kim Wipes®. La preparación del gel se realizó bajo la campana de extracción y con utilización de material de protección (guantes) a una concentración final de 8% en un aplicador de 100 mL (Cuadro 12). La acrilamida se vertió en los cristales, un volumen de aproximadamente 50 mL, colocando un peine de 50 pozos dejándolo polimerizar por al menos 30 min. Posteriormente los cristales fueron colocados en la cámara de electroforesis (dos geles por cámara), se adicionó buffer de carga TBE 1x y se cargaron 5 µL de muestra mezclados con 3 µL de buffer de carga y se corrieron a 245 V por 1.5 h.

Cuadro 12. Reactivos y procesos para la preparación de geles de acrilamida.

Preparación de mamila	1 gel	2 geles
Solución de acrilamida 30%	13 mL	26 mL
Buffer TBE 5X	12 mL	24 mL
H ₂ O destilada estéril	35 mL	70 mL
APS 1%	420 µL	840 µL
TEMED	35 µL	70 µL

El proceso de revelado se realizó en agitación constante: 1) Solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 1%) durante 15 min posteriormente fue retirada. 2) Solución de tinción de plata (nitrato de plata 0.2%) por 15 min y fue retirada. 3)

Se realizó un enjuague con agua destilada y 4) finalmente se aplicó una solución reveladora (Hidróxido de sodio 3%) con formaldehído (100 μ L por cada 100 mL de NaOH) durante 15 min. Las imágenes fueron documentadas con cámara fotográfica.

3.2.11 Análisis de datos RFLPs

Una vez revelados y documentados los geles de acrilamida, se realizaron matrices binarias de ceros y unos en el programa Excel de Microsoft para cada perfil de fragmentos obtenidos con las diferentes enzimas, indicando banda presente (1) y ausente (0).

Los análisis para generar los agrupamientos a través de dendrogramas se realizaron con el programa FreeTree v0.9.1.50 utilizando UPGMA como método de agrupamiento con coeficiente Nei and Li/Dice y un “bootstrapping” de 1000 repeticiones. Los dendrogramas obtenidos fueron visualizados en el programa TreeView v1.6.6.

3.2.12 Secuenciación

Fragmentos obtenidos de la PCR con los primers R16F0/R16R0 representantes de los controles positivos y muestras experimentales fueron secuenciadas en un equipo 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystem. Se realizó una primer secuenciación correspondiente a tres muestras sintomáticas y 13 asintomáticas; asimismo, una segunda secuenciación comprendida de seis muestras de las cuales cuatro fueron sintomáticas a *Ca. Liberibacter asiaticus* y dos sintomáticas a *Ca. Fitoplasma asteris* (Cuadro 13). Las secuencias obtenidas se editaron con el programa Sequencher v5.4.6 y se compararon con la base de datos Genbank y el paquete BLAST (<http://www.incb.BLAST>).

Cuadro 13. Muestras secuenciadas representativas para el estudio.

Muestras 1er Secuenciación	Estatus de la muestra	Muestras 2da Secuenciación	Estatus de la muestra
Muestra 4	Asintomática	Muestra 94	Sintomática fitoplasma
Muestra 10	Asintomática	Muestra 95	Sintomática fitoplasma
Muestra 16	Asintomática	Muestra 108	Sintomática HLB
Muestra 19	Sintomática HLB	Muestra 113	Sintomática HLB
Muestra 22	Asintomática	Muestra 73	Sintomática HLB
Muestra 23	Asintomática	Muestra 75	Sintomática HLB
Muestra 29	Asintomática	Muestra 19	Sintomática HLB
Muestra 35	Asintomática		
Muestra 37	Asintomática		
Muestra 41	Asintomática		
Muestra 51	Asintomática		
Muestra 58	Asintomática		
Muestra 62	Asintomática		
Muestra 66	Asintomática		
Muestra 73	Sintomática HLB		
Muestra 83	Sintomática HLB		

3.2.13 Aislamiento bacteriano

Para descartar la presencia de otros microorganismos que pudieran generar falsos positivos se procedió a hacer un aislamiento de aquellas bacterias que pudieran reproducirse en condiciones *in vitro* utilizando agar nutritivo (Rodríguez-Mejía, 2012). El procedimiento fue el siguiente: se seleccionaron hojas sintomáticas al HLB de cada muestra y se lavaron con agua estéril, se seccionaron las nervaduras centrales de las hojas en trocitos pequeños y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio 1% durante 1 minuto. El

hipoclorito se decantó y se enjuagó tres veces con agua estéril, el tejido desinfectado se colocó en un tubo de ensaye con agua destilada estéril durante 10 min en agitación constante; una vez terminado el tiempo de agitación se tomó con un asa bacteriológica una gota de la muestra y se sembró por estría cruzada en cajas Petri con agar nutritivo, finalmente se colocaron en incubación a 37 °C para brindar las condiciones de temperatura para el crecimiento bacteriano. Las muestras utilizadas para dichos aislamientos presentaban sintomatología asociada al HLB por *Ca. Liberibacter* y *Ca. Fitoplasma asteris* (Cuadro 14).

Cuadro 14. Muestras utilizadas para los aislamientos bacterianos.

Muestra	Estatus de la muestra
Muestra 108	Sintomática al HLB
Muestra 146	Sintomática al HLB
Muestra 84	Sintomática al HLB
Muestra 93	Sintomática al HLB (posible fitoplasma)
Muestra 95	Sintomática al HLB (posible fitoplasma)

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción de DNA de muestras vegetales

La utilización del protocolo de extracción de DNA con SDS 20% (Weising *et al.*, 2005) en muestras vegetales fue efectivo, algunos de los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 15 que presenta la cantidad y calidad de los mismos. Las cuantificaciones arrojadas por el espectrofotómetro fueron variables y van desde los 60 a los 1100 ng/ μ L, esta fluctuación en las mediciones puede ser resultado de la pérdida de muestra en el proceso o falta de dilución de la pastilla.

Cuadro 15. Cantidad y calidad de DNA obtenidas de muestras de cítricos analizadas (3 g).

No. de muestra	ng/uL	260/280	No. de muestra	ng/uL	260/280
1	82.96	1.3	37	83.76	1.82
5	167.97	1.55	38	1572.51	1.78
10	219.86	1.71	41	111.52	1.77
15	316.23	1.64	43	226.85	1.89
18	506.68	1.3	47	340.3	1.46
20	1544.53	1.75	53	247.86	1.86
23	178.56	1.92	55	136.34	1.88
30	1795.1	2.02	59	309.53	1.85
34	226.66	1.09	61	67.09	1.69

El valor 260/280 indica la relación de absorbancia de los ácidos nucleicos y establece la pureza de los mismos.

3.3.2 Extracción de DNA de muestras de psílicos.

En el caso de los psílicos se utilizó el protocolo de CTAB 2% (Murray y Thompson, 1980) el cual generó cuantificaciones de 22 a 1013 ng/ μ L con calidades de igual manera aceptables. Algunos de los resultados de estas cuantificaciones se muestran en el Cuadro 16. La diferencia entre las mediciones

del espectrofotómetro pueden ser debidas a la cantidad de psíidos procesados por muestra o bien, por la falta de dilución de la pastilla.

Cuadro 16. Cantidad y calidad de DNA obtenidas de muestras de psíidos analizadas.

No. De muestra	ng/ μ L	Relación 260/280	No. De muestra	ng/ μ L	Relación 260/280
119	279.46	2.09	129	989.84	2.09
120	903.95	1.78	130	543.57	2.01
121	733.1	2.07	131	100.19	2.16
122	497.99	2.06	132	1013.65	2.05
123	388.34	2.1	133	77.6	2.15
124	317.37	2.15	134	143.16	2.16
125	406.69	2.05	135	33.05	2.05
126	304.26	2.01	136	111.08	2.1
127	385.38	2.01	137	333.76	1.84
128	212.05	2.19	138	761.32	2.14

3.3.3 Determinación de la calidad del DNA

El gel de agarosa 1% (Figura 14) preparado para evaluar la calidad del material genético extraído de las muestras procesadas muestra notoriamente la presencia de DNA con una banda gruesa en la parte superior del gel (señalada con la flecha de color negro) producto de la eficiencia del método utilizado para la extracción.

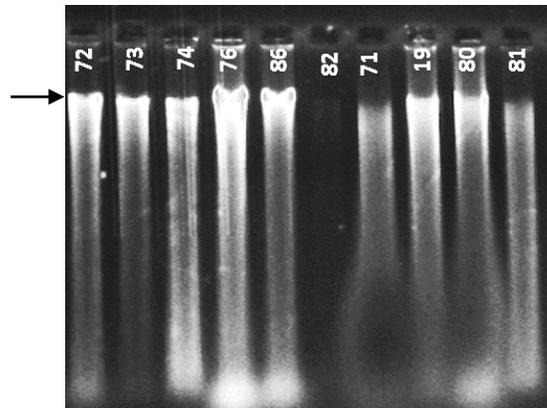


Figura 14. Gel de agarosa 1% mostrando la calidad del DNA extraído en algunas de las muestras evaluadas en el presente proyecto; la flecha señala bandas de DNA de alto peso molecular. Todas las muestras referidas en la presente Figura corresponden a muestras de naranja colectadas en el municipio de Orizatlán, Hgo.

3.3.4 Muestras evaluadas en gradiente de temperatura

3.3.4.1 Primers A2/J5

Los resultados de la prueba de gradientes para los primers A2/J5 se muestran en las Figura 15 mismas que resultaron negativas, el fragmento esperado era de 669 o 703 pb (Li *et al.*, 2007). Al no existir amplificación visible en el gel de agarosa para las PCR realizadas, fueron utilizadas las condiciones previamente reportadas en la literatura para la amplificación de fragmentos de *Ca. Liberibacter asiaticus*; es decir, que las muestras se amplificaron a 62°C (Li *et al.*, 2007; Arratia-Castro *et al.*, 2014).

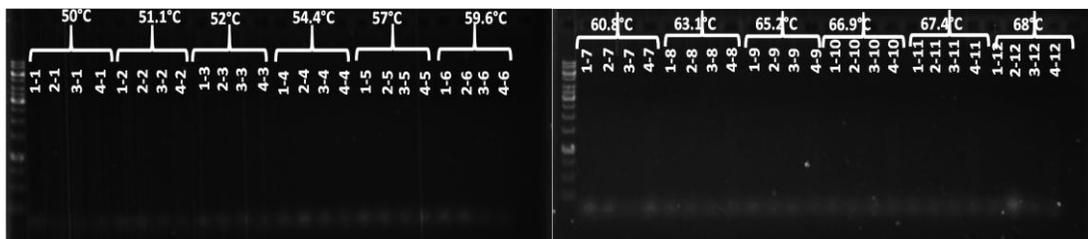


Figura 15. Gradiente de temperatura de izquierda a derecha M= Marcador de peso molecular, 1) Muestra positiva a fitoplasma, 2) muestra al azar, 3 y 4) muestra positiva a HLB.

3.3.4.2 Primers R16F0/R16R0

Las muestras evaluadas con los gradientes de temperaturas para el par de primers R16F0 y R16R0 y la amplificación del fragmento esperado de 1485 pb (Davis y Lee, 1993), arrojaron los resultados que se muestran en las Figura 16, lo que permitió definir la mejor TM de PCR para el análisis de las muestras con este par de primers a una temperatura de 57°C.

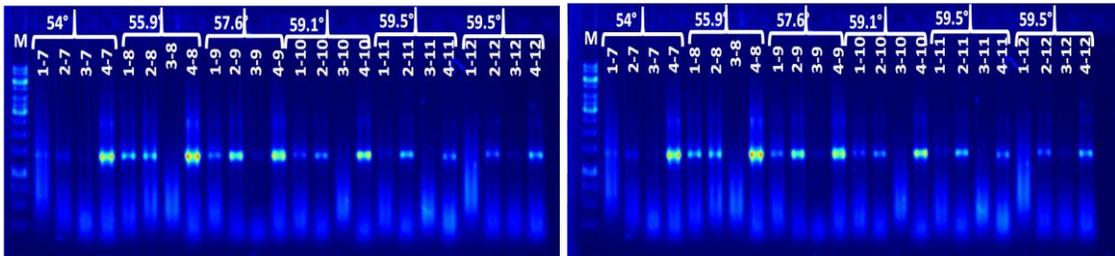


Figura 16. Gradiente de temperatura de izquierda a derecha M= Marcador de peso molecular, 1= Muestra positiva a fitoplasma, 2= muestra al azar, 3= Muestra de psílido y 4= muestra positiva a HLB.

3.3.4.3 Primers P1/P7 – fU5/rU3

En la Figura 17 se observan los resultados obtenidos de la prueba de gradientes con los primers P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) – fU5/rU3 (Seemüller *et al.* 1994; Teixeira *et al.*, 2008a) utilizados en la PCR y amplificación anidada respectivamente para la detección de *Ca. Fitoplasma asteris*, las muestras 93 y ALC fueron procesadas con 2µL de MgCl₂ y las muestras 94 y D con 3µL de MgCl₂. Los resultados obtenidos de esta prueba para las muestras analizadas no fueron concluyentes a excepción de la muestra ALC en donde se observan algunos fragmentos amplificados que corresponden de manera general al peso molecular esperado. Por lo que se optó usar las condiciones previamente reportadas de PCR anidada para la amplificación de *Ca. Fitoplasma asteris* con los primers P1/P7 – fU5/rU3.

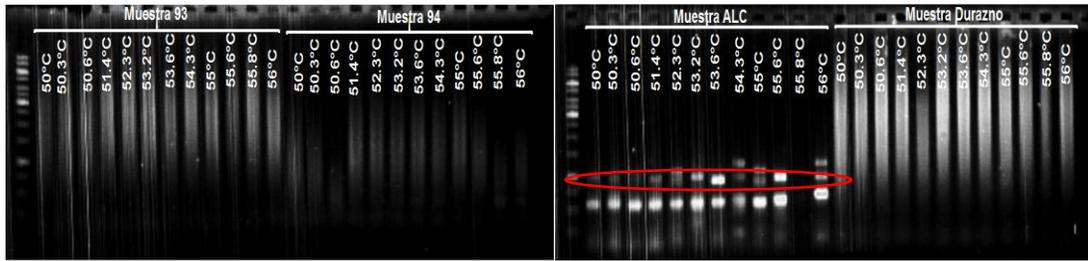


Figura 17. Prueba de gradientes de muestras amplificadas con los primers primers P1/P7 y fU5/rU3 en dos muestras sintomáticas a *Candidatus* Fitoplasma. (Muestra 93 y 94), una muestra de coco con síntomas de Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC) en la cual se aprecia el fragmento amplificado de aproximadamente 850 pb y una muestra de durazno con posible infección de fitoplasma. Marcador de peso molecular de 1 kb.

3.3.5 Detección con PCR de *Ca. Liberibacter asiaticus*.

3.3.5.1 Detección con PCR de *Ca. Liberibacter asiaticus* con primers específicos.

Debido a que la prueba de gradientes de temperatura para los iniciadores específicos A2/J5 en la detección de *Ca. Liberibacter asiaticus* no mostró ninguna amplificación, se utilizaron las condiciones de termociclaje descritas por Li *et al.* (2007) para realizar dicha evaluación en todas las muestras. Los resultados obtenidos también fueron negativos (Figura 18) al no amplificar la banda esperada de 669 o 703 pb en ninguna de las muestras tanto de cítricos como de psílidos analizadas en el presente proyecto.

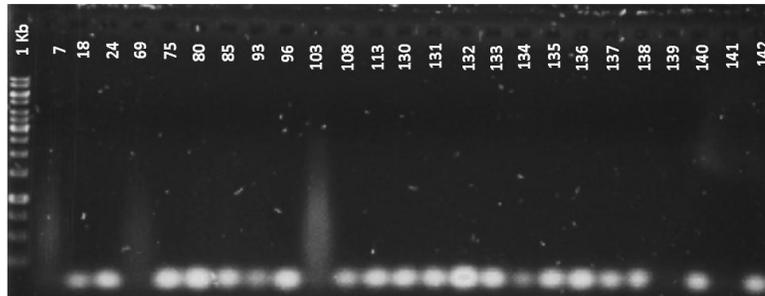


Figura 18. Gel de agarosa mostrando resultados negativos de PCR utilizando los primers específicos A2/J5 en la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en algunas muestras de cítricos y psílidos. Marcador peso molecular de 1Kb como referencia (carril de la derecha).

3.3.5.2 Detección con PCR de *Ca. Liberibacter asiaticus* con primers universales.

La amplificación de las muestras vegetales e insectiles utilizando los primers universales R16F0 y R16R0 para la detección del fragmento de DNA que hiciera referencia a la amplificación de DNA de procariontes, se muestra en la Figura 19. En esta se puede observar el fragmento de 1485 pb esperado (flecha naranja) según Davis y Lee (1993); sin embargo, igualmente fue amplificado un fragmento de aproximadamente 500 pb (flecha negra) que pudiera ser inespecífico.

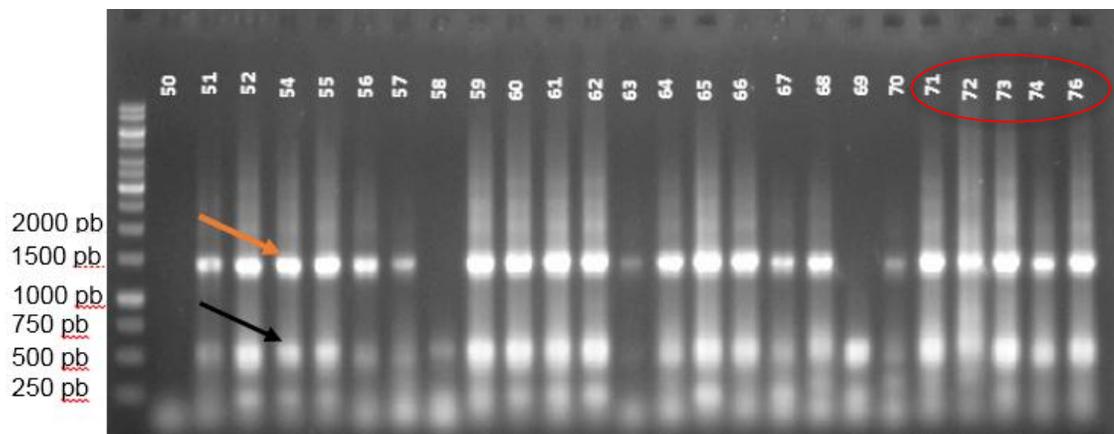


Figura 19. Amplificación de fragmentos de DNA con los primers R16F0 y R16R0 de algunas de las muestras de cítricos observándose el fragmento esperado de aproximadamente de 1485 pb (flecha anaranjada); pero además un fragmento de aproximadamente de 500 pb (flecha negra). En el gel se incluyeron 5 Muestras positivas para HLB (círculo rojo). El marcador de peso molecular es de 1 kb

3.3.6 Prueba de detección de fitoplasmas con PCR y PCR anidada

En la prueba de PCR para el total de las muestras experimentales con los primers P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995), así como en la PCR anidada utilizando los iniciadores fU5/rU3, los resultados fueron negativos; es decir, no se observó el fragmento esperado de 850 pb referido por Seemüller *et al.* (1994) y Teixeira *et al.* (2008a). Algunas de las muestras correspondieron a 4 plantas de limón persa sintomáticas y dictaminadas por el CESAWEH como positivas a fitoplasma. Los resultados de la reacción se muestran en la Figura 20.

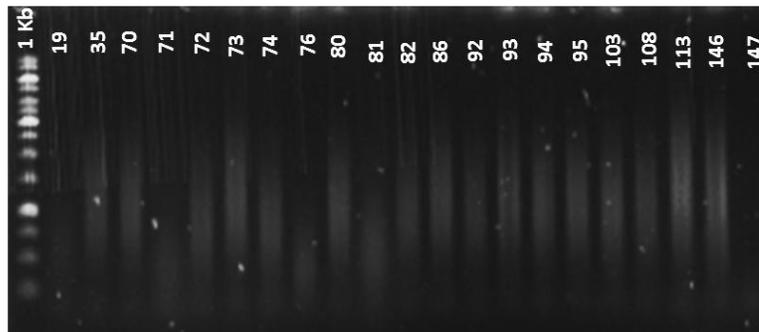


Figura 20. Amplificación negativa para la detección del fitoplasma *Candidatus* Fitoplasma asteris con los iniciadores P1/P7 y fU5/rU3, respectivamente en algunas muestras de cítricos

3.3.7 Digestiones enzimáticas de la región 16S del DNAr

El análisis RFLPs de árboles sintomáticos, sin síntomas, psíldos, fitoplasmas y controles para fitoplasmas se realizó con las enzimas *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI* (Figuras 21, 22 y 23 a partir del fragmento de 1485 pb obtenido con los primers universales para procariontes. Este análisis mostró el mismo perfil de fragmentos en la mayoría de las muestras tanto con síntomas como asintomáticas; mientras que en otras no hubo cortes. Este resultado permitió diferenciar algunos patrones polimórficos entre las muestras consideradas en el estudio.

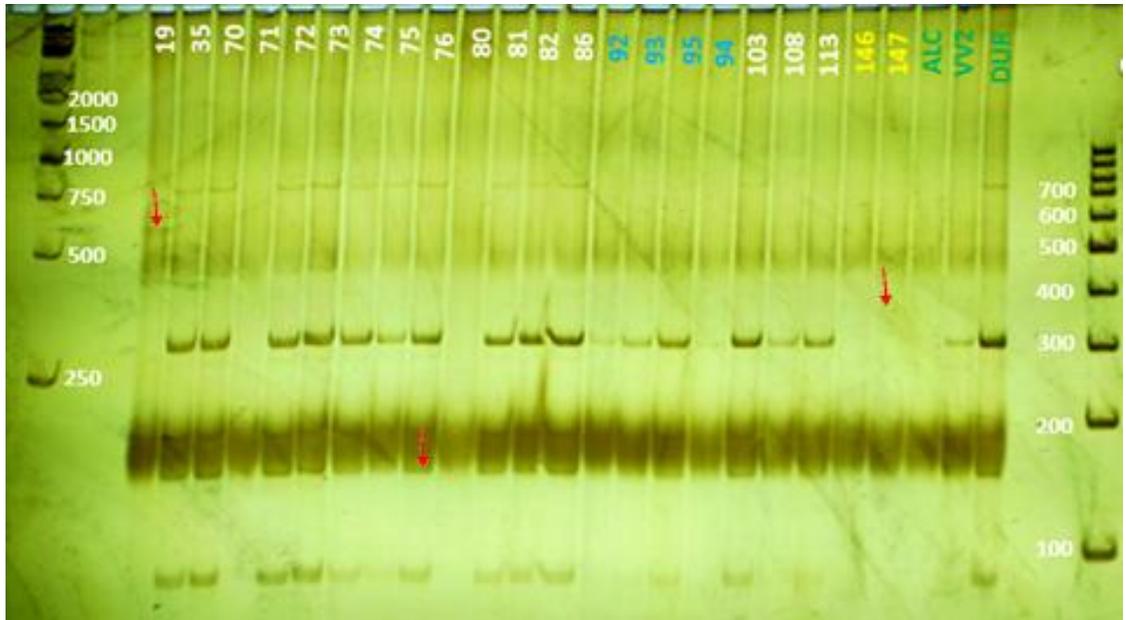


Figura 21. Perfiles RFLPs con la enzima *HaellI* para algunas muestras sintomáticas de cítricos con HLB (en blanco) y fitoplasma (azul), psílicos (amarillo) y controles (verde). Las flechas señalan algunos polimorfismos. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.

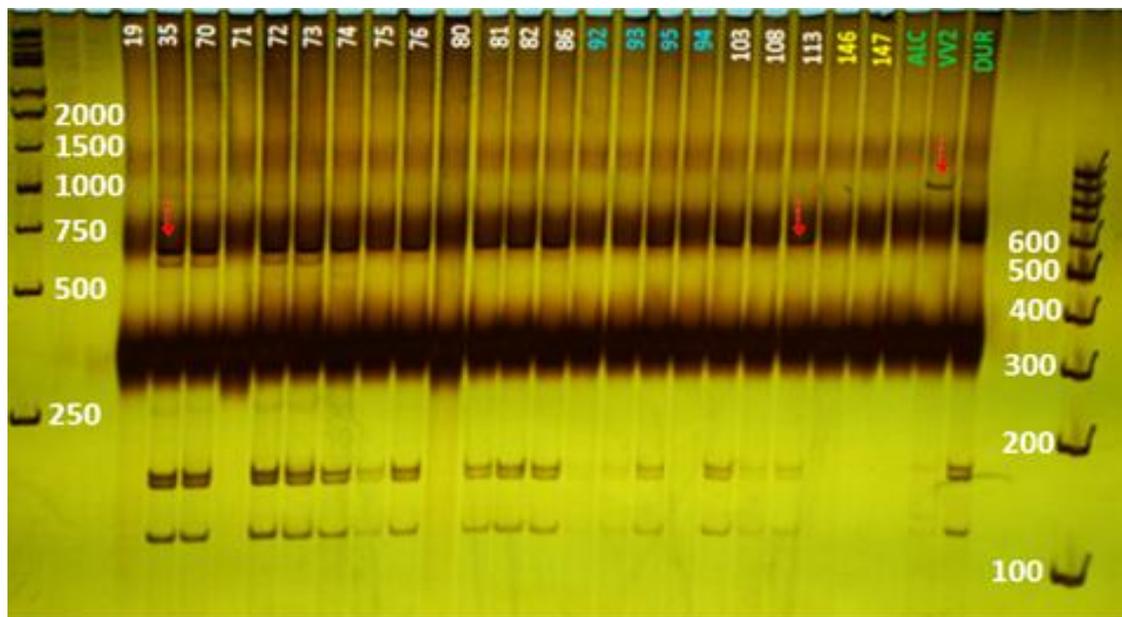


Figura 22. Perfiles RFLPs con la enzima *HinfI* para algunas muestras sintomáticas de cítricos con HLB (en blanco) y fitoplasma (azul), psílicos (amarillo) y controles (verde). Las flechas señalan algunos polimorfismos. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.

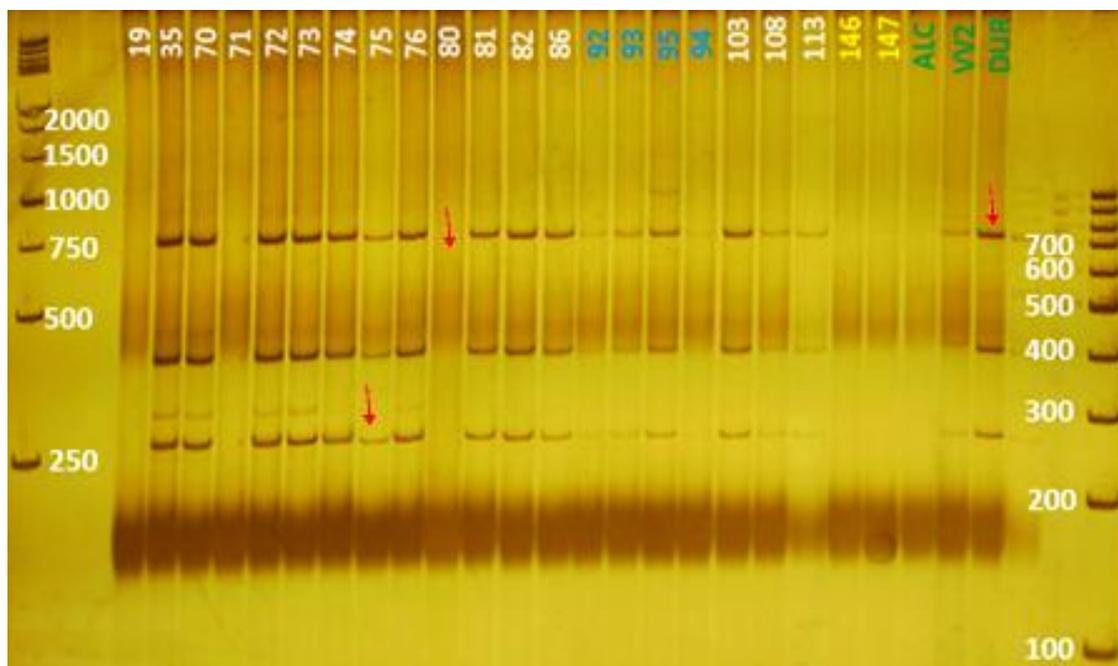


Figura 23. Perfiles RFLPs con la enzima *HhaI* para algunas muestras sintomáticas de cítricos con HLB (en blanco) y fitoplasma (azul), psíldos (amarillo) y controles (verde). Las flechas señalan algunos polimorfismos. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.

De acuerdo a los perfiles obtenidos con las digestiones enzimáticas el fragmento de 1485 de los insectos no fue reconocido por ninguna de las tres enzimas utilizadas.

Sin embargo, los perfiles RFLP son muy parecidos a los obtenidos en los controles que representan a fitoplasmas detectados en durazno y Lilium y que pertenecen al grupo del amarillamiento del aster.

3.3.8 Análisis de datos

Los análisis realizados con los datos de la matriz binaria permitieron conformar los agrupamientos de las muestras; estos se realizaron con el programa FreeTree v. 0.9.1.50 con el método UPGMA, y el coeficiente Nei and Li/Dice para cada

primer evaluado, así como para el conjunto de los mismos. Los dendrogramas se visualizaron en el programa TreeView v1.6.6. Los agrupamientos para cada enzima no separaron las muestras por especie de árbol considerada o lugar de colecta. Las muestras presentes en el Cuadro 17 no fueron incluidas en este análisis debido a que no fueron reconocidas por ninguna de las tres enzimas evaluadas.

Cuadro 17. Muestras de cítricos y psíidos no digeridas por las enzimas *Haelll*, *Hhal* y *Hinfl*.

Muestra	Origen	Muestra	Origen	Muestra	Origen
1	Vegetal	116	Vegetal	132	Psílido
5	Vegetal	119	Psílido	133	Psílido
6	Vegetal	120	Psílido	134	Psílido
8	Vegetal	121	Psílido	135	Psílido
11	Vegetal	122	Psílido	136	Psílido
14	Vegetal	123	Psílido	137	Psílido
16	Vegetal	124	Psílido	138	Psílido
32	Vegetal	125	Psílido	139	Psílido
34	Vegetal	126	Psílido	140	Psílido
36	Vegetal	127	Psílido	141	Psílido
39	Vegetal	128	Psílido	142	Psílido
57	Vegetal	129	Psílido	143	Psílido
71	Vegetal	130	Psílido	144	Psílido
82	Vegetal	131	Psílido	145	Psílido

3.3.8.1 Interpretación de dendrogramas obtenidos con las enzimas *Haelll*, *Hinfl* y *Hhal*

En la Figura 24, 25 y 26 se muestran los dendrogramas generados a partir de las digestiones enzimáticas con *Haelll*, *Hinfl* y *Hhal*, en donde a una distancia aproximada de 0.3 se observan tres y cuatro grupos, respectivamente. Los agrupamientos conformados no representan a las muestras con la sintomatología

mostrada; es decir, que plantas teóricamente afectadas con HLB, fitoplasmas o asintomáticas, estuvieron distribuidas por todo el dendrograma.

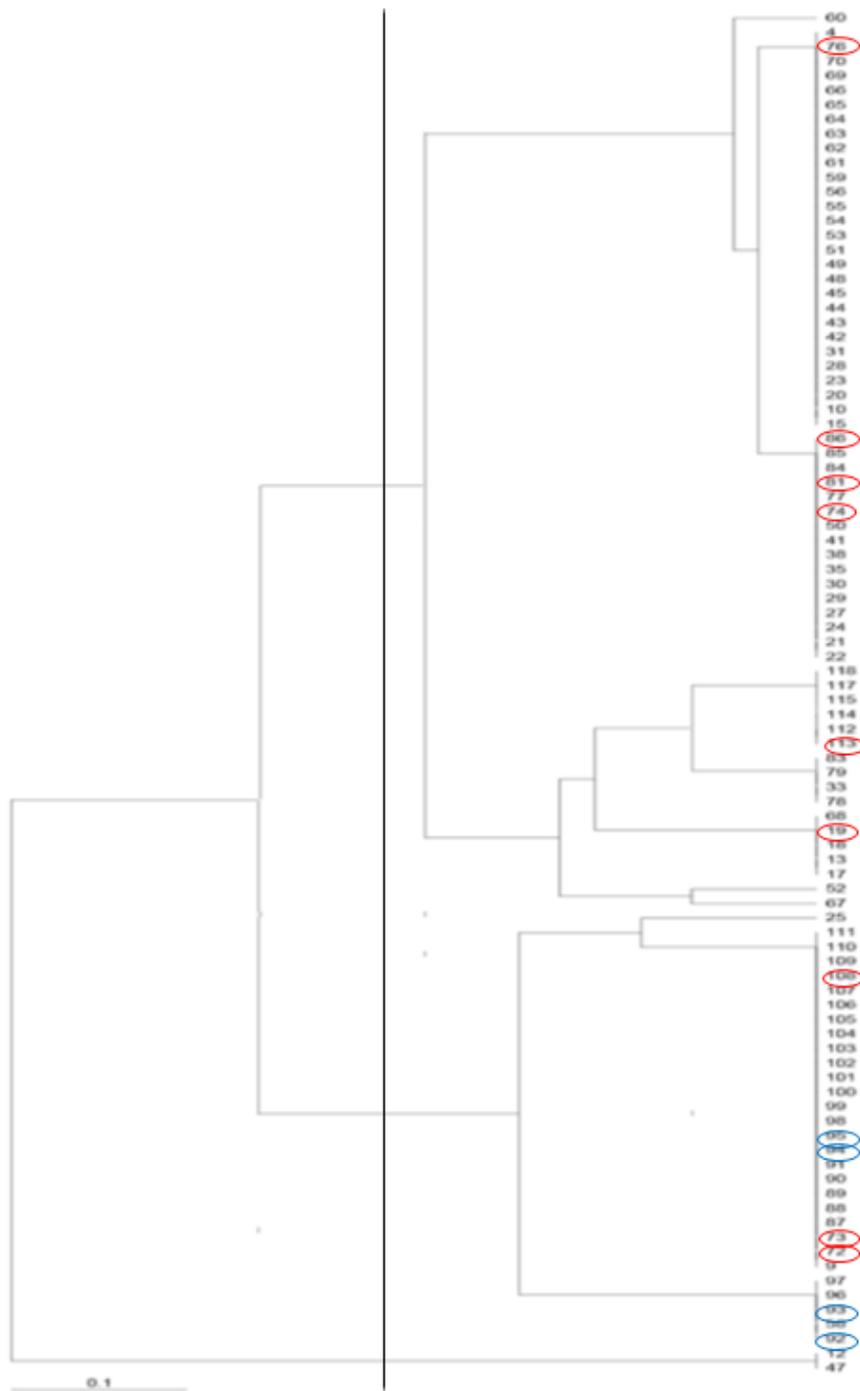


Figura 24. Dendrograma generado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *HaeIII*. Muestras sintomáticas a HLB por *Candidatus Liberibacter* en círculo rojo y *Candidatus Fitoplasma* en círculo azul.

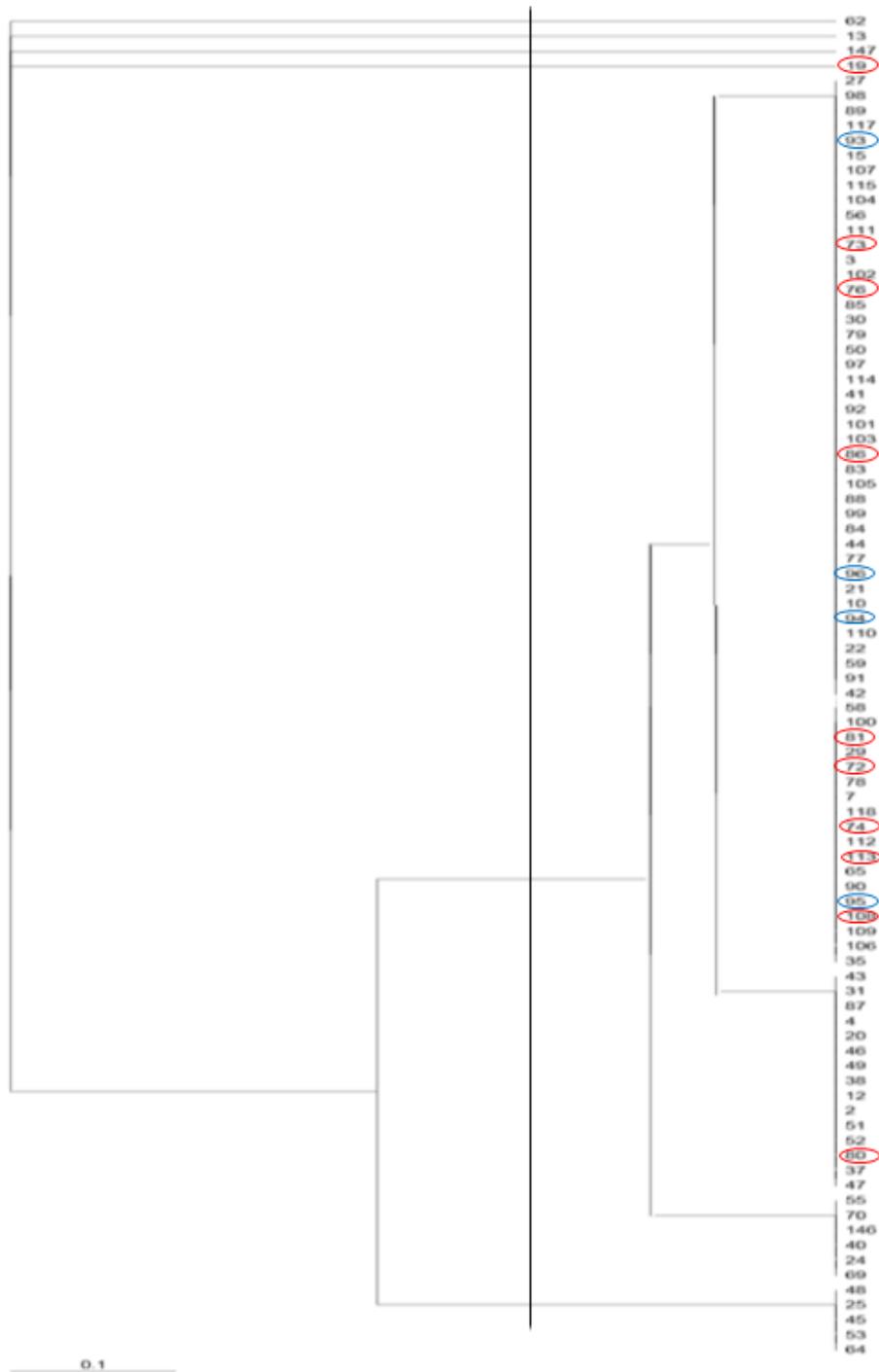


Figura 25. Dendrograma generado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *HhaI*. Muestras sintomáticas a HLB por *Candidatus Liberibacter* en círculo rojo y *Candidatus Fitoplasma* en círculo azul.

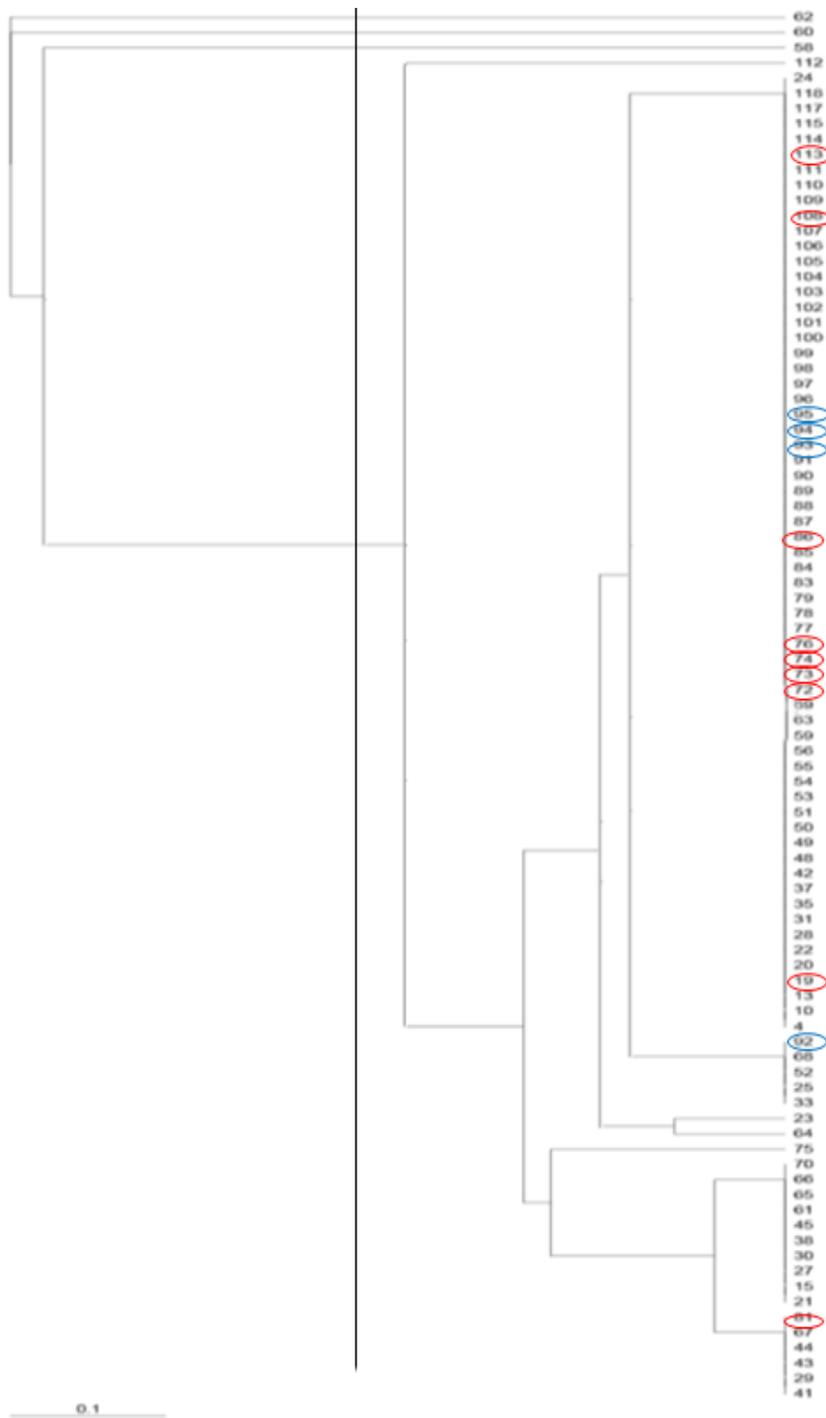


Figura 26. Dendrograma generado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *Hinfl*. Muestras sintomáticas a HLB por *Candidatus* Liberibacter en círculo rojo y *Candidatus* Fitoplasma en círculo azul.

3.3.8.2 Análisis conjunto de las digestiones de las enzimas *HaellI*, *Hhal* y *HinfI*

En el dendrograma realizado con las tres enzimas *HaellI*, *Hhal* y *HinfI* (Figura 27), se lograron diferenciar 14 grupos con el coeficiente Nei and Li/Dice 0.35. La combinación de los datos de las tres enzimas mostró mayor índice de agrupamientos que los obtenidos al utilizar los datos cada una de ellas de forma independiente. Sin embargo, ninguno de estos nuevos grupos estuvo asociado otra vez a la sintomatología referida; es decir, que las muestras teóricamente positivas para HLB y fitoplasmas, además de las experimentales estuvieron distribuidas por todo el dendrograma. Tampoco hubo algún agrupamiento que hiciera referencia a la ubicación geográfica o tipo de árbol (mandarina, lima, naranja, limón persa, limón mexicano y toronja [*Citrus reticulata*, *Citrus limeta* Risso, *Citrus sinensis*, *Citrus latifolia* Tanaka, *Citrus aurantifolia* (Chrism) y *Citrus paradisi* Macf.], respectivamente.

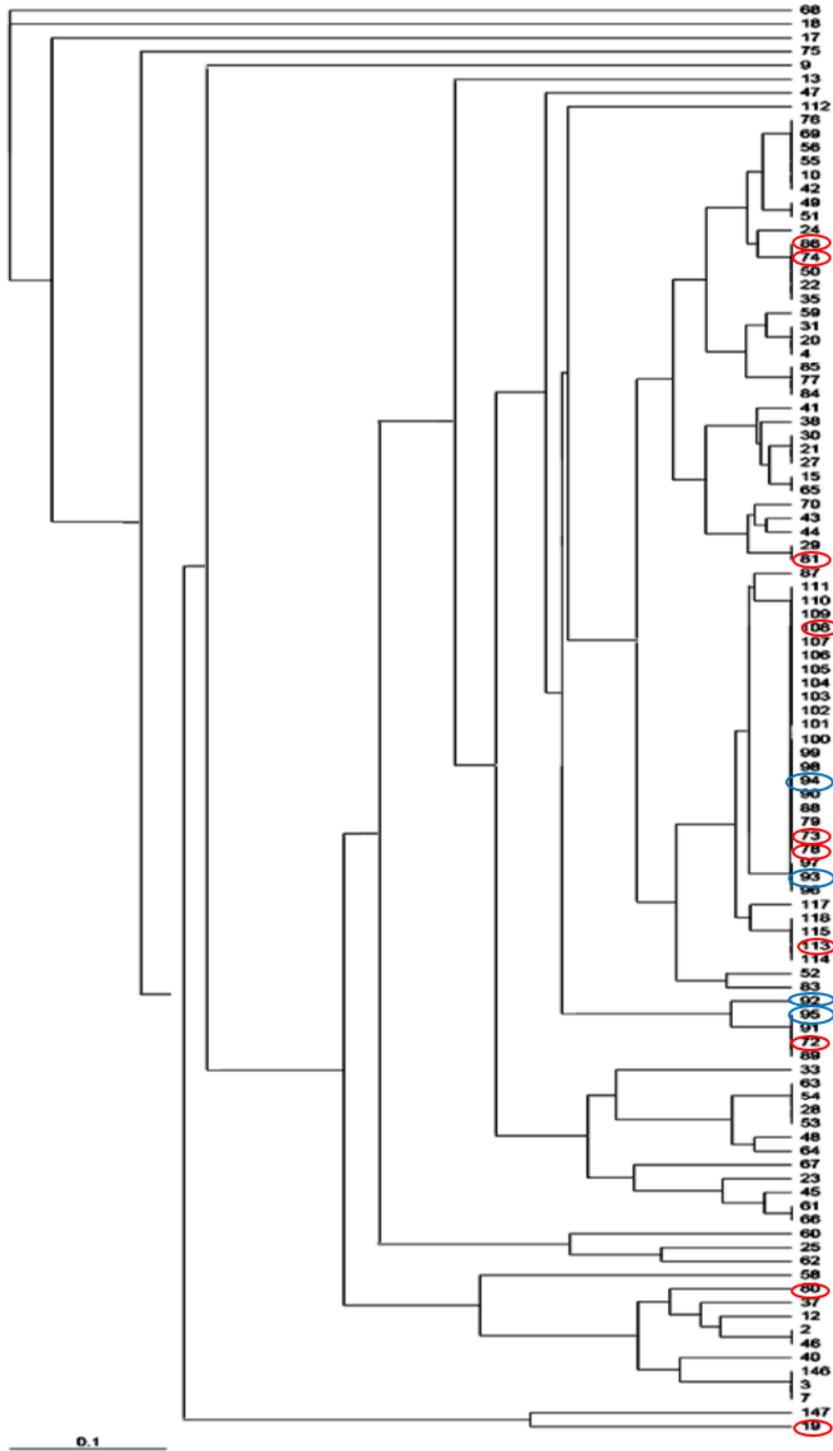


Figura 27. Dendrograma generado a partir de los fragmentos de restricción obtenidos con las enzimas *HhaI*, *HinfI*, *HaeIII*. Los grupos formados ayudaron a determinar la infección del HLB de muestras asintomáticas. Muestras sintomáticas a HLB por *Candidatus Liberibacter* en círculo rojo y *Candidatus Fitoplasma* en círculo azul.

3.3.9 Secuenciación

Para la secuenciación del fragmento amplificado del gen 16S del DNAr (1485 pb), se consideraron 13 muestras asintomáticas, ocho muestras en teoría afectadas por HLB y dos muestras teóricamente afectadas por fitoplasmas. La calidad de las secuencias realizadas en tres ocasiones independientes, resultó baja (Figura 28), aún cuando se secuenciaron ambas hebras de DNA. Una vez editados los resultados de la secuenciación, se compararon con datos del GenBank; pero no se encontró homología con lo esperado debido a que las secuencias obtenidas en el presente estudio mostraban mezclas de material genético, lo que indicó que en el fragmento amplificado iba seguramente DNA de diferentes procariontes endógenos presentes en las muestras reconocido por el mismo par de primers, lo cual impidió realizar una lectura correcta. Estos resultados negativos en las tres ocasiones independientes, disminuyen la probabilidad de error de manejo.

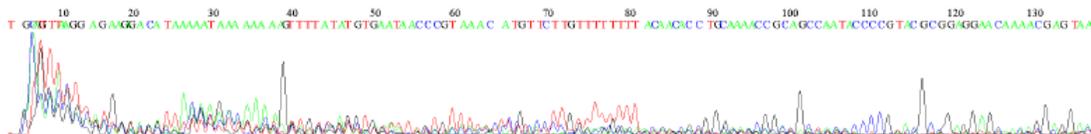


Figura 28. Fragmento de los resultados de la secuenciación de la muestra número 19 sintomática al HLB en la que se observa la baja calidad de los mismos.

3.3.10 Aislamiento bacteriano

Como se indicó en Materiales y Métodos, se intentó aislar algún microorganismo de representantes de las muestras consideradas, que pudiera estar causando el comportamiento de las muestras en los RFLPs o en la secuenciación del fragmento indicado. Después del periodo de incubación a las que fueron expuestas las cajas Petri en donde se sembraron las muestras indicadas, ninguna de las cajas mostró crecimiento de colonias (Figura 29). Este resultado nos permitió descartar la presencia de algún otro microorganismo en las muestras, a excepción de los endógenos (Bové, 2006; Chen *et al.*, 2011).

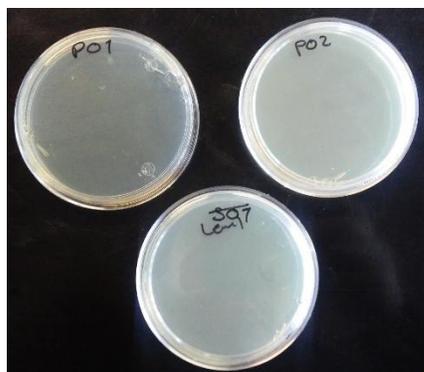


Figura 29. Los aislamientos en agar nutritivo (Rodríguez-Mejía, 2012) de las muestras sintomáticas resultaron negativos tal como se muestra en la imagen anterior.

3.4 DISCUSIÓN

El uso de las técnicas moleculares para la identificación y diferenciación de los patógenos causantes del HLB son muy utilizadas en la actualidad por su alta eficiencia (Li *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2005a; Hocquellet *et al.*, 1999). Sin embargo, esto conlleva la responsabilidad de aplicarlas de manera correcta en caso de obtener resultados positivos; y en este caso en particular, para tomar la decisión de eliminar el material sintomático, referido en la Ficha Técnica del HLB publicada por SENASICA (2012).

Bové (2016) refiere que cuando una planta muestra síntomas de HLB, es probable que dicha planta haya sido infectada desde 6 a 12 meses atrás, por lo que durante ese tiempo sirvió como fuente de inóculo para la infección por parte de los insectos vectores en los árboles vecinos.

Los síntomas generados por la infección de HLB (*Ca. Liberibacter asiaticus* o *Ca. Fitoplasma asteris*) en plantas de cítricos son parecidos a las deficiencias nutricionales y a síntomas de otras enfermedades, (Li *et al.*, 2007) como la Clorosis Variegada de los Cítricos (semejantes en ocasiones a deficiencias nutricionales) (SENASICA, 2013), Amarillamiento Letal de Lima Persa (Uc-Vázquez *et al.*, 2005) y Wood pocket (Mancha Sectorial) (Monter y Aguilera, 2011), deficiencia de zinc y cobre (Coletta-Filho *et al.*, 2004). Todos estos

podieran confundirse con los síntomas iniciales del HLB; por lo que basarse solamente en el diagnóstico sintomático para ubicar plantas sospechosas y/o el derribe de las mismas, afecta en gran medida la economía de las familias de los productores. Además, la citricultura es también una importante fuente de trabajo y la base de la producción melífera de la región, lo que le genera un valor agregado.

El HLB provoca que los haces vasculares se obstruyan impidiendo la nutrición de la planta conduciendo a la muerte de la misma de 3 a 8 años después de la aparición de los síntomas (Bové, 2006). En la región Huasteca no ha sido posible observar síntomas severos de la enfermedad. Y que, de acuerdo a los resultados obtenidos, se podría considerar que la bacteria *Ca. Liberibacter asiaticus* no estuvo presente en las muestras consideradas en el estudio. La afirmación anterior se debe a que, en el presente estudio, a pesar de que la cantidad de DNA obtenido fue relativamente alto y de buena calidad, no fue posible detectar el fragmento esperado de 669 o 703 pb con los primers específicos A2/J5 (Li *et al.*, 2007) que identifican a las bacteria *Ca. Liberibacter asiaticus* y *Ca. Liberibacter africanus*. Tampoco fue posible diferenciar mediante algún fragmento amplificado con PCR las muestras experimentales de las presuntas positivas. El fragmento de 1485 pb obtenido con los primers universales R16F0/R16R0 fue observado en todas las muestras consideradas y su digestión con las tres enzimas de restricción, mostraron pequeñas diferencias; pero no asociadas a los presuntos controles ni a las experimentales. El hecho de obtener este fragmento, sugiere la presencia de diferentes tipos de procariontes endógenos en los árboles de cítricos reconocidos con la técnica de PCR.

Las pruebas para la indentificación de fitoplasmas con los primers P1//P7 y PCR anidada con fU5/rU3 resultaron igualmente negativas; a excepción de los controles internos de DNA proveniente de durazno y Liliium con síntomas propios de fitoplasmas; sin embargo, se recomienda repetir esta parte experimental debido a que el DNA de las muestras de los controles internos fueron insuficientes.

Pudiera existir la posibilidad de que *Ca. Liberibacter asiaticus* y *Ca. Fitoplasma asteris* se encuentre en dichas muestras, pero posiblemente en una muy baja cantidad y que la técnica de PCR punto final no fuera capaz de detectarlos. De acuerdo a Li *et al.* (2007) esta técnica puede presentar 1000 veces menos sensibilidad que qPCR.

En el análisis se incluyeron 10 muestras presuntamente sintomáticas al HLB asociado a *Ca. Liberibacter asiaticus* y cuatro muestras sintomáticas a HLB asociado a *Ca. Fitoplasma asteris* (comunicación personal del Ing. Edi Arroyo Coordinador de Campaña contra el HLB, CESAVEH, 2017). Como resultado se observó que dichas muestras se encuentran distribuidas a lo largo del dendrograma mezcladas con las experimentales. Lo anterior sugiere que no existe infección por la bacteria asociada al HLB; pero queda la duda respecto al fitoplasma esperado, por lo mencionado anteriormente, toda vez que no existen grupos definidos en los dendrogramas contruidos que lo respalden.

Con lo que respecta a los resultados del dendrograma de la Figura 27, no hubo ningún agrupamiento que respondiera a grupos conformados ni por especie botánica (*Citrus reticulata*, *Citrus limeta* Risso, *Citrus sinensis*, *Citrus latifolia* Tanaka, *Citrus aurantifolia* (Chrism) y *Citrus paradisi* Macf., ni por síntomas, ubicación geográfica, condiciones climáticas, o por presencia/ausencia de psílidos vectores. Todo este comportamiento sugiere suponer la ausencia de la bacteria *Ca. Liberibacter asiaticus* detectada bajo las condiciones descritas en el presente estudio.

Para el caso particular de fitoplasmas se observa la misma situación que para HLB asociado a bacterias, no existen grupos que permitan concluir firmemente las infecciones, ya que las muestras control se presentan en tres grupos separados y asociadas a muestras colectadas en áreas relativamente separadas (aprox. 20 km).

Los resultados de secuenciación mostraron una mezcla de material genético en el fragmento amplificado que no permitió establecer una comparación con la bacteria *Ca. Liberibacter asiaticus* mediante BLAST. Este resultado tampoco

permitió confirmar la supuesta presencia de dicha bacteria en las muestras de árboles de cítricos consideradas como positivas a HLB por Sanidad Vegetal.

Bové, 2006 y Chen *et al.* (2011) mencionan que *Ca. Liberibacter asiaticus* no puede cultivarse *in vitro* tal como resultaron las pruebas de aislamiento. Por otra parte, tampoco se aisló ninguna bacteria cultivable que pudiera interferir por error con los resultados de las amplificaciones por PCR.

Se sugiere continuar con este estudio haciendo uso de análisis mediante, TR-PCR para la detección de los patógenos asociados a HLB, o metagenómica, que son técnicas altamente sensibles y que pueden dilucidar este complejo problema que se ha presentado de igual manera en otras investigaciones.

3.5 CONCLUSIONES

La identificación de *Candidatus Liberibacter* mediante la técnica de PCR en material vegetal y psíidos con la utilización de los primers universales R16F0/R16R0 y posterior obtención de marcadores RFLPs no fueron concluyentes.

Los primers específicos A2/J5 para la detección de las proteobacterias *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Candidatus Liberibacter africanus* resultaron negativas.

La PCR con los primers P1/P7 y PCR anidada con fU5/rU3 para la detección de *Candidatus Fitoplasma asteris* resultaron no concluyentes en el presente estudio; por lo que se requiere de mayor experimentación.

La secuenciación de los amplicones del gen 16S no permitieron establecer alguna comparación de similitud genética con ningún organismo.

En consecuencia de los resultados negativos obtenidos de los análisis moleculares en la detección de los patógenos asociados al HLB el mapa de prevalencia de la enfermedad no pudo ser construido.

3.6 LITERATURA CITADA

- Arratia-Castro A. A., M. E. Santos-Cervantes, E. Fernández-Herrera, J. A. Chávez-Medina, G. L. Flores-Zamora, E. Camacho-Beltrán, J. Méndez-Lozano, N. E. Leyva-López. 2014. Occurrence of 'Candidatus *Phytoplasma asteris*' in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection*, **62**, 144-151.
- Bastianel C., M. Garnier-Semancik, J. Renaudin, J. M. Bové, S. Eveillard. 2005. Diversity of "Candidatus *Liberibacter asiaticus*," based on the omp gene sequence. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(11), 6473-6478.
- Bové J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology*, 7-37.
- Bové J. M., M. Erti Dwiastuti, A. Triviratno, A. Supriyanto, E. Nasli, P. Becu, M. Garnier. 2000. Incidence of huanglongbing and citrus rehabilitation in North Bali, Indonesia. *Proc. 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. JV da Graca, RF Lee, and RK Yokomi, eds. University of California. Riverside.* pp. 378-380.
- CESAVEH. 2017. Muestra sintomática al HLB en limón mexicano.
- Coletta-Filho H., M. Targon, M. Takita, J. De Negri, J. Pompeu Jr, M. Machado, A. Do Amaral, G. Muller. 2004. First report of the causal agent of Huanglongbing ("Candidatus *Liberibacter asiaticus*") in Brazil. *Plant Disease*, **88**(12), 1382-1382.
- Chen J., X. Deng, E. L. Civerolo, R. F. Lee, J. B. Jones, C. Zhou, J. S. Hartung, K. L. Manjunath, R. H. Brlansky. 2011. "Candidatus *Liberibacter* Species 治: Without Koch 爷 s Postulates Completed, Can the Bacterium be Considered as the Causal Agent of Citrus Huanglongbing (Yellow Shoot Disease)?"
- Chen J., X. Pu, X. Deng, S. Liu, H. Li, E. Civerolo. 2009. A phytoplasma related to 'Candidatus *Phytoplasma asteris*' detected in citrus showing huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, PR China. *Phytopathology*, **99**(3), 236-242.
- Davis R. E., I.-M. Lee. 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, **83**(9), 1008-1011.
- Deng S., C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of microbiological methods*, **14**(1), 53-61.
- Espinoza C. 2017. Síntomas del HLB en limón mexicano (fotografía). Huejutla, hidalgo, junio 2017.
- FAO. 2016. Apple fruit statistics 2015. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Garnier M., J. M. Bové. 1996. Distribution of the huanglongbing (greening) *Liberobacter* species in fifteen African and Asian countries. *Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). University of California, Riverside.* pp. 388-391.

- Garnier M., S. Jagoueix, P. Toorawa, M. Grisoni, R. Mallessard, A. Dookun, S. Saumtally, J. C. Autrey, J. M. Bové. 1996. Both huanglongbing (greening) liberobacter species are present in Mauritius and Reunion. *Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). University of California, Riverside*. pp. 392-398.
- Gmitter F. G., X. Hu. 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary citrus species (rutaceae). *Economic Botany*, **44**(2), 267-277.
- Gómez, H. D. (2009). Síntomas de huanglongbing (HLB) y de deficiências nutricionales. *Citrus Health Response Program–United States Department of Agriculture (CHRPUSDA). Estados Unidos de América*. http://itp.lucidcentral.org/id/citrus/diseases/key/Diseases_of_Citrus/Media/Html/images/Huanglongbing__HLB_/HG_Picture9_HLB_mottling_progression_on_Citrus_aurantiifolia__Persian_lime__Advanced_cs.jpg
- Halbert S. E., K. L. Manjunath. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida entomologist*, **87**(3), 330-353.
- Hocquellet A., P. Toorawa, J.-M. Bove, M. Garnier. 1999. Detection and identification of the two Candidatus Liberobacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Molecular and cellular probes*, **13**(5), 373-379.
- Hocquellet, A., J. M. Bove & M. Garnier (2000, January). Isolation of “Candidatus Liberibacter” genes by RAPD and new PCR detection technique. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* (Vol. 14, No. 14).
- Jagoueix S., J. M. Bove, M. Garnier. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **44**(3), 379-386.
- Jagoueix S., J. M. Bové, M. Garnier. 1996. PCR detection of the two «Candidatus» liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and cellular probes*, **10**(1), 43-50.
- Li W., J. S. Hartung, L. Levy. 2007. Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of “Candidatus Liberibacter species” associated with citrus Huanglongbing. *Plant Disease*, **91**(1), 51-58.
- Li W., J. S. Hartung, L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. *Journal of microbiological methods*, **66**(1), 104-115.
- Monter, A. V., & A. M. Aguilera, (2011). Avances de la fruticultura en México1. *Rev. Bras. Frutic.*, **33**, 179-186.
- Okuda M., M. Matsumoto, Y. Tanaka, S. Subandiyah, T. Iwanami. 2005. Characterization of the tuf B-sec E-nus G-rpl KAJL-rpo B gene cluster of the citrus greening organism and detection by loop-mediated isothermal amplification. *Plant Disease*, **89**(7), 705-711.
- Otake A. 1990. Bibliography of citrus greening disease and its vectors attached with indices, and a critical review on the ecology of the vectors and their control. *Jap. Intl. Coop. Agency*, 161.

- Robles-González, M. Manuel. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Rev. Chapingo Ser.Hortic* [online]., vol.19, n.1, pp.15-31. ISSN 2007-4034. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>.
- Rodríguez Mejía M. 2012. Manual para la identificación de bacterias fitopatógenas/por Ma. de Lourdes Rodríguez Mejía. UACH. Departamento Parasitología Agrícola. 6071202612.
- Roistacher C. N. 1996. The economics of living with citrus diseases: huanglongbing (greening) in Thailand. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*.
- SAGARPA. 2016. Veracruz, dulce productor de cítricos. <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/veracruz-dulce-productor-de-citricos?idiom=es>. Consultado: enero 2017.
- Schneider B., M. T. Cousin, S. Klinkong, E. Seemüller. 1995. Taxonomic relatedness and phylogenetic positions of phytoplasmas associated with diseases of faba bean, sunnhemp, sesame, soybean, and eggplant/Taxonomische Verwandtschaft und phylogenetische Stellung von Phytoplasmen, die Krankheiten bei Pferdebohne, Crotalaria, Sesam, Sojabohne und Aubergine hervorrufen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 225-232.
- Seeüller E., B. Schneider, R. Maurer, U. Ahrens, X. Daire, H. Kison, K.-H. Lorenz, G. Firrao, L. Avinent, B. B. Sears. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **44**(3), 440-446.
- Shui-Fang L. X.-L. Z., Z. W.-J. L. K. QI, Y.-X. C. H.-Y. HE, K. Z. Xiao-Xiang. 2004. Cloning and Sequencing of Citrus Huanglongbing Pathogen 16S rDNA and Its Detection by Real-time Fluorescent PCR [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **1**, 016.
- SENASICA. 2012. Ficha Técnica HLB. México D.F.: SENASICA.
- SENASICA. 2013. Ficha Técnica No.34. Clorosis variegada de los cítricos (CVC) *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* México D.F.: SENASICA.
- SIAP. 2016. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do. Consultado: febrero 2017.
- Teixeira D., N. Wulff, E. Martins, E. Kitajima, R. Bassanezi, A. Ayres, S. Eveillard, C. Saillard, J. Bové. 2008a. A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology*, **98**(9), 977-984.
- Teixeira D. C., C. Saillard, S. Eveillard, J. L. Danet, P. I. da Costa, A. J. Ayres, J. Bové. 2005a. 'Candidatus Liberibacter americanus', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**(Pt 5), 1857-1862.
- Teixeira D. C., J. L. Danet, S. Eveillard, E. C. Martins, W. C. de Jesus Junior, P. T. Yamamoto, S. A. Lopes, R. B. Bassanezi, A. J. Ayres, C. Saillard.

- 2005b. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the disease. *Molecular and cellular probes*, **19**(3), 173-179.
- Tian Y., S. Ke, C. Ke. 1996. Polymerase chain reaction for detection and quantitation of Liberobacter asiaticum, the bacterium associated with huanglongbing (greening) of citrus in China. *Proc. 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). University of California, Riverside*. pp. 252-257.
- Uc-Vázquez A., D. L. Ochoa-Martínez, E. Cárdenas-Soriano, G. Mora-Aguilera. 2005. Sintomatología e histopatología del amarillamiento letal de la lima persa Citrus latifolia Tanaka. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **23**(2), 169-175.
- Van der Merwe A. J., F. G. Andersen. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Farming S. Afr.*, **12**, 439-440
- Weising K., H. Nybom, K. Wolff, G. Kahl. 2005. Fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. *Second edition*, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton., 444.
- Wulff N. A., D. C. Teixeira, E. C. Martins, R. S. Toloy, L. F. Bianco, D. A. B. Colletti, E. W. Kitajama, J. M. Bové. 2015. Sunn hemp, a major source-plant of the phytoplasma associated with huanglongbing symptoms of sweet orange in Sao Paulo State, Brazil. *Journal of Citrus Pathology*.
- Yamamoto P. T., M. R. Felipe, L. F. Garbim, J. H. C. Coelho, N. L. Ximenes, E. C. Martins, A. P. R. Leite, M. C. Sousa, D. P. Abrahão, J. D. Braz. 2006. Diaphorina citri (Kuwayama)(Hemiptera: Psyllidae): vector of the bacterium Candidatus Liberibacter americanus. *Proc. of the Huanglongbing-Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil*. pp. 96.

ANEXOS

Anexo I. Primers reportados para la identificación molecular del Género *Candidatus Liberibacter*

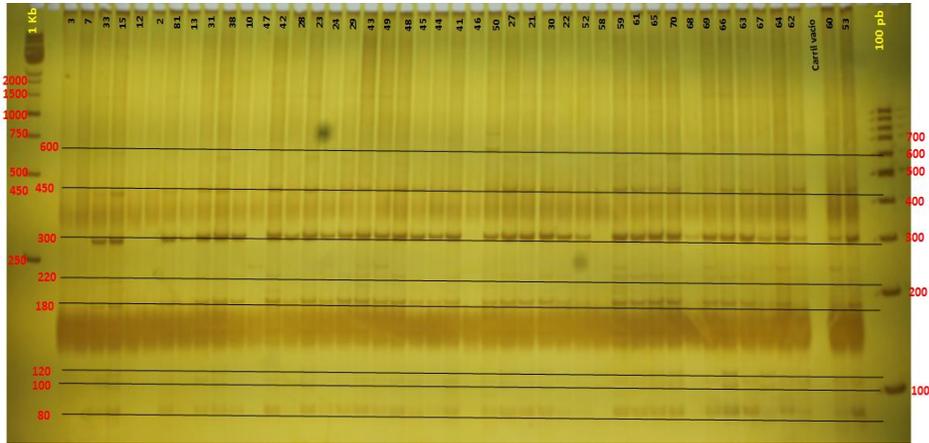
Primer	Secuencia	Especificidad	Tm (°C)	Tamaño del fragmento	Referencia
OL1	5' TCT GTT TTC TTC GAG GTT GGT GAG 3'	L. asiaticus	70	563 pb	
OL2	5' ACC GCA AGA CTC CTT ACC AGG AAG 3'	L. asiaticus	74		
GB1	5' AAG TCG AGC GAG TAC GCA AGT ACT 3'	L. americanus	63	1027 pb	Teixeira <i>et al.</i> (2005)
GB3	5' CCA ACT TAA TGA TGG CAA ATA TAG 3'	L. americanus	56		
Oi1	5' GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA 3'	L. asiaticus - L. africanus	66	1160 pb	Jagoueix <i>et al.</i> (1994)
Oi2c	5' GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T 3'	L. asiaticus - L. africanus	66		
HungF	5' CAC CGA AGA TAT GGA CAA CA 3'	L. asiaticus	58	226 pb	Hung <i>et al.</i> (2004)
HungR	5' GAG GTT CTT GTG GTT TTT CTG 3'	L. asiaticus	59		
HLB-65	5' TCC TGA GAA TTA CAC ACA AAC 3'	L. asiaticus	57	1100 pb	Tatineni <i>et al.</i> (2008)
HLB-66	5' TCT AAG TCT ATC CTG TAA CCC 3'	L. asiaticus	59		
A2	5' TAT AAA GGT TGA CCT TTC GAG TTT 3'	L. asiaticus - L. africanus	58	703 pb Las 669 pb	Hocquellet <i>et al.</i> (2000)
J5	5' ACA AAA GCA GAA ATA GCA CGA ACA A 3'	L. asiaticus - L. africanus	60	Lam	

Omp1218f	5' TAT CAT GGC CAC GGG TTA TT 3'	L. asiaticus	58	807 pb	Bastianely
Omp2025r	5' CAC GCG GAC CTA TAC CCT TA 3'	L. asiaticus	62		<i>et al.</i> (2005)
Lib16S01F	5' TTCTACGGGATAACGCACGG 3'	16S bacterias	62	580 pb	Liefting <i>et</i>
Lib16S01R	5' CGTCAGTATCAGGCCAGTG-AG 3'	16S bacterias	65		<i>al.</i> (2009)
16S sent	5' TGA GAA TGG ATA AGA GGC TC 3'	16S cloroplast	58	315 pb	
16S anti	5' TGT TGT TCC CCT CCC AAG GG 3'	16S cloroplast	64		
fD1	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	16S bacterias		≈1,500 pb	Chen <i>et al.</i>
fD2	5' AAG GAG GTG ATC CAG CC 3'	16S bacterias			(2009)
HLBas	5' TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG 3'	L. asiaticus		75 pb	
HLBp	5' FAM-AGA CGG GTG AGT AAC GCG-BHQ-1 3'	L. asiaticus			
HLBr	5' GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG 3'	L. asiaticus	5' 3'		

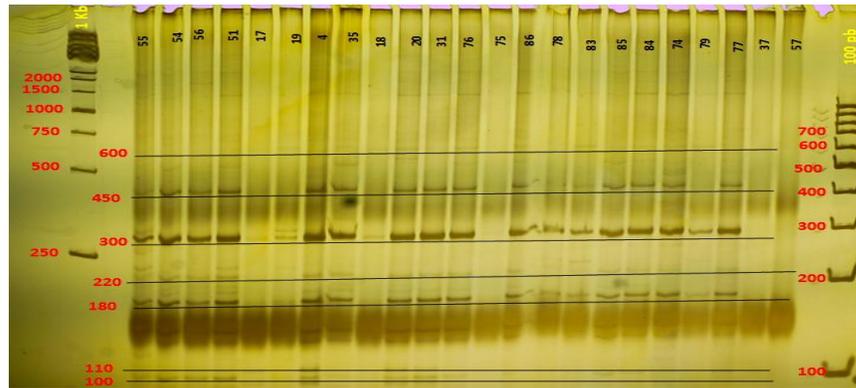
Anexo II. Primers reportados para la identificación molecular de fitoplasmas asociados al HLB.

Primer	Secuencia	Especificidad	Tamaño del fragmento	Referencia
P1	5' AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T 3'	Fitoplasmas	1800 pb	Deng y Hiruki, (1991)
P7	5' CGT CCT TCA TCG GCT CTT 3'			Schneider <i>et al.</i> (1995)
FITf	5' AAC GAA GGT TTA CGT TTA ACA AGA C 3'	Grupo 16SrIX	100 pb	Wulff <i>et al.</i> (2015)
FITr	5' GAG GTG CGA CTA CTA TTG TAA TAT G 3'	fitoplasmas		
R16F2n	5' GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3'	Grupo 16Sr	1250 pb	(Gundersen y Lee, 1996)
R16R2	5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3'	fitoplasmas		
Fu5	5' CGG CAA TGG AGG AAA CT 3'	Grupo 16Sr	880 pb	Seemüller <i>et al.</i> (1994)
Ru3	5' TTC AGC TAC TCT TTG TAA CA 3'	fitoplasmas		Teixeira <i>et al.</i> (2008)

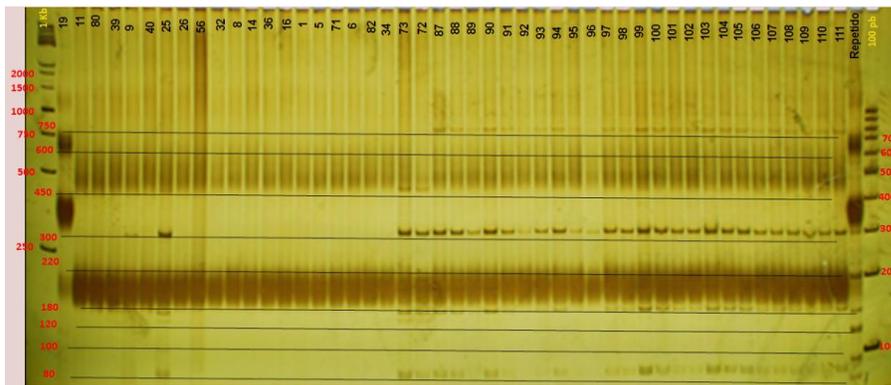
D7f2	5'ATG TGT AGC TGG ACT GAG AGG 3'	16SrDNA	857 pb	Teixeira <i>et al.</i>
D7r2	5' CTA AAG TGC TCA CCA TTA CGT GG 3'	fitoplasma HLB		(2008)
R16mF2	5' CAT GCA AGT CGA ACG GA 3'	16S rDNA	1250 pb	(Arratia-Castro <i>et</i>
R16mR1	5' CTT AAC CCC AAT CAT CGA C 3'			al., 2014)



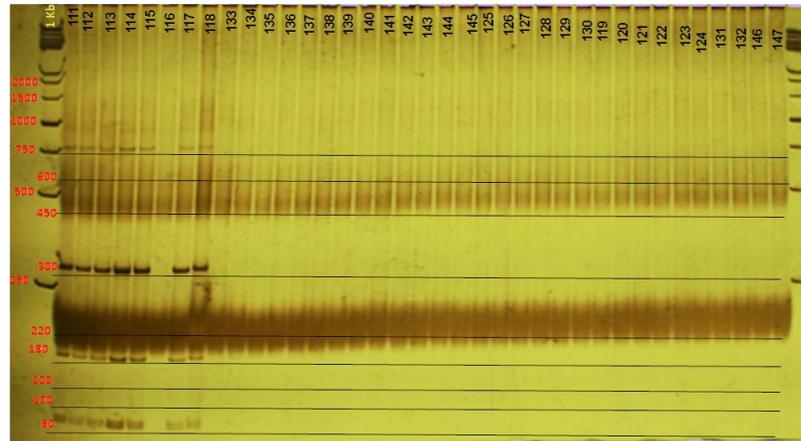
Anexo III. Perfiles RFLPs con la enzima *HaeIII* para el primer bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.



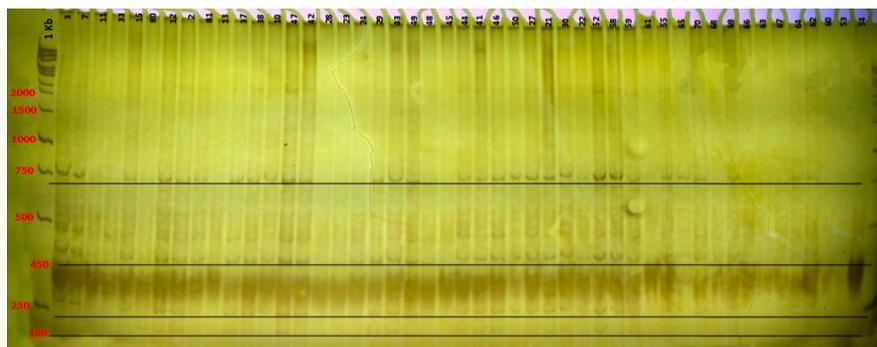
Anexo IV. Perfiles RFLPs con la enzima *HaeIII* para el segundo bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.



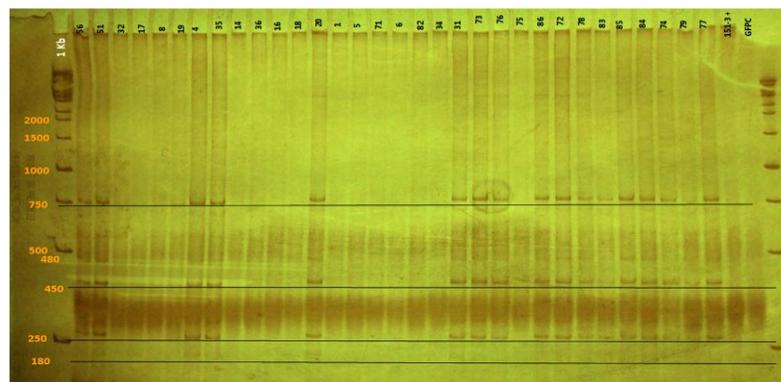
Anexo V. Perfiles RFLPs con la enzima *HaeIII* para el segundo bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.



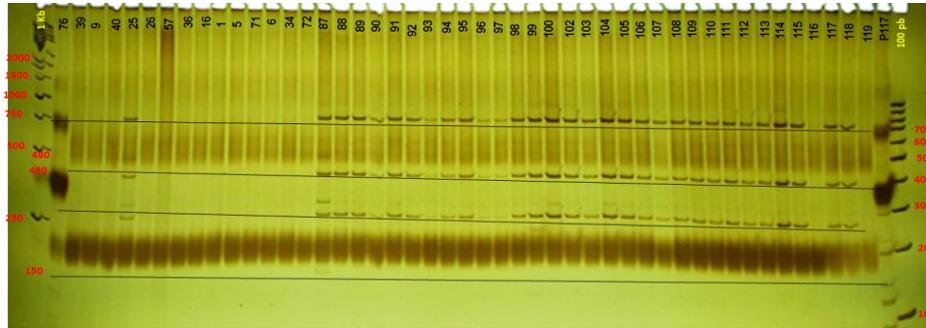
Anexo VI. Perfiles RFLPs con la enzima *HaeIII* para el cuarto bloque de muestras vegetales e insectiles. El marcador de peso molecular de 1 kb ubicó en los extremos para referencia.



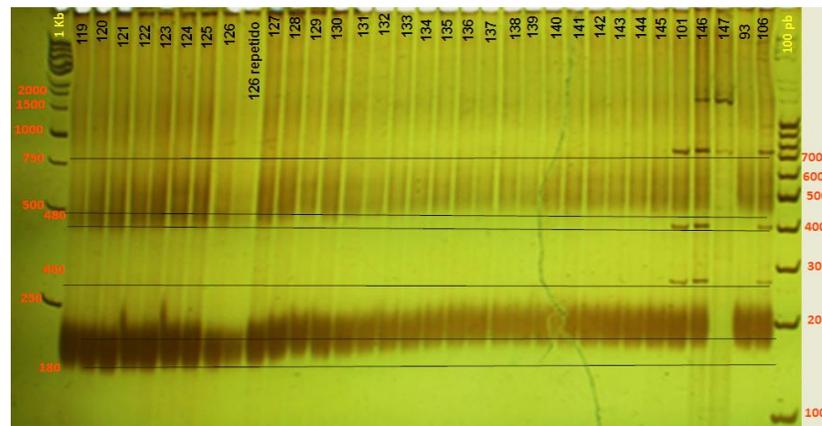
Anexo VII. Perfiles RFLPs con la enzima *HhaI* para el primer bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb ubicó en los extremos para referencia.



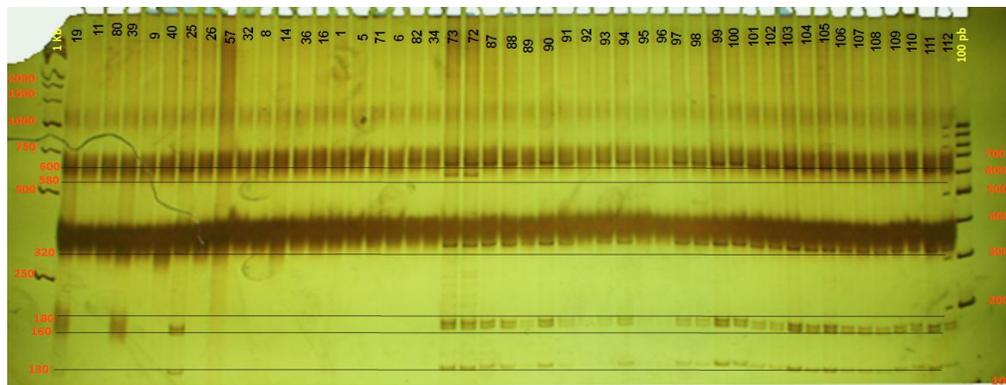
Anexo VIII. Perfiles RFLPs con la enzima *HhaI* para el segundo bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb ubicó en los extremos para referencia.



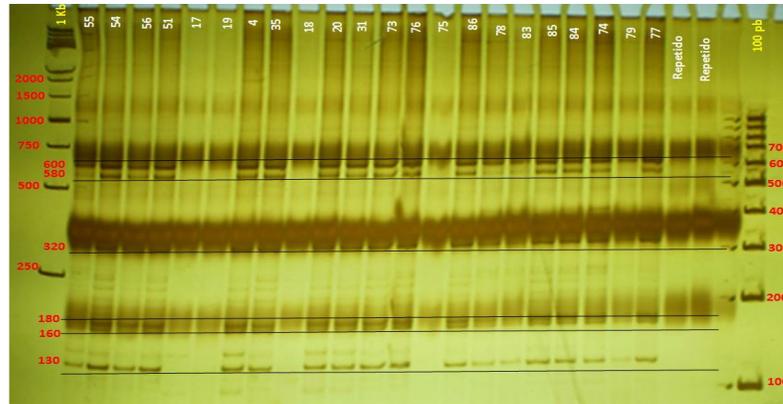
Anexo XIX. Perfiles RFLPs con la enzima *HhaI* para el tercer bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.



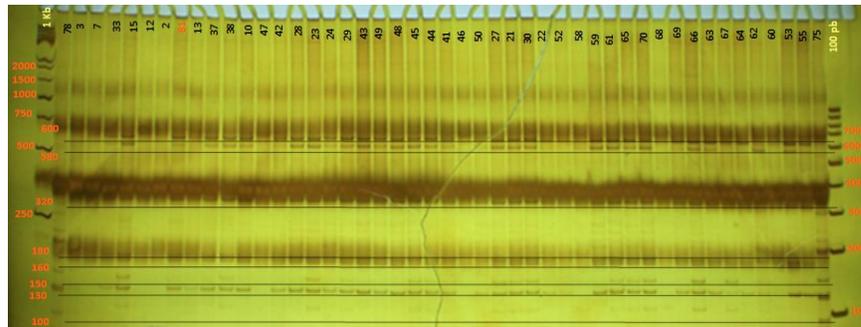
Anexo X. Perfiles RFLPs con la enzima *HhaI* para el cuarto bloque de muestras vegetales e insectiles. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.



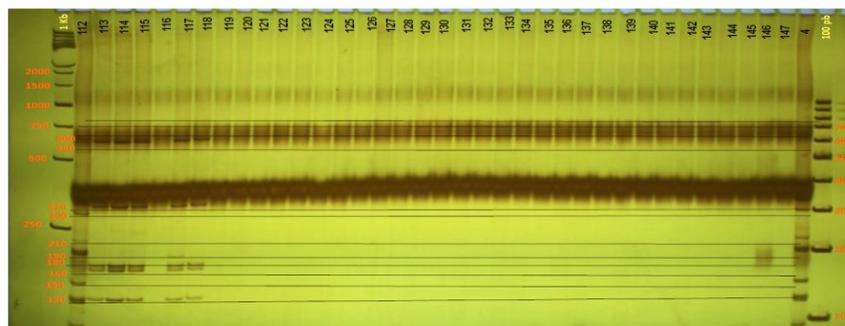
Anexo XI. Perfiles RFLPs con la enzima *HinfI* para el primer bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.



Anexo XII. Perfiles RFLPs con la enzima *Hinfi* para el segundo bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.



Anexo XIII. Perfiles RFLPs con la enzima *Hinfi* para el tercer bloque de muestras vegetales. El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.



Anexo XIX. Perfiles RFLPs con la enzima *Hinfi* para el segundo bloque de muestras vegetales e insectiles El marcador de peso molecular de 1 kb y de 100 pb se ubicaron en los extremos para referencia.