



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Análisis de la dinámica de poblaciones de '*Candidatus
Liberibacter asiaticus*' en limón mexicano (*Citrus aurantifolia
Swingle*).**

Tesis que presenta

José Abel López Buenfil

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: **Dra. Beatriz Xoconostle Cázares**

Ciudad de México

Marzo, 2017.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio 24 de Biología Molecular de Plantas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, campus Zacatenco; Laboratorio de Biología Molecular de la Dirección General de Sanidad Vegetal del SENASICA y en el Rancho el Pandelo y las Animas ubicado en Tecomán, Colima; bajo la dirección de la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y la asesoría de: Dr. Roberto Ruiz Medrano, Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV; la Dra. Rosalía Lira Carmona del Centro Médico Nacional Siglo XXI; Dr. Jesús Hinojosa Moya de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga de la Dirección General de Sanidad Vegetal; durante el periodo de mayo de 2013 a diciembre de 2016.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares por su invaluable apoyo y confianza brindada al darme la oportunidad de aprender de su experiencia, guiarme en este camino tan interesante de la Biotecnología y por brindarme la dirección durante toda mi estancia en el CINVESTAV.

Al Dr. Roberto Ruíz Medrano, por su valiosa y acertada orientación durante todo el proceso de investigación, contagiándome del gusto y la pasión por la investigación científica,

A mi asesores la Dra. María del Carmen Montes Horcasitas, la Dra. Rosalía Lira Carmona, el Dr. Jesús Hinojosa Moya y el Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga por brindar sus acertados puntos de vista durante el desarrollo del presente trabajo y colaborar con ideas que ayudaron a enriquecer este proyecto.

Al Dr. Francisco Javier Trujillo Arriaga, por su apoyo en todo momento, sus consejos y orientación durante mi desarrollo profesional en el SENASICA, y por haberme enseñado y contagiado con la mentalidad de que **“todas las políticas y medidas que se apliquen en materia fitosanitaria deben contar con el soporte técnico científico respectivo”**, mentalidad que comparto en su totalidad.

Al MVZ. Enrique Sánchez Cruz, por su comprensión y apoyo para el cumplimiento de este objetivo académico y profesional en la vida.

Al Ing. Óscar Melesio Soto Ramos, quien nos brindó las facilidades para realizar los experimentos y tomas de muestra en su huerta de limones del Rancho 'El Pandelo y las Animas', en Tecomán.

A mis compañeros del Laboratorio de 24 del Departamento de Biotecnología y del Laboratorio de Biología Molecular de la Dirección General de Sanidad Vegetal, por sus asesorías extraordinarias en la implementación de las técnicas moleculares usadas en el presente trabajo.

Al M.C. Claudio Chavarín Palacio, el M.C. José Abrahán Ramírez Pool y el M.C. José Manuel Cambrón Crisantos, por su apoyo técnico y acompañamiento en esos viajes de colectas, las tardes y fines de semana enclaustrados en los laboratorios.

Al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, por el soporte brindado y todas las satisfacciones profesionales y personales que me ha permitido vivir.



DEDICATORIA

Al ***Eterno Creador del Universo***, que ha permitido con su benevolencia tener una gran familia y encontrarme también a buenos seres humanos en mi camino, de los cuales he aprendido a que enfrentar la vida; no ha sido cosa sencilla, pero aun con sus momentos de complejidad tienes que vivirla con plenitud, siempre dispuesto a salir adelante, buscando la *Shalom* con todos.

A mi esposa *Susana*, amiga amada y compañera del camino; a mis hijos *Obed*, *Salma M.* y *Gadiel*, (los regalos del Eterno, que tanto quiero) por estar conmigo en las buenas y en las no tan buenas, apoyándome en todo momento, son el combustible que me motiva a esforzarme cada día un poco más en las cosas que puedo hacer.

A mis Padres *José Luís*, *Ma. Guadalupe* y a mis Hermanos *Llimi*, *Ma. Luisa*, *Elsa*, *Raquel*, de quienes casi siempre he estado lejos físicamente, pero cerca de ellos en mi corazón, planes y pensamientos.



CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| INDICE DE FIGURAS..... | 8 |
| INDICE DE CUADROS | 10 |
| GLOSARIO | 11 |
| RESUMEN | 14 |
| ABSTRACT..... | 16 |
| INTRODUCCIÓN..... | 18 |
| Citricultura a Nivel Mundial | 18 |
| Naranja..... | 19 |
| Jugo de naranja | 21 |
| Limones..... | 22 |
| Consumo y comercio | 22 |
| El limón mexicano en el mundo | 22 |
| Citricultura en México | 24 |
| Limón mexicano en México..... | 25 |
| Enfermedades de los cítricos | 26 |
| Tristeza de los cítricos..... | 26 |
| Cancro de los cítricos | 27 |
| Leprosis de los cítricos..... | 28 |
| Clorosis variegada de los cítricos..... | 29 |
| Agente asociado..... | 32 |
| Etiología..... | 32 |
| Relación filogenética de HLB | 34 |
| <i>Diaphorina citri</i>..... | 35 |
| Dispersión del Huanglongbing | 36 |
| EMA-qPCR..... | 36 |
| Dinámica de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en árboles de naranja dulce | 38 |
| Florida, Estados Unidos | 38 |
| Paraná, Brasil | 39 |
| Quorum sensing..... | 40 |
| Situación del HLB en México | 41 |
| Situación fitosanitaria actual..... | 42 |
| Estrategias de manejo del Huanglongbing de los cítricos | 43 |
| JUSTIFICACIÓN | 45 |

| | |
|---|----|
| OBJETIVOS | 46 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 47 |
| Selección de plantas para el establecimiento del trabajo | 47 |
| Diagnóstico de muestras colectadas en Tecomán, Colima | 48 |
| Extracción de ADN total | 48 |
| Protocolo de extracción | 49 |
| PCR Convencional | 50 |
| Instalación del experimento | 51 |
| Toma de muestra para cuantificación de carga bacteriana | 52 |
| Cuantificación de bacterias vivas y muertas en hojas jóvenes y maduras | 53 |
| Extracción de DNA de bacterias vivas | 54 |
| Obtención del plásmido para la cuantificación absoluta | 55 |
| Extracción del ADN plasmídico | 56 |
| Confirmación del inserto por PCR | 58 |
| Cuantificación de C. Las por qPCR | 58 |
| Trampeo de adultos de Psílido Asiático de los Cítricos | 60 |
| Datos de tiempo atmosférico | 60 |
| Análisis estadístico de la información | 61 |
| RESULTADOS | 62 |
| Dinámica de C. Las en árboles de limón mexicano | 63 |
| Diferencias en las concentraciones de C. Las entre hojas jóvenes y maduras | 66 |
| Dinámica de la población de C. Las en 2015 | 68 |
| Condiciones climáticas durante el estudio | 72 |
| Asociación entre población de C. Las y variables externas | 73 |
| DISCUSIÓN | 76 |
| Dinámica de C. Las en árboles de limón mexicano | 76 |
| Diferencias en las concentraciones de C. Las entre hojas jóvenes y maduras | 79 |
| Condiciones de tiempo atmosférico durante el estudio | 79 |
| Posible efecto de “Quorum sensing” en C. Las | 80 |
| CONCLUSIONES | 82 |
| PERSPECTIVAS | 83 |
| LITERATURA CITADA | 85 |
| ANEXOS | 95 |

**PROGRAMA DE SAS PARA ANÁLISIS ESTADÍSTICO GLOBAL DE DINAMICA
POBLACIONAL DE CLAS EN MUESTRAS VEGETALES DE LIMÓN MEXICANO, DE
TECOMÁN, COLIMA. 2013 A 2015..... 95**

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Producción mundial de naranjas (USDA, 2016)..... | 20 |
| Figura 2. Producción mundial de jugo de naranja y consumo (USDA, 2016)..... | 21 |
| Figura 3. Modo de acción del Bromuro de Etidio Monoazida (EMA)..... | 37 |
| Figura 4. Dinámica de C. Las, en árboles de naranja dulce. Florida, EU. | 38 |
| Figura 5. Dinámica de C. Las, en árboles de naranja dulce. Paraná, Brasil. | 39 |
| Figura 6. Estatus fitosanitario del Huanglongbing en México (el color rojo indica los sitios donde se ha detectado HLB en material vegetal). | 43 |
| Figura 7. Panorama del rancho el Pandelo y las Ánimas, Tecomán, Colima..... | 48 |
| Figura 8. Esquema de distribución de árboles infectados por C. Las, Tecomán, Colima. | 52 |
| Figura 9. Mapa del vector PGEM, utilizado para la clonación del fragmento 16S de C. Las.... | 56 |
| Figura 10. Productos del PCR, utilizados para el diagnóstico de C. Las. En el primer carril de izquierda a derecha se muestra el marcador molecular; en el segundo, el negativo, del tercero al quinto las muestras y en el sexto el control positivo..... | 62 |
| Figura 11. Curva estándar de calibración utilizada para estimar la concentración de C. Las, en los árboles de limón mexicano infectados con HLB..... | 63 |
| Figura 12. Dinámica de la concentración de bacterias vivas y muertas de C. Las, en el periodo de estudio. Tecomán, Colima. Octubre de 2013 a diciembre de 2015. Barras de error en cada columna, representan una desviación estándar (n=13)..... | 64 |
| Figura 13. Cuantificación de bacterias vivas y muertas entre hojas jóvenes y maduras en limón mexicano, durante el periodo de octubre de 2013 a diciembre de 2015. Tecomán, Colima. Barras de error en cada columna representan una desviación estándar (n=13). | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Cuantificación de bacterias vivas y muertas por tipo de hoja, y por época del año, en limón mexicano, en el periodo de estudio. Primavera (A y B) Verano (C y D) Otoño (E y F) Invierno (G y H). Tecomán, Colima. Enero a diciembre de 2015. Barras de error en cada columna representa una desviación estándar (n=4)..... | 70 |
| Figura 15. Condiciones meteorológicas principales durante el periodo de estudio. Tecomán, Colima. Octubre de 2013 a diciembre de 2015. | 72 |
| Figura 16 Conteo promedio semanal de adultos de PAC durante el periodo de estudio, en limón mexicano. Tecomán, Colima. De enero a diciembre de 2015. Barras de error en cada promedio representan una desviación estándar (n=13)..... | 76 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Nombres comunes del limón mexicano a nivel internacional. | 23 |
| Cuadro 2. Referencias de superficie cultivada de limón mexicano. | 23 |
| Cuadro 3. Principales regiones productoras de cítricos en México. | 24 |
| Cuadro 4. Indicadores de la producción citrícola en México. | 25 |
| Cuadro 5. Agentes bacteriales asociados con la sintomatología del HLB. Tomado de: Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening (2010). | 34 |
| Cuadro 6. Mezcla de reacción de PCR punto final para la detección de C. Las. | 50 |
| Cuadro 7. Tamaño de muestra para la cuantificación de la carga bacteriana en limón mexicano, en Tecomán, Colima. | 52 |
| Cuadro 8. Soluciones utilizadas para la extracción de ADN plasmídico. | 58 |
| Cuadro 9. Primers y sondas utilizados para la reacción de PCR en tiempo real de C. Las. | 58 |
| Cuadro 10. Mezcla de reacción utilizada para la detección de C. Las por PCR en tiempo real. | 59 |
| Cuadro 11. Comparación de concentración promedio de células vivas y muertas de C. Las por fecha de evaluación en limón mexicano, en el periodo de estudio. Promedios con la misma literal en cada columna, no son estadísticamente diferentes (Tukey $p < 0.05$). | 66 |
| Cuadro 12. Comparación de concentración promedio de C. Las entre hojas maduras y jóvenes. Periodo de octubre de 2013 a diciembre de 2015. Tecomán, Colima. | 68 |
| Cuadro 13. Concentración promedio de C. Las entre hojas maduras y jóvenes, por época del año. Enero a diciembre de 2015. Tecomán, Colima. Promedios con literales similares entre columnas, no son estadísticamente diferentes (Tukey $p < 0.05$). DMS= Diferencia Mínima Significativa de Prueba de Tukey. | 71 |
| Cuadro 14. Asociación de variables de dinámica de población de C. Las en material vegetal de limón mexicano, con variables atmosféricas en Tecomán, Colima. | 74 |

GLOSARIO

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ANOVA: Análisis de Varianza, técnica estadística que utiliza modelos estadísticos y sus procedimientos asociados, que permite calcular la varianza particionada, en ciertos componentes, debidos a diferentes variables explicativas.

ARN: Ácido Ribonucleico.

C. Las: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, denominación técnica científica de la partícula bacterial asociada con la enfermedad del amarillamiento de los cítricos.

CINVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

CRISPR-Cas: Los CRISPR (en inglés: clustered regularly interspaced short palindromic repeats, en español repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) son loci de ADN que contienen repeticiones cortas de secuencias de bases.

CT: Cycle Threshold, Es el valor del número de ciclos en el cual la luminiscencia generada de una reacción, cruza un umbral de fluorescencia significativo.

***Diaphorina citri* [Kuwayama]:** Nombre científico del insecto vector asociado con la distribución de C. Las.

DMS: Diferencia Mínima Significativa, Cantidad de error asociada con la distribución de promedios asociados en una comparación estadística global, derivada de la prueba de TUKEY en el sistema SAS.

EMA: Ethidio Monoazida.

HLB: Huanglongbing, nombre común, dado en China, a la enfermedad del amarillamiento de los cítricos.

IMSS: Instituto Mexicano de Seguridad Social.

IPN: Instituto Politécnico Nacional.

LOCI: Un locus (en latín, lugar; el plural es loci, pronunciado loki) es una posición fija en un cromosoma, como la posición de un gen o de un marcador.

PAC: (ACP en Inglés): Psílido Asiático de los Cítricos, nombre común del insecto vector asociado con la dispersión de la partícula bacteriana *C. Las*.

PRIMERS: Un partidor, cebador, iniciador; es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada, que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Quorum sensing: La percepción o autoinducción (en inglés, quorum sensing) es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular.

RCP (PCR en Inglés) Punto final: Reacción en Cadena de la Polimerasa, técnica de Biología Molecular para hacer investigación científica sobre el ADN.

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SAS: Statistical Analysis System, Sistema de Análisis Estadístico asociado con el desarrollo de conceptos agronómicos y su influencia en la experimentación agrícola.

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, dependiente de la SAGARPA.

TUKEY: Apellido de John W. Tukey, estadístico de la Estación Experimental de Rottamstead en Inglaterra, tomado para denominar la prueba de comparación múltiple de promedios. El método de Tukey se utiliza en ANOVA para crear intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error.

RESUMEN

La enfermedad de cítricos Huanglongbing (HLB) está asociada a la bacteria "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (C. Las), y ha impactado severamente a la industria citrícola, causando una reducción significativa en su producción, así como en la calidad del fruto. Esta investigación consistió en monitorear la dinámica poblacional de C. Las, en árboles sintomáticos de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Swingle)], mismos que fueron identificados como positivos a HLB. Dicho estudio se realizó en Tecomán, Colima, región tropical de México, productora de cítricos. Con el objeto de conocer los sitios donde la bacteria se acumula preferencialmente y su dinámica en función del tiempo, se colectaron muestras de hojas jóvenes y maduras fotosintéticas. Éstas se colectaron cada dos meses en un periodo de 26 meses para la cuantificación de los títulos de bacteria; asimismo se cuantificó la proporción de bacterias vivas y muertas utilizando la técnica denominada EMA-qPCR, la cual emplea Bromuro de etidio monoazida para discriminar las células muertas y vivas. Se observó un bajo título de bacteria a altas temperaturas en árboles infectados, en contraste a lo observado en clima templado; a pesar de la presencia significativa del insecto vector *Diaphorina citri*. Esta investigación también identificó fluctuaciones en los títulos de bacteria cuando se compararon hojas jóvenes y maduras. No se observó una correlación estadísticamente significativa entre las variables meteorológicas, la concentración de C. Las y los conteos de insectos adultos de *D. citri*. A pesar de que las estrategias de manejo de esta enfermedad se han enfocado al control del vector. La evaluación de la fenología del cultivo, la concentración de C. Las, la población

de *D. citri*, así como la estimación del efecto del medio ambiente ha permitido identificar las variaciones cíclicas estacionales del patógeno asociado a HLB, así como de su vector. Los resultados obtenidos nos permitirán diseñar estrategias de manejo integral de la enfermedad, tomando en cuenta la acumulación de la bacteria y la presencia de su vector.

ABSTRACT

The bacterial disease citrus Huanglongbing (HLB), associated with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (*C. Las*) has severely impacted the citrus industry, causing a significant reduction in production and fruit quality. In the present study, we monitored the *C. Las* population dynamics in symptomatic, HLB-positive Mexican lime trees (*Citrus aurantifolia* Swingle) in a tropical, citrus-producing area of Mexico.

In the present research, leaf samples were collected every two months over a period of 26 months for quantification of bacterial titers, and young and mature leaves were collected in each season to determine preferential sites of bacterial accumulation. The proportion of living and dead bacterial cells could be determined through the use of quantitative real-time PCR in the presence of ethidium monoazide (EMA-qPCR).

We observed a lower bacterial titer at high temperatures in the infected trees relative to titers in mild weather, despite a higher accumulation of the insect vector *Diaphorina citri* in these conditions. The study also revealed seasonal fluctuations in the titers of bacteria in mature leaves when compared to young leaves. No statistically significant correlation between any meteorological variable, *C. Las* concentration, and *D. citri* population could be drawn. Although HLB management strategies have focused on vector control, host tree phenology may be important. The evaluation of citrus phenology, *C. Las* concentration, ACP population, and

environmental conditions provides insights into the cyclical, seasonal variations of both the HLB pathogen and its vector.

Our findings should help in the design of integrative HLB control strategies that take into account the accumulation of the pathogen and the presence of its vector.

INTRODUCCIÓN

Citricultura a Nivel Mundial

La mayoría de los investigadores coinciden en que el origen de los cítricos se centra en las regiones subtropicales y tropicales de Asia, en la cuales se incluyen China e India (Swingle y Reece, 1997; Webber, 1967; Krueger y Navarro, 2007), y se fue distribuyendo desde el continente asiático a varias partes del mundo, con clima cálido. Existe una zona en la cual se produce la mayor parte de los cítricos a nivel mundial, comprendida entre las latitudes 40° Norte y 40° Sur (Gmitter *et al*, 2007); los climas propicios para la producción de este cultivo son el tropical y subtropical, debido a la disponibilidad de agua y a las temperaturas moderadas durante el invierno. Sin embargo, las regiones con mayor producción se encuentran entre los 20° Norte y 20° Sur (Morton *et al*, 2003).

Las especies más cultivadas a nivel mundial son: naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), naranja agria (*Citrus aurantium* L.), mandarina (*Citrus reticulata* Blanco), limón (*Citrus limon* L. Burm), lima dulce (*Citrus limetta* Risso), lima ácida (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle), (*Citrus latifolia* Tan), toronja (*Citrus paradisi* Macf), pomelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) y cidra (*Citrus medica* L) (Orozco *et al*, 2014).

Por la superficie cosechada y los volúmenes de producción de fruta, así como su amplio consumo y valor alimenticio, los cítricos se ubican como uno de los cultivos de frutas más importantes del mundo (Robles-Gonzalez *et al*, 2014). De acuerdo a los datos de la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2016), para el año 2014, se registró una producción de 109.5 millones de toneladas de

fruta (naranja, lima, limón, toronja y pomelo). Se ha observado una baja en la producción en comparación con años anteriores, y se debe a factores tanto bióticos como abióticos. Entre ellas, altas temperaturas en épocas del año inusuales; así como, las sequías, son responsables de los daños ocasionados al cultivo, que dan como resultado pérdidas en la producción; por otro lado están las enfermedades de origen biótico, ocasionadas por diferentes patógenos, tal como el Huanglongbing "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (HLB), que en los últimos años ha ocasionado daños graves en la citricultura de distintos países (Bové *et al.*, 2006; Gottwald, 2007).

Naranja

La producción mundial de naranjas para el ciclo 2015-2016, fue estimada en 3 millones de toneladas métricas menor al ciclo anterior, que reporto 45.8 millones de toneladas, esto porque la producción de cítricos declinó en Brasil, Estados Unidos y México; sin embargo, fue compensada por China, Unión Europea y Egipto. La fruta destinada a la industria bajó 2.8 millones de toneladas, como efecto de la reducción reportada en Brasil y Estados Unidos (Figura 1). Las exportaciones no se vieron tan afectadas debido a que la mayor disminución se dio en la producción destinada para la industria (USDA, 2016).

Producción mundial de naranjas

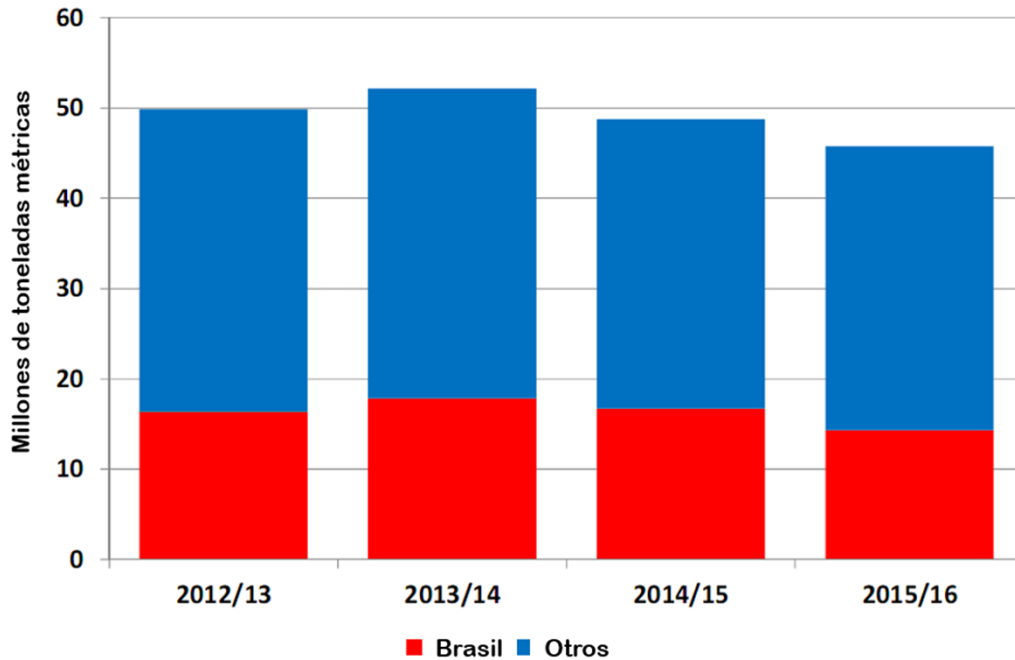


Figura 1. Producción mundial de naranjas (USDA, 2016).

En Brasil, durante el 2016 la producción de naranja presentó un decremento en el volumen de 16.8 a 14.4 millones de toneladas, debido a las altas temperaturas que se presentaron en los meses de septiembre y octubre, lo cual provocó daños en el fruto. La producción destinada a la industria se redujo drásticamente y esto impactó directamente al consumo (USDA, 2016).

En los Estados Unidos, se prevee que en el año 2017, la producción presente un decremento de 5.8 a 5.4 millones de toneladas. Debido a que, en los últimos años, el HLB ha afectado directamente la producción de naranjas en Florida, en el rendimiento y la disminución de áreas citrícolas. La mayor producción para exportación y consumo, proviene de California, mientras que la producción

destinada a la industria se verá afectada directamente ya que depende de las áreas cítricas de Florida (USDA, 2016).

Jugo de naranja

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, la producción mundial de jugos de naranja será directamente afectada en 2017, debido a los problemas que actualmente enfrentan los productores del continente, lo cual impacta las importaciones de este producto (Figura 2).

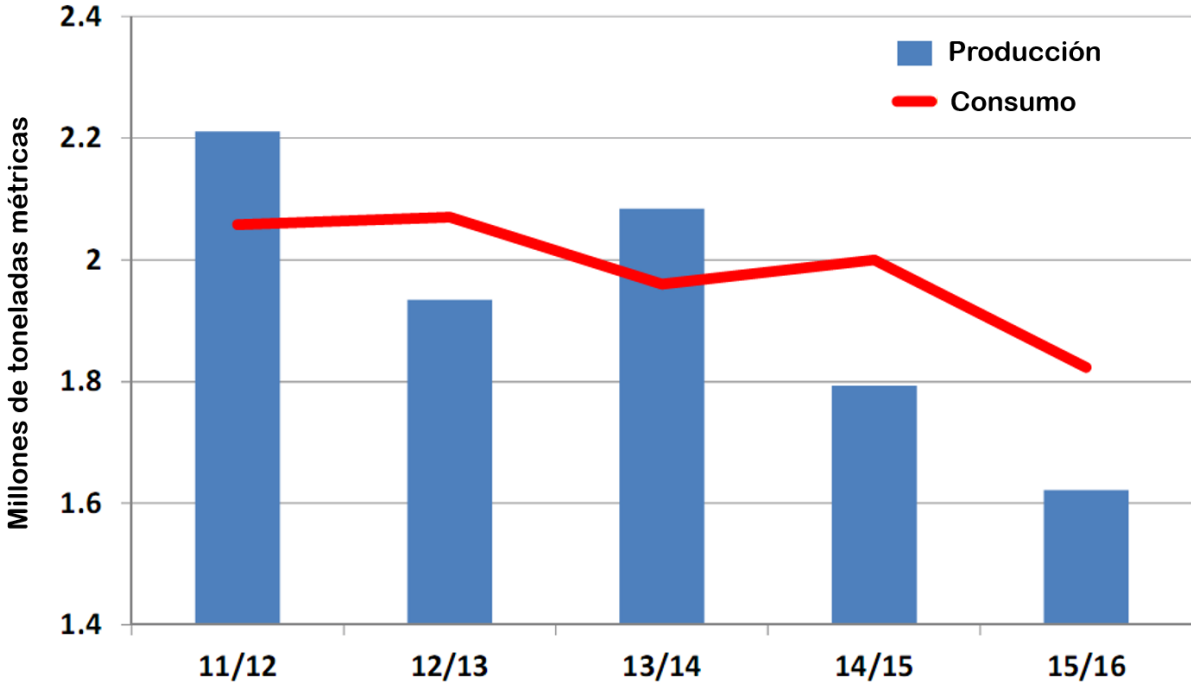


Figura 2. Producción mundial de jugo de naranja y consumo (USDA, 2016).

Limones

Los limones son frutos ácidos por lo cual se consumen principalmente con otros alimentos; por tal motivo están destinados al mercado de los frutos frescos. En la industria, el zumo es utilizado para dar sabor a las bebidas y otros alimentos (FAO, 2017).

Consumo y comercio

España, Argentina y México son los exportadores más importantes de este grupo de cítricos. España y Argentina dominan el mercado mundial de exportaciones de limones frescos. México es el mayor exportador de limas frescas, aproximadamente el 20% de su producción se exporta, mientras que más del 50% de la producción es comercializada de forma industrial. Argentina e Italia son los principales proveedores de zumo de limones (FAO, 2017).

Con caídas en la producción de limas en Florida y un estancamiento en la producción de limones en California y Arizona, E.U. se convertirá en el mayor importador de limas y limones frescos (FAO, 2017).

El limón mexicano en el mundo

El limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] es un cítrico ampliamente conocido en muchos países y ha recibido muchos nombres locales, los cuales se registran en el cuadro 1. (Morton, 1987; Crane 2013).

Cuadro 1. Nombres comunes del limón mexicano a nivel internacional.

| País | Nombre que recibe |
|----------------|---|
| Alemania | Limett |
| Brasil | Limón gallego |
| Chile | Limón pica |
| Egipto | Baladi |
| Estados unidos | Mexican lime; key lime o west indian lime |
| Filipinas | Dayap |
| Francia | Limettier acide |
| India | Nimbu o kagzi nimbu |
| Italia | Limetta |
| Marruecos | Doc |
| México | Limón mexicano o limón criollo |
| Perú | Limón sutil |

Aunque es ampliamente distribuido en muchos países, en la mayoría de ellos no existe suficiente información estadística de su cultivo y volúmenes de producción, que permita conocer la situación que guardan respecto a México. Algunos documentos publicados en revistas técnicas y científicas, presentan información que resulta confusa e incompleta, según se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Referencias de superficie cultivada de limón mexicano.

| País | Superficie sembrada (ha) | Referencia |
|-------|--------------------------|-------------------------------|
| Chile | 86 | Vandecandelaere y Mery, 2007 |
| Nepal | 2,635 | Shrestha <i>et al.</i> , 2012 |

| | | |
|-------------|--------|------------------------------|
| Oman | 1,209 | Zadjali <i>et al.</i> , 2008 |
| Perú | 18,000 | Vegas y Narrea., 2011 |

Citricultura en México

De acuerdo con Orozco-Santos *et al.* (2013) México cuenta con una variedad de regiones geográficas que presentan condiciones de clima adecuadas para el cultivo de las distintas especies de cítricos y ha desarrollado una fuerte industria dedicada a la producción de esta fruta, principalmente de naranjas, limón mexicano y limón persa. México cuenta con regiones citrícolas importantes, como se puede observar en el cuadro 3.

Cuadro 3. Principales regiones productoras de cítricos en México.

| Región | Estados |
|--------------------------------------|--|
| Golfo de México | Veracruz y Tabasco |
| Noroeste | Nuevo León y Tamaulipas |
| Huastecas | San Luis Potosí, Hidalgo y norte de Veracruz |
| Península de Yucatán | Yucatán, Quintana Roo y Campeche |
| Vertiente del Pacífico | Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Colima, Jalisco y Nayarit |
| Planicie costera del noroeste | Sonora, Baja California Sur y norte de Sinaloa |

La citricultura en México es una actividad de gran importancia económica y social dentro de la fruticultura nacional. Esta actividad abarca 560,604.13 ha en las regiones tropicales y subtropicales en 24 estados del país.

La producción se estima en 7'656,535.65 toneladas de cítricos con un valor comercial de un poco más de 17 mil millones de pesos (SIAP, 2015) (Cuadro 4). México se mantiene en el quinto lugar con mayor producción de cítricos a nivel mundial.

Cuadro 4. Indicadores de la producción citrícola en México.

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

* Se incluyen todas las especies de limón

Limón mexicano en México

El limón mexicano pertenece al grupo de las limas ácidas de la familia botánica Rutaceae y, se sabe que son sensibles a bajas temperaturas (Robles-González *et al.*, 2013). El limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle], puede ser propagado por semillas o vegetativamente. Los árboles son vigorosos, con muchas espinas, las hojas son pequeñas y redondas, las flores son blancas con pétalos curvados hacia el eje de la flor y florece todo el año. (Agusti, 2003; Orozco-Santos *et al.*, 2014).

En 2015 se reportaron aproximadamente 81,221 ha con limón mexicano. Los principales estados productores son: Michoacán con 42,931 ha, Colima con 18,996 ha, Oaxaca con 8,498 ha y Guerrero con 6,856 ha, de acuerdo con los datos reportados hasta el ciclo 2015 (SIAP, 2016). La producción anual de fruta de limón mexicano supera el millón de toneladas con un valor superior a los 3 mil millones de pesos. La importancia de esta agroindustria radica en que dependen aproximadamente 69 mil productores y genera cerca de 154 mil empleos directos, además, de que se ligan 138 empacadoras, 110 enceradoras, 22 plantas jugueras, 5 gajeras y alrededor de 60 viveros certificados (Manzanilla *et al.*, 2015; Robles *et al.*, 2011; IICA, 2010).

Enfermedades de los cítricos

En la citricultura existe una gran diversidad de problemas fitosanitarios que afectan el desarrollo de las plantas y ocasionan daños en el desarrollo y producción de plantas, algunos de estos problemas se describen a continuación.

Tristeza de los cítricos

Tiene como agente causal al *Citrus tristeza virus* (CTV), virus confinado al floema que se transmite de manera semi-persistente por áfidos (Hemiptera: Aphididae), entre los que se reportan a *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *A. craccivora*, *Toxoptera aurantii* y *T. citricida*, este último es considerado el vector de mayor eficiencia (Loeza-Kuk *et al.*, 2008; Raccah, 1980; Hermoso de Mendoza *et al.* 1984;

Gottwald *et al.* 1997). Históricamente la tristeza de los cítricos ha sido una de las enfermedades más agresivas de los cítricos, siendo responsable de la muerte de, al menos, 100 millones de árboles en el siglo pasado (Moreno *et al.*, 2008). En América, el primer reporte de esta enfermedad, fue en el 1940.

En México, el CTV se detectó por primera vez en 1983, en el estado de Tamaulipas; actualmente está presente en 21 estados citrícolas del país; mientras que el vector [*Toxoptera citricida* (Kirk.)] se sabe que ingresó en el año 2000 por la península de Yucatán (Loeza-Kuk *et al.*, 2008).

Cancro de los cítricos

Esta enfermedad es causada por la bacteria *Xanthomonas citri*. Las pérdidas económicas se deben principalmente a la defoliación, abscisión prematura y manchado del fruto. Los árboles jóvenes son más susceptibles a *X. citri*, por lo que pueden resultar infectados hasta el 100% de sus frutos y hojas. La severidad tiende a aumentar con el tiempo, mientras que el rendimiento se reduce paulatinamente. No se tienen datos específicos sobre pérdidas económicas en diferentes regiones y países; sin embargo, la enfermedad es sujeta de medidas cuarentenarias que se aplican para regular el comercio internacional (CABI, 2014; SENASICA, 2016).

Actualmente en México se realizan actividades de vigilancia epidemiológica fitosanitaria para la detección temprana del cancro bacteriano de los cítricos, a través del Programa Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria, en los estados de: Baja California, Baja California Sur, Campeche, Colima, Chiapas,

Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (SAGARPA-SENASICA-PVEF, 2016). Como resultados de estas acciones a la fecha no se han detectado muestras positivas a esta plaga. Por lo anterior, y de acuerdo con la NIMF No. 8 (CIPF, 2006), *Xanthomonas citri* se considera una plaga ausente en México.

Leprosis de los cítricos

Causada por *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), esta enfermedad se considera como una de las más importante en la industria citrícola. En Brasil, cada año se invierten 80 millones de dólares para el control del ácaro vector del género *Brevipalpus sp.* (Bastianel *et al.*, 2010). Esta enfermedad es considerada de importancia económica en varios países del Centro y Sudamérica y ha causado pérdidas económicas considerables durante 15 años en Argentina, Uruguay, Venezuela, Costa Rica, Panamá, Honduras, Guatemala y recientemente en Perú, Bolivia y Colombia; este último país, cuanta con 45,000 has cultivadas con cítricos y una producción de 750,000 toneladas, actualmente se encuentran amenazadas por la presencia del virus, razón por la cual este país ha *llegado* a desarrollar programas de control, prevención, y cuarentenarios con el fin de evitar su diseminación hacia otras regiones productoras de cítricos (León *et al.*, 2016).

De acuerdo a la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias NIMF No. 5, Glosario de términos fitosanitarios (CIPF, 2004), para el caso México, el *Citrus Leprosis Virus C*, cumple con la definición de plaga cuarentenaria, ya que se

encuentra presente solo en algunas áreas (Chiapas, Tabasco, Querétaro y Veracruz), y sujeta a control oficial; además, puede causar pérdidas económicas potenciales en cultivos hospedantes.

Clorosis variegada de los cítricos

(*Xylella fastidiosa subsp. pauca*) se ha descrito como una de las enfermedades más destructiva de la naranja dulce; en Brasil se ha dispersado rápidamente en grandes extensiones cultivadas con naranja, afectando a 1.8 millones de árboles (EPPO/CABI, 2009) y ocasionando pérdidas anuales por 100 millones de dólares (Li *et al.*, 2002). La rápida dispersión de esta enfermedad a través de los huertos y el gran daño que causa, tiene como resultado pérdidas económicas de aproximadamente 150 millones de dólares al año para los productores e industria del jugo en el estado de Sao Paulo, región citrícola más importante de Brasil (Amaro *et al.*, 1998). Además, Fundecitrus (2009) indica que en diversos estudios acerca de la diseminación de CVC en el estado de Sao Paulo, la proporción de plantas infectadas aumentó de 22% en 1996 a 43% en 2005 (Caruso *et al.*, 2007).

Según la NIMF No. 8, Determinación de situación de una plaga en área (CIPF, 2006), la clorosis variegada de los cítricos *Xylella fastidiosa subsp pauca* es una plaga ausente en México; no hay registro de presencia de la plaga.

Huanglongbing de los cítricos

El origen del Huanglongbing "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" se ha considerado en China (Zhao, 1981). En huertas del sur de China, se observaron síntomas de amarillamiento en plantas de cítricos a finales de 1800, lo cual se conoció con el nombre de "Huanglongbing" (Enfermedad de los brotes amarillos). Esto fue confirmado por When Li (1956), en su estudio realizado a finales de 1940; fueron varias personas quienes respaldaron esta teoría (Da Graça, 1990; Da Graça & Korsten, 2004; Bové, 2006).

El HLB, es considerada hasta el momento como otra de las enfermedades más devastadoras en cítricos, (Bové, 2006; Manjunath *et al.*, 2008). Por tal motivo es considerada una prioridad para muchos investigadores y gobiernos en el mundo. Esta enfermedad se encuentra presente en los continentes Asiático, Africano y Americano; en más de 39 países; sin embargo, *Candidatus Liberibacter africanus* (C. Laf) se distribuye en África y Asia; *Candidatus Liberibacter americanus* (C. Lam) únicamente se encuentra en Brasil y recientemente se reportó *Candidatus Liberibacter caribbeanus* (C. Lca) en Colombia. Mientras que *Candidatus Liberibacter asiaticus* (C. Las), es la que se encuentra más distribuida en Asia y América (Santivañez *et al.*, 2014; EPPO, 2015). Esta enfermedad es capaz de afectar a todas las especies comerciales de cítricos y es la responsable del declive de la industria citrícola en varios países del sudeste asiático, Península Arábiga, el sur y la costa de África y recientemente en América (Bassanezi *et al.*, 2006; Bové, 2006).

La importancia de esta enfermedad se debe, además de lo destructiva, a que hasta el momento no se conoce cura o tratamiento efectivo para los árboles una vez que han sido infectados (Gottwald *et al.*, 2007).

Se considera que Lin (1956), determinó por primera vez que la bacteria puede ser transmitida por inoculación con injertos positivos a la enfermedad. Adicionalmente, asumió la existencia de un vector transmisor de la enfermedad, para poder explicar la infección de aquellos árboles que no habían sido injertados. Unos años después en Sudáfrica, los investigadores McClean y Oberholzer (1965a, 1965b), corroboraron que HLB es transmitida por inoculación por injertos y también por el vector africano *Trioza erytrae*. Para el año 1967, Martínez y Wallace, demostraron que la enfermedad podía ser transmitida por el Psílido Asiático de los Cítricos (PAC) *Diaphorina citri* (Jagoueix *et al.*, 1994).

Para el año 1967, estaba demostrado que la enfermedad se transmitía por inoculación con injertos y también por dos psílicos vectores, *D. citri* y *T. erytrae*. Estos resultados indicaban que el patógeno asociado con la enfermedad era un virus, el único agente conocido en esa época capaz de infectar plantas y ser transmitido por estas vías. En ese mismo año, varios investigadores empezaron la búsqueda de este agente en plantas infectadas con el microscopio electrónico, encontrando evidencia del agente asociado en los tubos cribosos de las plantas infectadas, haciendo pensar que se trataba de un micoplasma, un tipo especial de bacteria que carece de pared celular (Lafeche, D. y Bové, J. M., 1970a y 1970b). Sin embargo, esto fue rápidamente descartado cuando se observó que la

membrana citoplasmática estaba rodeada por una capa, que después se demostró con varias técnicas de tinción, se trataba de una pared celular.

Agente asociado

Esta enfermedad está asociada a una alfa-proteobacteria, perteneciente al grupo Gram negativo, que está restringida al floema de las plantas hospederas. Debido a que hasta el momento no se han podido realizar los postulados de Koch, se le ha asignado el nombre provisional de "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". Hoy en día se conocen cuatro especies de esta bacteria, de las cuales, la variante asiática es la que presenta mayor severidad y tolerancia a las altas temperaturas (Bové, 2006).

Etiología

Se reconoce que la etiología de la enfermedad es bacteriana, y que es transmitida por insectos psílidos, pertenecientes a la familia Psyllidae (Hemiptera) (Bové, 2006) (Burckhardt y Ouvrard, 2012), orden taxonómica que incluye otros vectores importantes, como mosquita blanca y áfidos.

De manera semejante a otras enfermedades transmitidas por vectores, una de las estrategias usadas para el control de esta enfermedad es precisamente el control de vectores asociados. Si bien no se conocen con precisión los mecanismos por los que los psílidos transmiten a la bacteria asociada a Huanglongbing, existe evidencia publicada de que estos insectos son capaces de transmitir a

Liberibacter. Por otra parte, los psílidos transmiten patógenos de manera semejante a áfidos, por lo que cabe esperar que los detalles de la transmisión de esta bacteria sean semejantes a otras restringidas al floema (Buchman y Cuddington, 2009).

Las bacterias asociadas con la enfermedad Huanglongbing forman un grupo definido, denominadas de forma general *Candidatus* Liberibacter: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. africanus* y *Ca. L. americanus*. En México sólo se ha reportado a *Ca. L. asiaticus* como la bacteria transmitida por *Diaphorina citri*. Aunque no se ha encontrado en cítricos, hay reportes también de la existencia de *C. L. psyllaourous* (=solanacearum) asociado con *Bactericera cockerelli*, (Hansen *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011) cuyas plantas hospedantes son principalmente cultivos de la familia botánica Solanaceae (Burckhardt *et al.*, 2014) y cultivos de zanahoria y apio (Munyanza *et al.*, 2016) y pera (Haapalainen, 2014; Ouvrard *et al.*, 2016). Para efectos de etiología es importante aclarar que estas bacterias no han sido aisladas hasta el momento; se han hecho algunos intentos (Davis *et al.*, 2008; Sechler *et al.*, 2009), pero no se ha logrado todavía su desarrollo de manera independiente al crecimiento celular del cítrico hospedante, por lo que los postulados de Koch no han sido aplicados para aclarar la relación directa de esta bacteria con los síntomas del HLB y sus efectos. En el cuadro 5 se muestran los diversos agentes bacterianos asociados a la sintomatología que ocasiona el HLB.

Cuadro 5. Agentes bacteriales asociados con la sintomatología del HLB. Tomado de: Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening (2010).

| Agent | Host(s) | Characteristics | Distribution | Natural Vector | References |
|---|--|--|---|--|--|
| HLB Associated Liberibacters | | | | | |
| <i>Candidatus</i> Liberibacter africanus | Citrus spp.; transmissible to periwinkle (<i>Catharanthus roseus</i>) by dodder (<i>Cuscuta campestris</i>) | Sieve-tube restricted; gram-negative; heat sensitive | Africa; Arabian Peninsula; Mauritius; Reunion Islands | <i>Trioza erytraea</i> (African citrus psyllid) | Garnier and Bové, 1983; Jagoueix et al., 1994; Garnier et al., 2000a |
| <i>Candidatus</i> Liberibacter americanus | Citrus spp.; transmissible to periwinkle by dodder | Sieve-tube restricted; gram-negative; heat sensitive | Brazil (São Paulo and Minas Gerais); Hunan, China (unconfirmed) | <i>Diaphorina citri</i> (Asian citrus psyllid) | Teixeira et al., 2005a, b,d,e; Lopes et al., 2009 |
| <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus | Citrus spp.; transmissible to periwinkle, tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i>) and tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i>) by dodder | Sieve-tube restricted; gram-negative; heat tolerant; causes disease at 32–35°C | Asia; Saudi Arabia; Florida; Brazil México | <i>Diaphorina citri</i> (Asian citrus psyllid) | Bové et al., 1974; Garnier and Bové, 1983, 1993; Jagoueix et al., 1994, 1997; Garnier et al., 2000a; Duan et al., 2008 |
| Liberibacters from Non-rutaceous Hosts | | | | | |
| <i>Candidatus</i> Liberibacter psyllauros | Solanaceous crops | 97% sequence similarity with <i>Candidatus</i> Liberibacter asiaticus; causes zebra chip disease in potato | Mexico; Texas; Guatemala México | <i>Bactericera cockerelli</i> (potato/tomato psyllid) | Gudmestad and Secor, 2007; Hansen et al., 2008; Lin et al., 2009 |
| <i>Candidatus</i> Liberibacter solanacearum | Tomato; Chili, Pepper; Potato; Tamarillo; Cape Gooseberry | Likely the same as <i>Candidatus</i> Liberibacter psyllauros | New Zealand | <i>Bactericera cockerelli</i> (potato/tomato psyllid)-possibly | Liefing et al., 2009a, b |
| Phytoplasma Associated with HLB | | | | | |
| Phytoplasma | Citrus; <i>Crotolaria juncea</i> | Sieve-tube restricted; wall-less; has 99% sequence identity with pigeon pea witches' broom phytoplasma (group 16Sr IX) | Brazil (San Paulo) | Not yet known | Teixeira et al., 2008c; Wulff et al., 2009 |
| Phytoplasma | Citrus | Sieve-tube restricted; wall-less; related to <i>Candidatus</i> | China (Guangdong) | | Chen et al., 2009 |

Relación filogenética de HLB

Si bien la relación taxonómica de *Candidatus* Liberibacter spp., con otros grupos no es completamente clara, la secuenciación de su genoma y su comparación con la base de datos existente sugiere que se trata de una alfa-proteobacteria (Duan *et al.*, 2009). Este análisis permitió sugerir que se encuentra relacionada con rizobacterias como *Bradyrhizobium* spp y con *Agrobacterium* spp (Duan *et al.*, 2009).

Diaphorina citri

El origen del insecto vector de la enfermedad (*Diaphorina citri*) se ubica en la India (Hollis, 1987). La identificación taxonómica del insecto *D. citri* asociado con la transmisión de '*Candidatus Liberibacter spp*', *Diaphorina citri*, ocurrió hace más de 100 años por Kuwayama en 1909 y no se había asociado con la manifestación de síntomas de amarillamientos en las plantas hospederas, sino hasta 1929, más de 10 años después (1929). Originalmente se conoció con diferentes nombres comunes tales como: 'amarillamiento de hojas' (Jitouhuang), 'hoja de chile' (Lajiaoye), 'pudrición de raíces' (Genfu) (Deng *et al.*, 2012). La detección inicial de la enfermedad, se acredita a McLean en 1919 en la región de India (Bové, 2006).

Este insecto representa una de las plagas de mayor importancia a nivel mundial, debido a su condición de vector de *Candidatus liberibacter spp*, causante del Huanglongbing de los cítricos (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013). También es responsable de las pérdidas económicas como plaga en otras plantas pertenecientes a la familia Rutaceae, debido a los daños que ocasiona por los hábitos alimenticios como chupador de savia, durante su ciclo biológico (Alemán *et al.*, 2007). Por otro lado, afecta la fotosíntesis de los árboles debido a la mielecilla producida por las ninfas, que a su vez promueven la formación de fumagina (Tsai *et al.*, 2002).

Dispersión del Huanglongbing

Esta enfermedad se ha dispersado principalmente a través de material vegetal infectado y a la transmisión por los psílicos. La dispersión a través de plantas infectadas es la que ha permitido que la enfermedad se mueva a largas distancias y se haya establecido en otros países. Por otro lado, tenemos la transmisión natural la cual está más relacionada con las altas poblaciones del vector y el reservorio del inóculo (Gottwald *et al.*, 2007; Flores-Sánchez, 2011).

El clima juega un papel importante en el proceso de dispersión y severidad de la enfermedad; en Sao Paulo, Brasil, el HLB se ha dispersado y alcanzado más incidencia en regiones con temperaturas cálidas moderadas (Lopes *et al.*, 2013). En la península de Yucatán, México se reportó la presencia de gradientes de dispersión con diferente intensidad a partir de focos iniciales y que la direccionalidad más inductiva es posiblemente influenciada por el factor viento, el cual juega un rol importante en la dispersión del psílido, quien a su vez es vector de C. Las. (Flores-Sánchez, 2011).

EMA-qPCR

Los sistemas de diagnóstico basados en la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) en Tiempo Real o qRT-PCR (quantitative Real Time-PCR), son una opción rápida y altamente sensibles para la detección de patógenos, sin embargo, estos no pueden distinguir células vivas y muertas. El EMA, por sus siglas en inglés, (Ethidium bromide monoazide) es un reactivo capaz de unirse al DNA

procedente de células muertas e impide la amplificación durante la PCR (Wang & Mustapha, 2010).

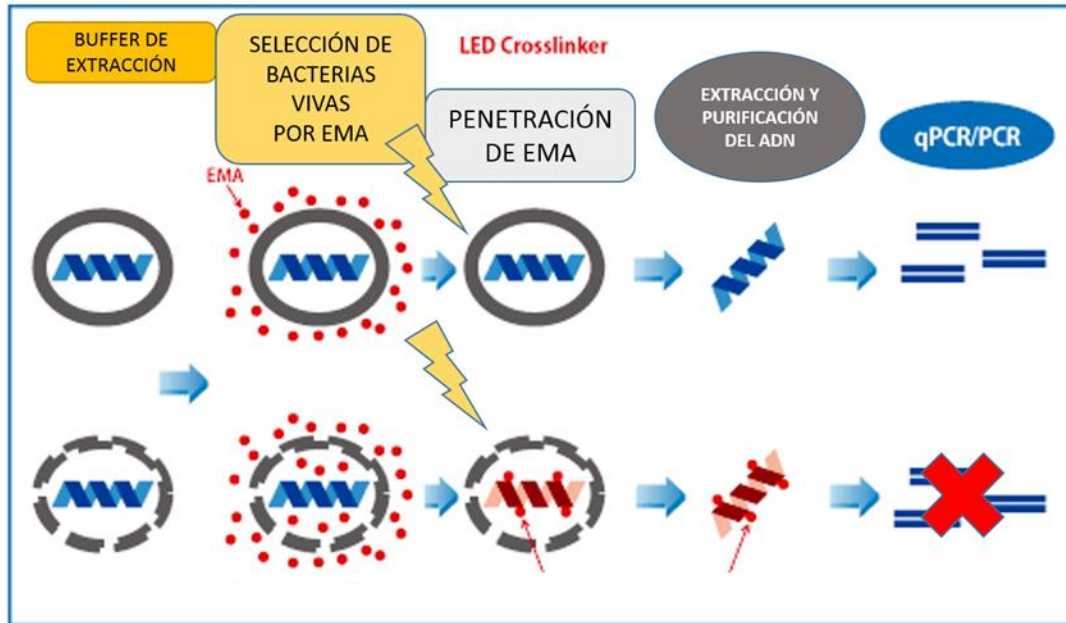


Figura 3. Modo de acción del Bromuro de Etidio Monoazida (EMA)

La técnica EMA-RT-PCR, para la detección de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' vivas y muertas fue reportada por Trivedi *et al* (2009), en este trabajo; previo a la extracción de ADN, se les dio un tratamiento con EMA al material vegetal, se dejó incubando por 5 minutos, para que el reactivo se uniera covalentemente al DNA de las células muertas, posteriormente se realizó la inactivación con luz (Figura 3), después de esto se realizó la extracción de ácido nucleicos de forma normal. Y finalmente el DNA, fue utilizado para la amplificación de la región 16s del genoma bacteriano.

Dinámica de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de naranja dulce

Florida, Estados Unidos

Hu y colaboradores (2014) monitorearon durante 20 meses el cambio en la concentración absoluta de C. Las vivas y muertas, en plantas de naranja dulce (*Citrus sinensis* var. "Valencia"). Para lo cual seleccionaron plantas jóvenes y saludables, que posteriormente, bajo condiciones de invernadero, injertaron con yemas de plantas positivas a C. Las. Con el uso de Propidio Monoazida (PMA), lograron discriminar las bacterias vivas de las muertas.

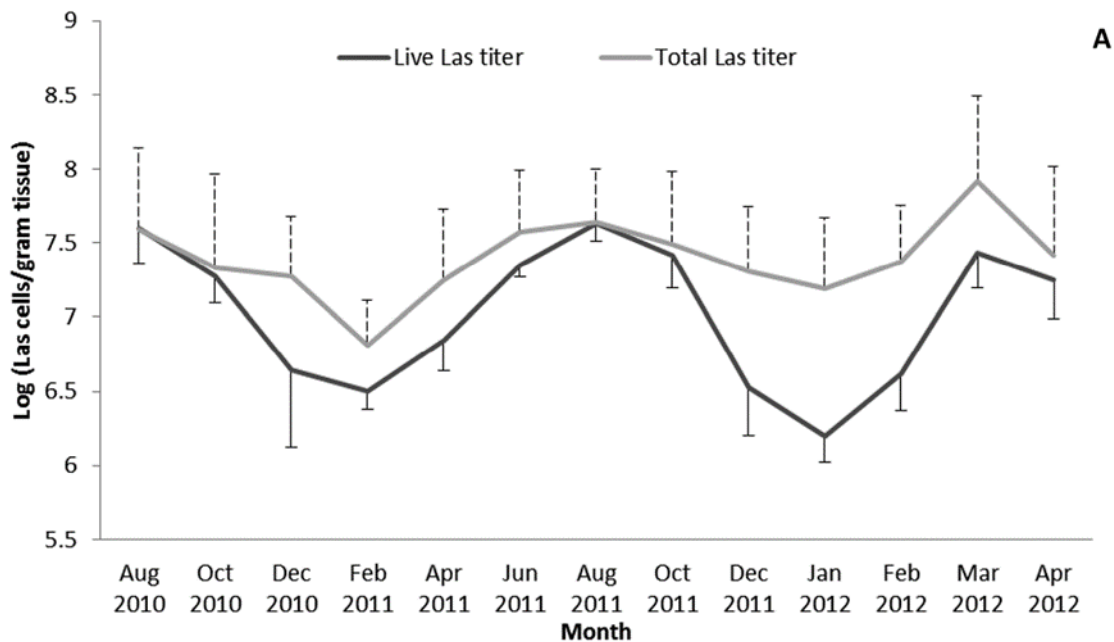


Figura 4. Dinámica de C. Las, en árboles de naranja dulce. Florida, EU.

Durante los meses de diciembre, enero y febrero, se observó una disminución en la cantidad de bacterias vivas, en comparación con el resto del año, como se puede observar en la figura 4. Lo cual fue confirmado estadísticamente, con una prueba de relación varianzas de Fisher ($P < 0.0001$) (Hu *et al.*, 2014).

Paraná, Brasil

Sauer y colaboradores (2015), evaluaron la variación estacional de la población de *C. Las*, utilizando la técnica de PCR en tiempo real; para lo cual seleccionaron en campo 11 árboles de naranja dulce, que habían sido infectadas de forma natural en huertos de cítricos, y con ayuda de los valores de Ct, se determinó la fluctuación poblacional. En otoño se reportaron los valores de Ct más bajos (Figura 5), lo cual indicó altas concentraciones de *C. Las*, ($F = 8.77$, $P = 0.0004$).

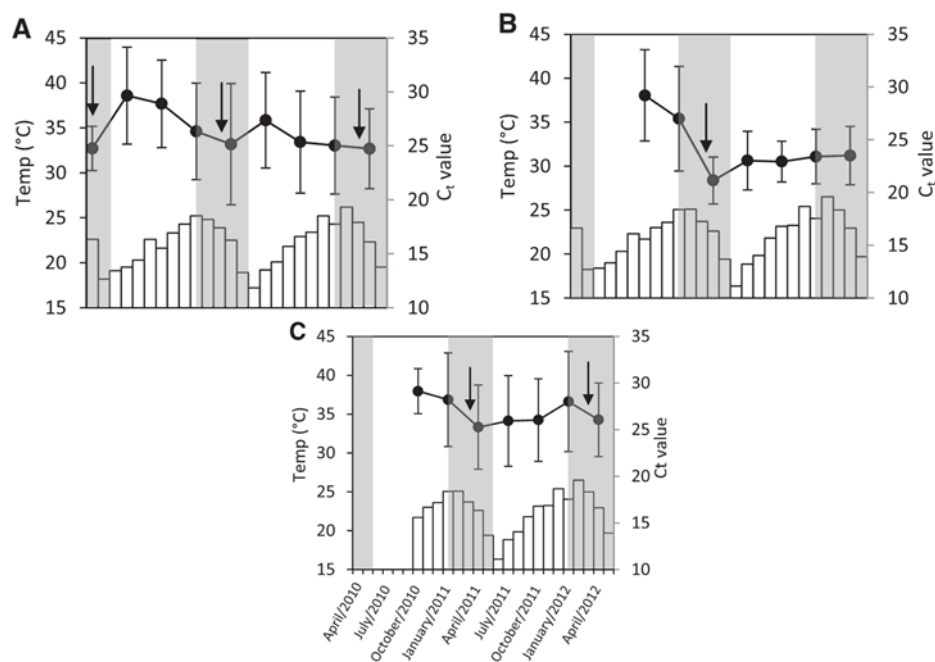


Figura 5. Dinámica de *C. Las*, en árboles de naranja dulce. Paraná, Brasil.

Con este estudio, también pudieron concluir que no hay una relación directa entre la concentración y la severidad de los síntomas, puesto que en hojas asintomáticas se detectaron altas concentraciones de C. Las, y en hojas que presentaban síntomas la cantidad de C. Las fue baja (Sauer *et al.*, 2015). Estudios recientes han mostrado que la producción de cítricos se mantiene, aún con la presencia del HLB en los árboles frutales infectados; lo anterior tanto en China (Deng *et al.*, 2012) como en Estados Unidos (Alvarez *et al.*, 2016). La nutrición de los árboles, así como el manejo óptimo de las condiciones culturales de dicho cultivo influyen en el mantenimiento de la vida útil de la planta ante el ataque de dicha enfermedad; de manera que se identifica una relación directa entre la nutrición o malnutrición de los árboles con los ataques de la bacteria asociada con el HLB, estableciendo una conexión con el fenómeno llamado 'Quorum sensing' (Antunes *et al.*, 2010; Rojas, 2010).

Quorum sensing

Quorum Sensing (QS), es un mecanismo sofisticado que permite la comunicación entre bacterias, las cuales a través del intercambio de señales químicas, pueden modificar su comportamiento a nivel poblacional. Este mecanismo se identificó por primera vez en *Vibrio fischeri*, controlando la bioluminiscencia de esta bacteria en respuesta a la densidad de población (Nealson & Hasting, 1979). Desde el descubrimiento del QS ha sido identificada en muchas bacterias gram positivas y negativas (Waters & Bassler, 2005). Las bacterias a través del QS liberan moléculas de señalización química difusibles en su medio ambiente. Cuando las señales alcanzan determinado umbral las bacterias responden a estas, alterando

su expresión génica, regulando sus actividades fisiológicas. Muchas bacterias gram negativas usan el N-acyl homoserinasa lactona (AHL), como molécula señal del QS (Loh *et al.*, 2002; Von Bodman *et al.*, 2003). Diversos grupos de investigación han podido identificar el mecanismo de QS, como regulador de la expresión génica de bacterias fitopatógenas, las cuales juegan un rol importante en el proceso de infección y virulencia (Quiñones *et al.*, 2005; Gou *et al.*, 2012).

Situación del HLB en México

En México, esta enfermedad se detectó por primera vez en árboles de limón mexicano en el Cuyo, municipio de Tizimín, Yucatán (Robles-González *et al.*, 2013). Hasta el momento no existe un control efectivo para esta enfermedad; en México el manejo de la misma se basa en el control del Psílido Asiático de los Cítricos (PAC), mediante el control químico, el cual ha sido, hasta el momento, la forma más efectiva de mitigar la rápida propagación de esta bacteria en huertos; además de la eliminación de plantas positivas y la utilización de material vegetal sano. El monitoreo de la población de PAC, mediante trampas amarillas pegajosas, es una herramienta útil para la toma de decisiones en cuanto al momento de aplicar productos químicos se refiere (SENASICA, 2015).

A nivel nacional, con las acciones implementadas se protegen alrededor de 572 mil ha de cítricos, correspondiendo 337,353 ha al cultivo de naranja, 175,669 ha de limón, 21,572 ha a mandarina, 18,158 ha a toronja, 12,746 ha a tangerina, 5,178 ha tangelo y 1,358 ha al cultivo de lima. En conjunto conforman una

producción estimada de 7.8 millones de toneladas, cuyo valor de la producción es de aproximadamente 17,467 millones de pesos (SIAP, 2015).

Situación fitosanitaria actual

El HLB se ha detectado en 414 municipios de 23 entidades de México, de los cuales, 335 son considerados citrícolas, lo que representa el 46% del total de los que cuentan con este cultivo en el país, el resto de los municipios con detecciones solo cuentan con plantas de cítricos en áreas urbanas como se muestra en la Figura 6, donde el color rojo indica los sitios donde se ha detectado HLB en material vegetal. Se estima que la superficie comercial con presencia de la enfermedad es del 9% con relación a la superficie nacional (572,000 ha aproximadamente). Las acciones realizadas para contener la enfermedad se basan principalmente en el control del psílido asiático de los cítricos, mediante las Áreas Regionales de Control (ARCOs) operadas con recursos de Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2016).



Figura 6. Estatus fitosanitario del Huanglongbing en México (el color rojo indica los sitios donde se ha detectado HLB en material vegetal).

Estrategias de manejo del Huanglongbing de los cítricos

A partir del año 2015, con la finalidad de reducir la diseminación del HLB, se estableció un esquema de manejo regional del psílido asiático de los cítricos, a través de 111 Áreas Regionales de Control (ARCOs), estableciéndose en zonas citrícolas con mayor riesgo de brotes o epidemias de esta enfermedad, debido a los niveles poblacionales del insecto vector. La lógica de esta estrategia es que el manejo de las poblaciones de insectos tiene que ser de manera amplia (Gottwald *et al.*, 2008; Pérez-Zárte *et al.*, 2016) En dichas ARCOs, se utilizan insecticidas recomendados por el Grupo Técnico de HLB de cada Estado, los cuales cuentan con registro ante la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) para su uso contra *Diaphorina citri* (SENASICA, 2016).

Asimismo, se ha articulado el uso del control biológico a través de hongos entomopatógenos; en los estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Veracruz mediante el uso de *Metarhizium anisopliae* y en Nayarit con *Isaria javanica*, en huertas de cítricos marginales y abandonadas. El Centro Nacional de Referencia de Control Biológico del SENASICA ha realizado evaluaciones para determinar cepas, dosis y periodos óptimos de aplicación, como parte del manejo integrado del insecto vector (SENASICA, 2016).

JUSTIFICACIÓN

La información respecto a la epidemiología y el comportamiento de la bacteria que causa el Huanglongbing, en México, es escasa; y mucha de la publicada se refiere a estudios realizados en cítricos dulces y en ambientes citrícolas de otros países, tal como se reporta en China, Brasil y los Estados Unidos. En México, la bacteria *C. Las* ha ocasionado mayor impacto en cítricos agrios, específicamente en limón mexicano de la Vertiente del Pacífico. En el presente trabajo se pretende generar información epidemiológica respecto del comportamiento de poblaciones de la bacteria *C. Las* en limón mexicano, y su posible relación con algunos factores ambientales dado que a la fecha es la especie de cítrico más afectada por esta enfermedad en México.

Asimismo, dado que no se tienen estudios precisos sobre la distribución de *C. Las* en árboles de limón mexicano, así como que la incidencia y dispersión de la misma bacteria, ha ocurrido con mayor frecuencia en dicha especie de cítrico, el presente estudio pretende aportar información epidemiológica como elemento importante para reforzar el diseño de programas de muestreo, detección y manejo de esta enfermedad, tomando como base el conocimiento preciso de la distribución de las poblaciones de *C. Las*, dentro de los árboles y entre hojas jóvenes y maduras, además de conocer la posible variación en el tiempo, en huertas de limón mexicano en la región de Tecomán, Colima México.

OBJETIVOS

1. Realizar un estudio analítico para determinar la concentración y variación temporal de C. Las, entre árboles, hojas jóvenes y maduras en limón mexicano en Tecomán, Colima, con el fin de reforzar estudios epidemiológicos.
2. Evaluar el efecto de algunos factores en la variación temporal de la concentración de C. Las, en árboles de limón mexicano infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de plantas para el establecimiento del trabajo

Se eligió el estado de Colima para establecer el experimento, por ser uno de los mayores productores de limón mexicano. El ensayo se ubicó en la huerta citrícola denominada “Rancho el Pandelo y Las Ánimas” (Figura 7), en la localidad de Tecomán, Colima. Las coordenadas geográficas de referencia son: 18.93487 latitud y -103.92576 longitud, tomadas en el extremo oriente de la huerta experimental. En junio de 2013 se observaron 50 plantas de limón mexicano que presentaban síntomas típicos de HLB en hojas, de cada planta se seleccionaron 4 ramas y de cada rama seleccionada se tomaron 6 hojas y fueron llevadas al laboratorio de Ingeniería Genética de Plantas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV ubicado en la Ciudad de México, para su diagnóstico.



Figura 7. Panorama del rancho 'El Pandelo y las Ánimas', Tecomán, Colima.

Diagnóstico de muestras colectadas en Tecomán, Colima

Extracción de ADN total

La lamina foliar y la nervadura central de cada hoja fueron separadas; las nervaduras centrales se picaron en trozos pequeños y se pesaron 100 mg, enseguida se colocaron en un tubo de 1.5 ml, que ya contenía un balín de porcelana, se agregaron 550 μ L de PBS (KH_2PO_4 50 mM, NaCl 150 mM; pH 7.2) y se maceraron con ayuda de un disruptor de tejidos (TissueLyser LT, QIAGEN), posteriormente la extracción del gDNA se realizó con el kit comercial AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep (AXYGEN Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante:

Protocolo de extracción

- 1.- Se adicionaron 150 μ L de buffer C-L.
- 2.- Se maceró el tejido vegetal utilizando un disruptor de tejidos. Tres tiempos de un minuto.
- 3.- Se adicionaron 20 μ L de preteinasa K y se le dio un breve vortes.
- 4.- Se centrifugó brevemente y se incubó por 10 minutos a 56°C.
- 5.- Se adicionaron 350 μ L de buffer P-D y se aplicó una agitación a máxima velocidad durante 30 segundos.
- 6.- Se centrifugaron las muestras a 13,300 rpm durante 10 minutos.
- 7.- Se transfirió el sobrenadante a una columna miniprep de 2 ml.
- 8.- Se centrifugó a 13,300 rpm durante un minuto.
- 9.- Se desechó el eluido y se adicionaron 500 μ L de buffer W1 a la columna.
- 10.- Se centrifugó a 13,300 rpm durante un minuto.
- 11.- Se desechó el eluido y se adicionaron 700 μ L de buffer W2 a la columna.
- 12.- Se centrifugó a 13,300 rpm durante un minuto.
- 13.- Se repitieron los pasos 11 y 12.
- 14.- Se desechó el eluido y se centrifugó nuevamente el tubo a 13,300 rpm, para secar la columna.
- 15.- Se transfirió la columna a un tubo de recolección de 1.5 ml.

16.- Se eluyó el DNA agregando 100 µL de buffer de elusión.

17.- Se centrifugó a 13,300 rpm durante un minuto.

18.- Se retiró la columna del tubo y se almacenó el ADN a 4°C.

La concentración y pureza del ADN se determinó con el espectrofotómetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific), posteriormente se conservaron a -20°C.

PCR Convencional

El diagnóstico de *C. Las*, se realizó por la técnica de PCR convencional, usando los primers descritos por Jagoueix, *et al.* (1996). La mezcla de reacción se describe en el cuadro 6.

Cuadro 6. Mezcla de reacción de PCR punto final para la detección de *C. Las*.

| Reactivo | [Inicial] | Volumen Final |
|---|----------------------|----------------|
| H2O Miliq | | 16.15 µL |
| Buffer | 10X | 2.5 µL |
| MgCl ₂ | 50 mM | 1.25 µL |
| dNTPs | 10 mM c/u | 0.4 µL |
| Primer OI1 (GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA) | 10 µM | 1.25 µL |
| Primer OI2c (GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT) | 10 µM | 1.25 µL |
| Taq Platinum | 5U/µL | 1.2 µL |
| DNA | 50 ng/ µL | 2.0 µL |
| | Volumen Total | 25.0 µL |

El termociclador usado para la amplificación del producto fue T100 Thermal Cycler (BIORAD); el programa de amplificación utilizado consto de una incubación a 94°C por 5 min seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg; alineamiento a 62°C por 30 seg; extensión a 72°C por 1:10 min; y por último una extensión final a 72°C por 10 min. El producto de la PCR fue visualizado con un perfil electroforético con 2 µL de buffer de corrida y 8 µL de la muestra, en un gel de agarosa al 1% (p/v), con su respectivo control positivo y negativo, tamaño visualizado fue de 1,160 pb.

Instalación del experimento

Se confirmó la presencia de HLB en 48 de las 50 plantas muestreadas en Tecomán, Colima. Posteriormente se eligieron 24 árboles infectados con HLB de forma natural, con una edad aproximada de 3 años y una altura promedio de 1.8 m. El marco de plantación fue de ocho metros entre hileras y cuatro metros entre árboles. Los árboles se circundaron con dos estructuras de malla antiáfidos de seis metros de ancho, 36 m de largo y tres m de alto (12 árboles por cada estructura), tal como se muestra en la Figura 8.

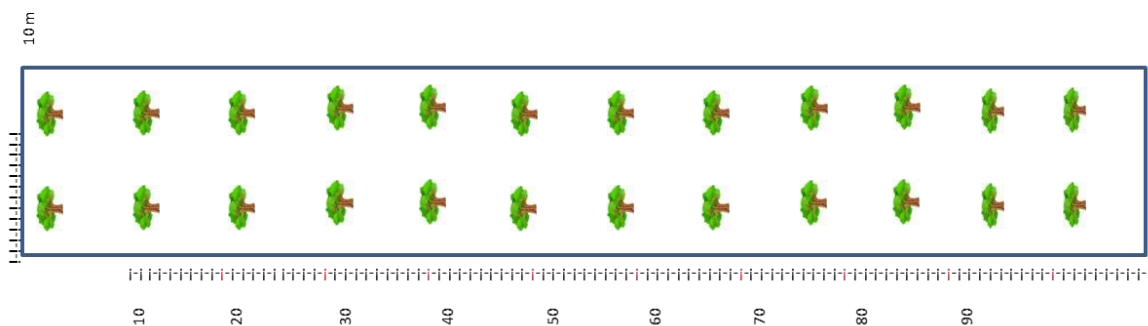


Figura 8. Esquema de distribución de árboles infectados por *C. Las*, Tecomán, Colima.

El manejo del cultivo se realizó de acuerdo a las prácticas reportadas para la región de Tecomán, Colima (Robles-González, *et al.*, 2013). A partir del mes de octubre de 2013, las muestras se tomaron cada 2 meses.

Toma de muestra para cuantificación de carga bacteriana

Se realizaron un total de 13 muestreos durante el periodo que duró el presente trabajo, bajo la siguiente metodología: de cada árbol, se seleccionaron 4 ramas al azar; de cada rama se tomaron 6 hojas (3 jóvenes y 3 maduras) como se muestra en el cuadro 7; las cuales fueron identificadas para realizar los siguientes muestreos en las mismas ramas.

Cuadro 7. Tamaño de muestra para la cuantificación de la carga bacteriana en limón mexicano, en Tecomán, Colima.

| FECHA DE EVALUACIÓN | ÁRBOLES | RAMAS | MUESTRA TOTAL | JÓVENES | MADURAS |
|---------------------|---------|-------|---------------|---------|---------|
| OCT-2013 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| DIC-2013 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| FEB-2014 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |

| | | | | | |
|-----------------|----|---|----|----|----|
| MAY-2014 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| JUL-2014 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| SEP-2014 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| NOV-2014 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| ENE-2015 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| MAR-2015 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| MAY-2015 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| JUL-2015 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| SEP-2015 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |
| DIC-2015 | 24 | 4 | 96 | 48 | 48 |

Cuantificación de bacterias vivas y muertas en hojas jóvenes y maduras

Por cada árbol se tomaron muestras de cuatro ramas; por cada rama se colectaron seis hojas, las cuales podían tener o no síntomas típicos de HLB. Durante 2015, se agruparon los datos de concentración de *C. Las*, para realizar análisis y seguimiento estacional en los meses de marzo (primavera), mayo (verano), septiembre (otoño), diciembre (invierno). Las hojas jóvenes se determinaron por su posición apical en la rama seleccionada; en tanto que las hojas maduras fueron colectadas en la zona basal de la misma rama. Se procesaron por separado hojas jóvenes y hojas fotosintéticas (maduras). Con la finalidad de poder determinar la cantidad de bacterias vivas y muertas, las muestras se trabajaron por duplicado, y a una de estas se les dio tratamiento previo a la extracción de ADN, con el reactivo EMA (Bromuro de Etidio Monoazida) mientras que la otra fue procesada de manera normal.

Se tomaron las nervaduras centrales de las hojas y se picaron finamente; se pesaron 100 mg de tejido y se colocaron en un tubo de 1.5 mL, las muestras se trabajaron por duplicado, una muestra se usó para la extracción de ADN total (bacteria vivas y muertas) y la otra para la extracción de ADN de bacterias vivas, tratadas con EMA. Los tubos se resguardaron a -80°C, hasta su extracción. El macerado de las muestras se realizó con la ayuda de un disruptor de tejidos (TissueLyser LT, QIAGEN), para esto se les agregó un balón de porcelana a los tubos que contenían el tejido vegetal.

Extracción de DNA de bacterias vivas

Para realizar la extracción de DNA de *C. Las vivas* se usó el método de EMA modificado (Trivedi *et al.*, 2009). Se le agregaron 300 µL de buffer PBS (KH₂PO₄ 50 mM, NaCl 150 mM; pH 7.2) a los tubos de 1.5 mL que contenían el tejido vegetal; las muestras se pusieron en agitación por 5 min. EMA se preparó a una concentración final de 5 mg/mL; en oscuridad se agregó EMA a las muestras a una concentración final de 100 µg/mL; se dejaron incubar por 5 min con agitaciones eventuales, posteriormente se desactivó EMA con la ayuda de un foco de halógeno de 650 W, las muestras se colocaron en hielo y se dejaron expuestas a la luz por 2 min; enseguida se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante, posteriormente se maceró el tejido. La extracción de DNA de plantas se realizó mediante el procedimiento antes mencionado; la pureza se

determinó con el espectrofotómetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific), posteriormente se llevó a una concentración de 50 ng/μL.

Obtención del plásmido para la cuantificación absoluta

Se amplificó un fragmento del gen 16S rDNA de *C. Las*, usando los primer's OI1/OI2 (Jagoueix *et al.*, 1996), que dan como resultado un producto de PCR de 1160 pb. En el vector pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 9) se ligó el amplicón obtenido, siguiendo las instrucciones del fabricante. Por choque térmico se transformaron las células competentes de *E. coli* MACH1-T1, las colonias con el inserto se obtuvieron por α-complementación, en medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 μg/mL. Posteriormente se crecieron las colonias en medio LB líquido y se realizó la extracción de DNA plasmídico con protocolo Plasmid Minipreps. La concentración se determinó con el espectrofotómetro Nano Drop 2000 (Thermo Scientific).

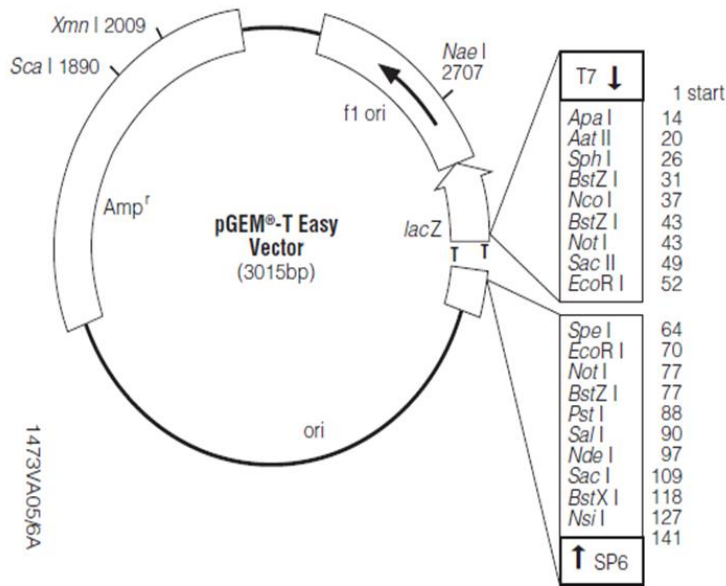


Figura 9. Mapa del vector PGEM, utilizado para la clonación del fragmento 16S de *C. Las*

El número de copias del plásmido se determinó con la siguiente fórmula: Copias = (concentración ng x número de Avogadro)/(longitud pb x 1×10^9 x 650). El peso por cada pb es de 650 Da y el número de Avogadro es 6.022×10^{23} . Se realizaron diluciones del DNA plasmídico para llevarlas a una concentración de 1×10^8 ; 1×10^7 ; 1×10^6 y 1×10^5 copias por μL (Lee *et al.*, 2006).

Extracción del ADN plasmídico.

A partir de un cultivo de LB líquido de colonias transformadas: se pasó 1.5 ml de cultivo, enseguida se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos para empastillar. Se desechó el sobrenadante y enseguida se colocó el resto del cultivo (en el mismo tubo). Se realizó otra centrifugación a 13,000 rpm durante 2 minutos para obtener una pastilla completa. Luego se desechó el sobrenadante.

Enseguida se prosiguió con el protocolo para la extracción de plásmidos (Sambrook, J. *et al.*, 2001) utilizando las soluciones del cuadro 8:

1. Se resuspendió la pastilla bacteriana con 100 μ L de la solución I, se utilizó un vórtex.
2. Se adicionaron 200 μ L de la solución II, y se incubó en hielo durante 5 minutos.
3. Se adicionaron 150 μ L de la solución III, y nuevamente se incubó en hielo durante 5 minutos.
4. Se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Enseguida se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Se le agregaron 450 μ L de fenol-cloroformo y se mezcló por inversión.
6. Se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos.
7. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregaron 350 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión.
8. Se incubaron por 1 hora a -20°C.
9. Se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos. Enseguida se desechó el sobrenadante.
10. Se lavó la pastilla con etanol al 70% (200 μ L). Este paso se repitió 3 veces.
11. Se secó la pastilla y se agregaron 30 μ L de H₂O grado biología molecular.
12. Enseguida se le agregaron 0.5 μ L de ARNasa y se incubó a 37°C durante 30 minutos.
13. El DNA plasmídico se almacenó a -20°C.

Cuadro 8. Soluciones utilizadas para la extracción de ADN plasmídico

| Nombre | Composición |
|---------------------|---|
| Solución I | 25 mM Tris HCl (pH 8.0) 10 mM (pH 8.0) |
| Solución II | 0.2 N NaOH 1% SDS Preparar al momento de usarse |
| Solución III | 5M acetato de potasio 11.5 mL de acetato de potasio 28.5 mL de agua desionizada |

Confirmación del inserto por PCR

Una vez que se realizó la extracción del ADN plasmídico, se procedió a la confirmación del inserto por PCR. Para lo cual se utilizó la misma mezcla, que en la detección de *C. Las* por punto final, con la mezcla de reacción y programa de amplificación antes mencionados.

Cuantificación de *C. Las* por qPCR

Cuadro 9. Primers y sondas utilizados para la reacción de PCR en tiempo real de *C. Las*

| Primer | Secuencia 5'-3' |
|---------------|---------------------------------------|
| HLB as | TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG |
| HLB r | GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG |
| COX | GTA TGC CAC GTC GCA TTC CAG A |
| COXr | GCC AAA ACT GCT AAG GGC ATT C |
| Sondas | Secuencia 5'-3' |
| HLBp | 56-FAM/AGA CGG GTG AGT AAC GCC/3BHQ-1 |

| | |
|-------------|--|
| COXp | 5-TET/ATC CAG ATG CTT ACG CTG G/3BHQ-2 |
|-------------|--|

Para la detección de *C. Las*, se usaron los primers y sondas (cuadro 9) reportados por Li *et al.*, (2006).

Cuadro 10. Mezcla de reacción utilizada para la detección de *C. Las* por PCR en tiempo real.

| Reactivo | [Inicial] | Volumen |
|-------------------|----------------------|----------------|
| H2O Miliq | | 4.7 µL |
| Buffer | 10x | 2.5 µL |
| MgCl ₂ | 50 mM | 3.0 µL |
| dNTPs | 10 mM | 0.6 µL |
| HLBas | 2 µM | 1.5 µL |
| HLBr | 2 µM | 1.5 µL |
| HLBp | 1 µM | 3.0 µL |
| COX | 2 µM | 1.5 µL |
| COXr | 2 µM | 1.5 µL |
| COXp | 1 µM | 3.0 µL |
| Taq platinum | 5 U/µL | 0.2 µL |
| DNA | 50 ng/µL | 2.0 µL |
| | Volumen total | 25.0 µL |

En el cuadro 10, se muestra la mezcla de reacción de la PCR en tiempo real. Para las reacciones de la curva estándar se agregó únicamente 1 µL de DNA plasmídico (1×10^8 ; 1×10^7 ; 1×10^6 y 1×10^5), cada una con tres réplicas. Todas las reacciones de qPCR se realizaron en el termociclador CFX96 (BIO-RAD), con el siguiente programa: 20 segundos de incubación a 95° C, seguido de 40 ciclos de 1

segundo de desnaturalización a 95° C y 40 segundos de alineación y extensión a 58° C, las señales de fluorescencia se recolectan a 58° C durante cada ciclo.

Todas las muestras colectadas se cuantificaron por PCR en tiempo real, cada muestra fue analizada por triplicado, para lo cual se usaron DNA total (bacterias vivas y muertas) y el DNA obtenido después del tratamiento con EMA (bacterias vivas).

Trampeo de adultos de Psílido Asiático de los Cítricos

Se instalaron dos trampas amarillas pegajosas al centro de cada túnel donde se muestrearon los árboles de limón mexicano y se realizaron conteos del PAC en cada fecha de evaluación. Las trampas tuvieron unas dimensiones de 24 x 18 cm de color amarillo neón. El periodo de reposición fue semanal. Las trampas se enviaron al laboratorio de Entomología y Acarología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria para la identificación taxonómica y conteo del Psílido Asiático de los Cítricos.

Datos de tiempo atmosférico

Los datos meteorológicos fueron obtenidos de la Red Nacional de Estaciones Agrometeorológicas Automatizadas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), de la estación del municipio Tecomán,

Colima ubicada en las coordenadas geográficas 18.96683 de latitud y -103.84227 de longitud. Se tomaron datos de temperatura media, temperatura mínima, temperatura máxima, humedad relativa media y precipitación pluvial en el periodo del ensayo.

Análisis estadístico de la información

Las bases de datos de los resultados de los diagnósticos de C. Las, de las 13 fechas de muestreo, con base en los 24 árboles de limón mexicano se integraron en Excel de Microsoft y posteriormente se pasaron a SAS (Statistical Analysis System) (SAS, 2009), para realizar el análisis de variación y detectar las posibles diferencias significativas entre los factores de agregación (fechas de evaluación, hojas maduras y jóvenes), mediante el uso de la relación de varianzas 'F' de Fisher (PROC GLM de SAS). Una vez identificada la posible relación significativa de los factores mencionados, se aplicó una comparación múltiple de promedios mediante la prueba de Tukey (alfa= 0.05). La identificación de la relación posible entre las variables atmosféricas, el conteo de la cantidad de psíldos en trampas amarillas y la concentración de la bacteria, se realizó mediante correlación estadística (PROC CORR) de SAS y la estimación del coeficiente "r" de Pearson, con una probabilidad de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Diagnóstico de muestras colectadas para selección de plantas

Se confirmó la presencia de *C. Las*, en los árboles de limón mexicano, M1 corresponde al árbol 1, M2 al árbol 2 y M3 al árbol 3, mediante PCR (Figura 10).

Esto se realizó para los 50 árboles muestreados.

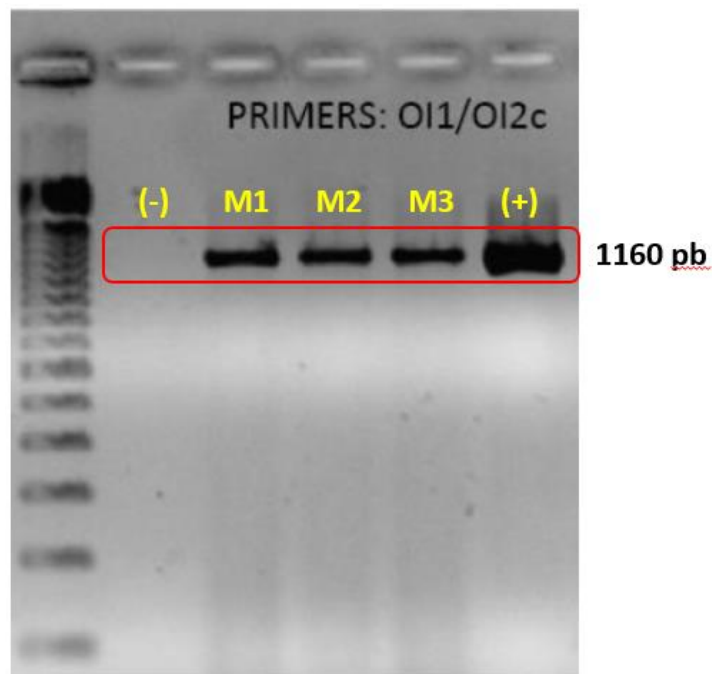


Figura 10. Productos del PCR, utilizados para el diagnóstico de *C. Las*. En el primer carril de izquierda a derecha se muestra el marcador molecular; en el segundo, el negativo, del tercero al quinto las muestras y en el sexto el control positivo.

Cuantificación de *C. Las*.

A partir de los valores de umbral de detección “Ct” (Cycle Threshold) obtenidos de las concentraciones logarítmicas, se construyó una gráfica de regresión lineal, la cual se muestra en la figura 11, cuya ecuación resultante fue: $Y = -3.4282x + 46.596$,

con una $R^2=0.9997$, mediante la cual se obtuvo la siguiente ecuación = $10^{\left(\frac{Ct-46.596}{-3.4282}\right)}$; con la que se pudo estimar la concentración de C. Las, por interpolación a partir de los valores de Ct (Lee *et al.*, 2006).

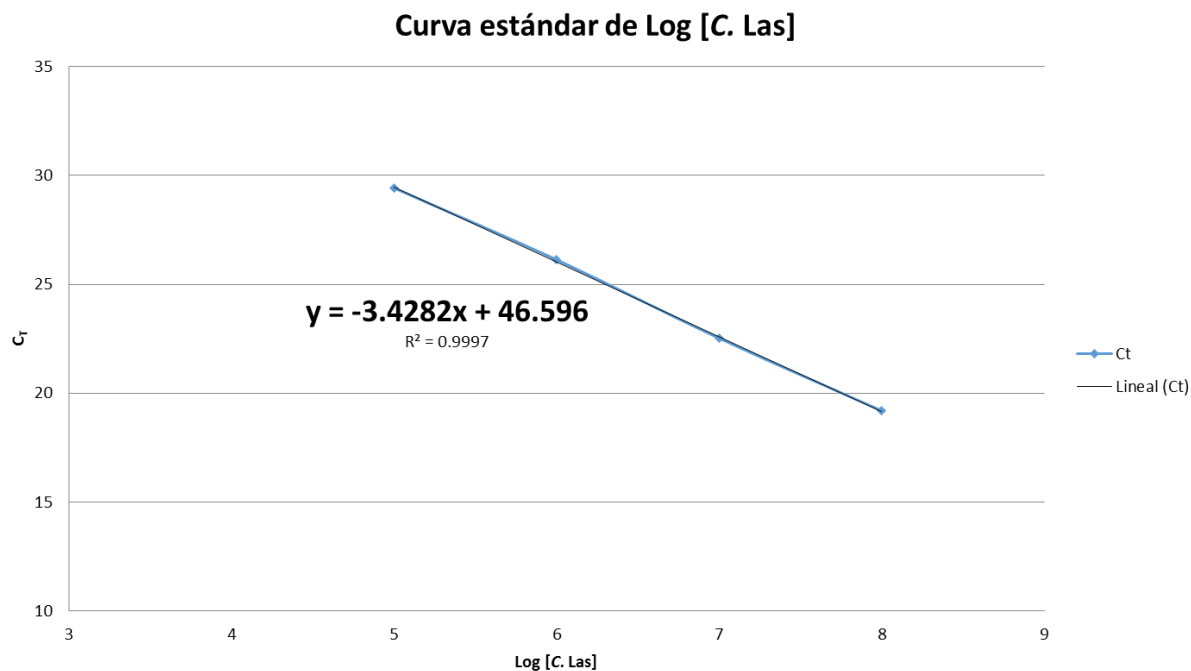


Figura 11. Curva estándar de calibración utilizada para estimar la concentración de C. Las, en los árboles de limón mexicano infectados con HLB.

Dinámica de C. Las en árboles de limón mexicano

En la dinámica de C. Las, durante el periodo del ensayo, se observó un primer pico de altas concentraciones de C. Las, en el mes de diciembre de 2013 (Figura 12); en esta evaluación también se puede observar que aumentó la concentración de las bacterias vivas; otro pico se observó en el mes de mayo de 2014; sin embargo, en esta evaluación la concentración de las bacterias muertas es mayor;

otro repunte se observó en noviembre de 2014, evaluación en la cual las bacterias vivas aumentan.

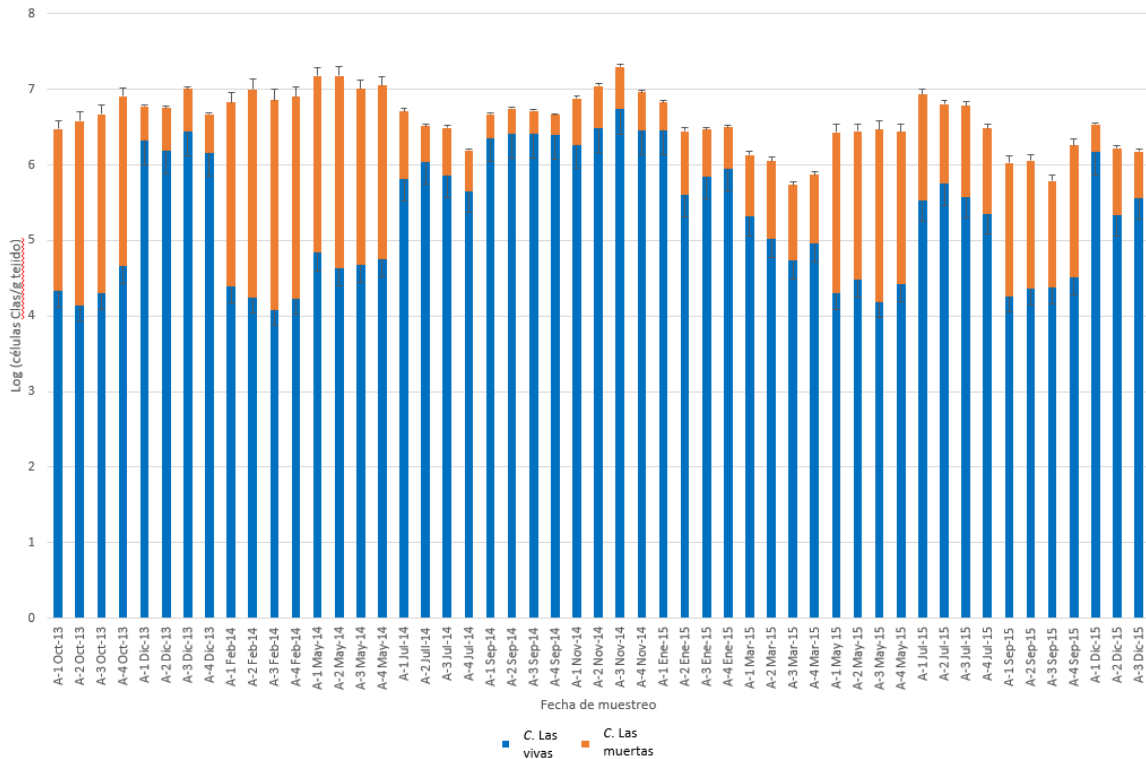


Figura 12. Dinámica de la concentración de bacterias vivas y muertas de C. Las, en el periodo de estudio. Tecomán, Colima. Octubre de 2013 a diciembre de 2015. Barras de error en cada columna, representan una desviación estándar (n=13).

En 2015 la concentración de la bacteria se redujo, pero se observaron 2 picos de alta concentración, el primero en el mes de julio, en el cual se observó un aumento en la concentración de bacterias muertas; y el segundo en diciembre, en esta evaluación se sigue la misma tendencia, la concentración de bacterias vivas aumentó. Los picos de altas concentraciones de la bacteria coinciden con los meses en los cuales la temperatura promedio de la región disminuyó y con los meses donde las plantas tuvieron brotaciones nuevas (Gobierno del Estado de

Colima, 2005; Robles-González *et al.*, 2013). En el caso de la concentración de bacterias vivas, se observó un comportamiento diferente, el primer pico en la concentración se presentó en el mes de diciembre de 2013, el segundo pico se presentó en el mes de julio de 2014, de ahí en adelante y hasta la evaluación de enero de 2015 las bacterias vivas presentaron una fase estacional de altas concentraciones, el siguiente repunte se presentó en julio de 2015 y el último pico se presentó en diciembre de 2015. Durante todo el periodo de evaluación las plantas presentaron los síntomas típicos del HLB, la concentración de *C. Las* fue variando durante cada una de las evaluaciones realizadas. Las concentraciones de *C. Las* vivas estuvieron dentro del siguiente rango: 9.93×10^3 a 5.93×10^6 C Las/g de tejido y el rango de la cuantificación total de las bacterias fue de 5.38×10^5 a 1.98×10^7 C Las/g de tejido.

La comparación de las concentraciones promedio entre los tiempos de evaluación muestra que los mayores valores de concentración se presentaron en diciembre de 2013 y septiembre y noviembre de 2014 (Cuadro 10). En tanto que los valores menores corresponden a las fechas: octubre 2013, febrero 2014, mayo 2015 y septiembre 2015. Estos resultados muestran tendencias significativas inversas entre las concentraciones promedio de bacterias vivas y muertas, evidenciado por el orden inverso del agrupamiento de las concentraciones promedio de *C. Las*, lo que podría ser indicativo de "Quorum sensing", mecanismo que regula la densidad poblacional.

En el Cuadro 11 se muestra la comparación de concentración promedio de células vivas y muertas de *C. Las* por fecha de evaluación en limón mexicano, durante el

periodo de estudio en Tecomán, Colima de octubre de 2013 a diciembre de 2015.

DMS= Diferencia Mínima Significativa de la Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 11. Comparación de concentración promedio de células vivas y muertas de *C. Las* por fecha de evaluación en limón mexicano, en el periodo de estudio. Promedios con la misma literal en cada columna, no son estadísticamente diferentes (Tukey $p < 0.05$).

| FECHA DE EVALUACIÓN | MUESTRA TOTAL | LOG PROMEDIO (Células vivas de <i>C. Las</i> /g tejido) | TUKEY ($P \leq 0.05$) | LOG PROMEDIO (Células muertas de <i>C. Las</i> /g tejido) | TUKEY ($P \leq 0.05$) |
|---------------------|---------------|---|-------------------------|---|-------------------------|
| NOV-2014 | 96 | 6.570 | A | 0.519 | F |
| SEP-2014 | 96 | 6.392 | A | 0.305 | F |
| DIC-2013 | 96 | 6.270 | AB | 0.472 | F |
| ENE-2015 | 96 | 5.965 | BC | 0.593 | EF |
| JUL-2014 | 96 | 5.840 | CD | 0.632 | EF |
| DIC-2015 | 96 | 5.680 | CD | 0.596 | EF |
| JUL-2015 | 96 | 5.551 | D | 1.197 | D |
| MAR-2015 | 576 | 5.006 | E | 0.939 | DE |
| MAY-2014 | 96 | 4.720 | EF | 2.375 | AB |
| OCT-2013 | 96 | 4.434 | FG | 2.223 | B |
| SEP-2015 | 576 | 4.377 | G | 1.653 | C |
| MAY-2015 | 450 | 4.284 | G | 2.091 | B |
| FEB-2014 | 96 | 4.234 | G | 2.657 | A |
| DMS= 0.343 | | | | DMS=0.351 | |

Diferencias en las concentraciones de *C. Las* entre hojas jóvenes y maduras.

En la Figura 13, se presentan los resultados de la cuantificación de bacterias vivas y muertas tanto en hojas jóvenes como en hojas maduras; de manera general se

puede observar que hubo una mayor concentración total de bacterias en las hojas maduras.

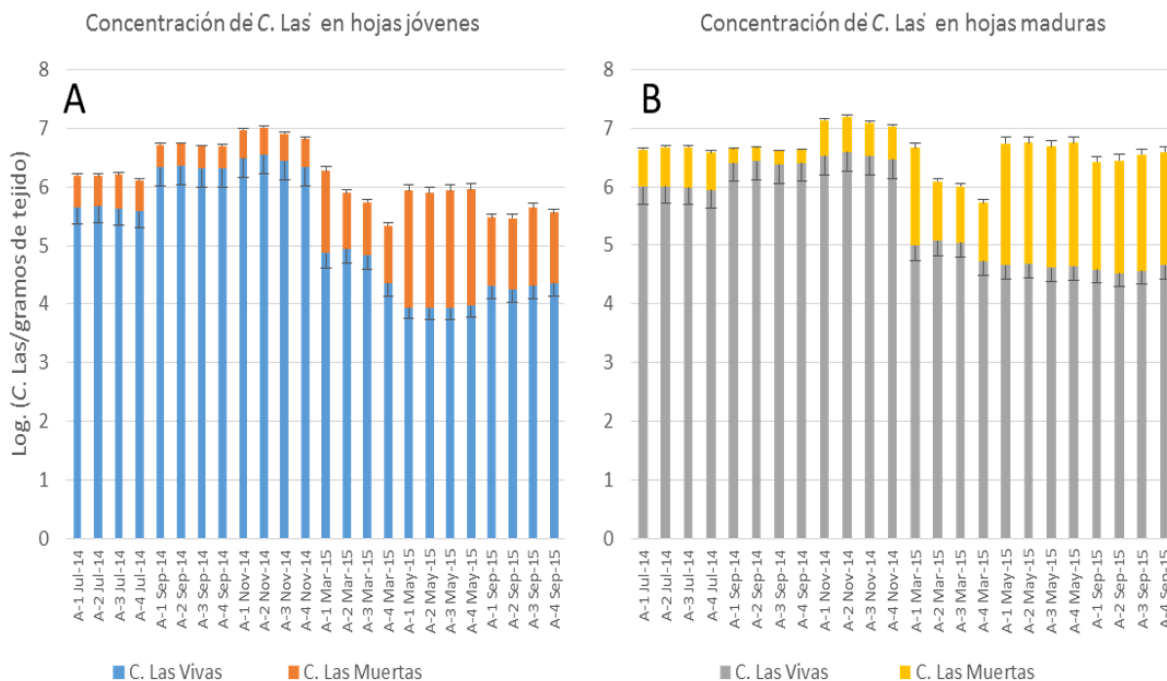


Figura 13. Cuantificación de bacterias vivas y muertas entre hojas jóvenes y maduras en limón mexicano, durante el periodo de octubre de 2013 a diciembre de 2015. Tecomán, Colima. Barras de error en cada columna representan una desviación estándar (n=13).

La variación de la concentración de C. Las dentro de la misma planta fue de 8.79×10^7 a 1.76×10^4 C Las/g de tejido, esta tendencia fue similar para todos los árboles muestreados. En cuanto a la dinámica de la concentración de C. Las, en hojas jóvenes y maduras, de manera general se observó que la concentración de bacterias es mayor en las hojas maduras, además de que, en estas últimas, también hubo una mayor cantidad de bacterias vivas ($F=12.45$, $p<0.0001$).

En el Cuadro 12 se muestra la comparación de concentración promedio de células vivas y muertas de C. Las entre hojas maduras y jóvenes de limón mexicano

colectadas en periodo de estudio. Tecomán, Colima. Octubre de 2013 a diciembre de 2015. DMS= Diferencia Mínima Significativa de la Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Cuadro 12. Comparación de concentración promedio de *C. Las* entre hojas maduras y jóvenes. Periodo de octubre de 2013 a diciembre de 2015. Tecomán, Colima.

| TIPO DE HOJA | MUESTRA TOTAL | LOG PROMEDIO | TUKEY ($P < 0.05$) |
|--------------|---------------|--------------|-------------------------|
| MADURA | 1329 | 5.109 | A |
| JOVEN | 1137 | 4.804 | B |

DMS= 0.085

Dinámica de la población de *C. Las* en 2015

Se observó la dinámica en las concentraciones de *C. Las*, tanto vivas y muertas en hojas jóvenes y maduras, en cuatro evaluaciones distintas durante 2015 (primavera, verano, otoño e invierno) (Figura 14). En primavera se observó una mayor concentración de bacterias totales, también se observó que las bacterias muertas están presentes en bajas concentraciones, al igual que lo observado anteriormente la concentración total de *C. Las* es mayor en las hojas maduras. En verano se observó un aumento en la concentración de las bacterias muertas; en esta época del año se presentó una variación significativa en las concentraciones bacterianas. Durante el otoño la evaluación realizada mostró la misma tendencia que en verano, ya que la concentración de bacterias muertas mostró un aumento en comparación con el comportamiento presentado en la primavera; sin embargo, en esta evaluación también se observó que en hojas jóvenes existen bajas concentraciones de bacterias muertas, pero el total sigue siendo mayor en hojas

maduras. En invierno las bacterias muertas sufren una disminución, mientras que en hojas jóvenes la concentración total de bacterias es notablemente menor que en las hojas maduras.

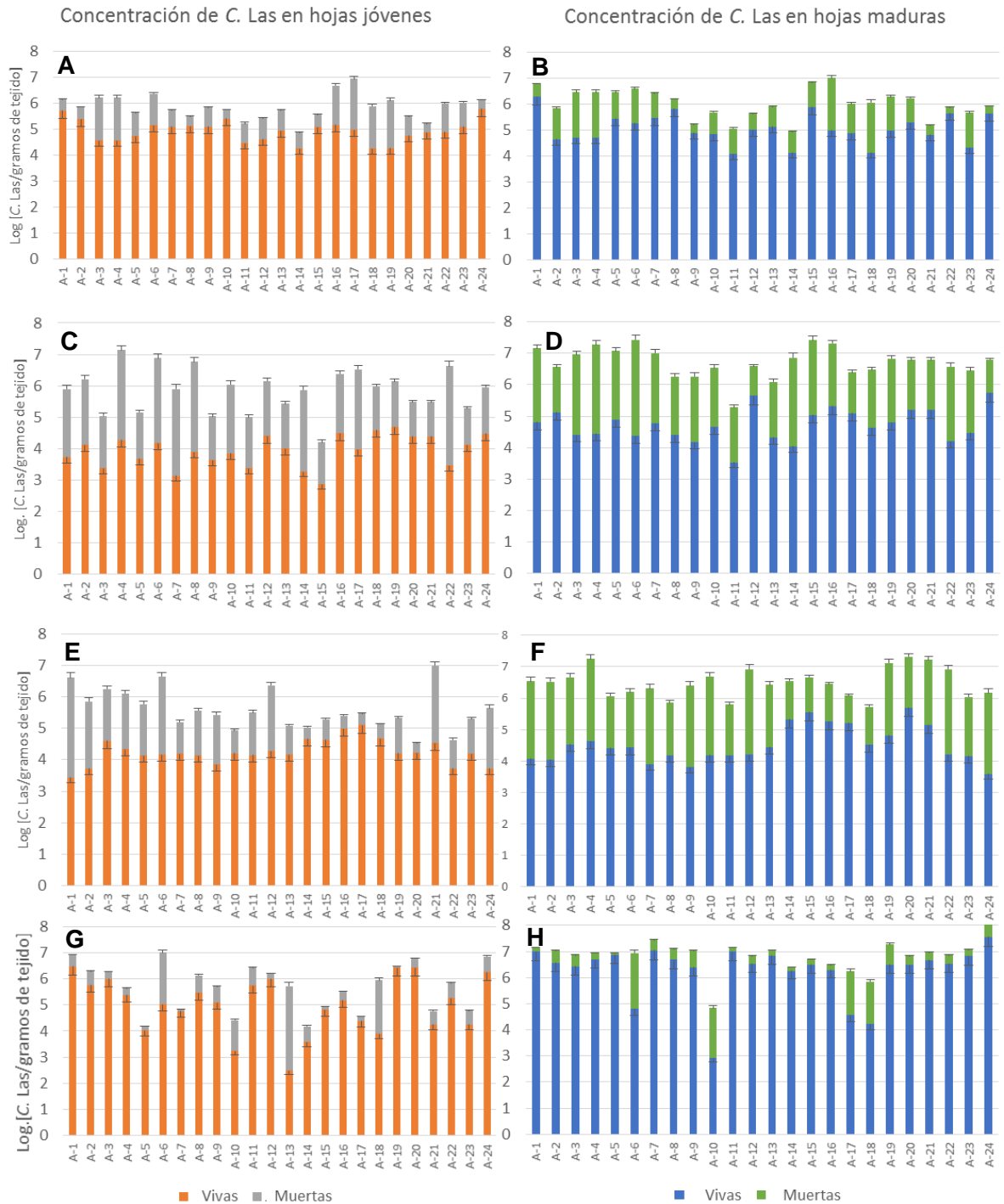


Figura 14. Cuantificación de bacterias vivas y muertas por tipo de hoja, y por época del año, en limón mexicano, en el periodo de estudio. Primavera (A y B) Verano (C y D) Otoño (E y F) Invierno (G y H). Tecomán, Colima. Enero a diciembre de 2015. Barras de error en cada columna representa una desviación estándar (n=4).

Durante el verano y el otoño es cuando se reportan las brotaciones más importantes para los cítricos en el municipio de Tecomán.

La tendencia encontrada es que la mayor concentración de C. Las se encuentra en hojas maduras. Las épocas del año en las que hubo mayor concentración de C. Las vivas en hojas jóvenes fueron primavera y verano. Los resultados del análisis estadístico indican que la mayor cantidad de bacterias muertas se presentaron en primavera y verano, mientras que en otoño e invierno existió una recuperación de las vivas.

Cuadro 13. Concentración promedio de C. Las entre hojas maduras y jóvenes, por época del año. Enero a diciembre de 2015. Tecomán, Colima. Promedios con literales similares entre columnas, no son estadísticamente diferentes (Tukey $p < 0.05$). DMS= Diferencia Mínima Significativa de Prueba de Tukey.

| MES | TOTAL JÓVENES | VIVAS JÓVENES | MUERTAS JÓVENES | TOTAL VIEJAS | VIVAS VIEJAS | MUERTAS VIEJAS |
|------------------|------------------|------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| VERANO | 5.8676 A | 3.9311 B | 1.9267 A | 6.7149 A | 4.7150 B | 1.9999 A |
| PRIMAVERA | 5.8507 A | 4.9189 A | 0.9318 BC | 6.0414 B | 5.0503 B | 0.9911 B |
| OTOÑO | 5.6848 A | 5.0035 A | 0.6813 C | 6.8318 A | 6.2547 A | 0.5771 B |
| INVIERNO | 5.5889 A | 4.2477 B | 1.3412 B | 6.4861 A | 4.5187 B | 1.9788 A |
| MEDIA | 5.7480 | 4.5253 | 1.2202 | 6.5185 | 5.1346 | 1.3867 |
| GRAL | (0.697) | (0.6601) | (0.680) | (0.5312) | (0.7157) | (0.5604) |
| DMS | 0.527 | 0.4987 | 0.5139 | 0.4013 | 0.5406 | 0.4233 |

En el cuadro 13 se muestra la concentración promedio de C. Las (desviación estándar $n=4$) entre hojas maduras y jóvenes, por época del año. Enero a diciembre de 2015. Tecomán, Colima. DMS=Diferencia Mínima Significativa de la prueba de Tukey ($P\leq 0.05$).

Condiciones climáticas durante el estudio

En la Figura 15, se muestran las condiciones meteorológicas promedio presentadas durante el tiempo en el cual se realizó el presente estudio.

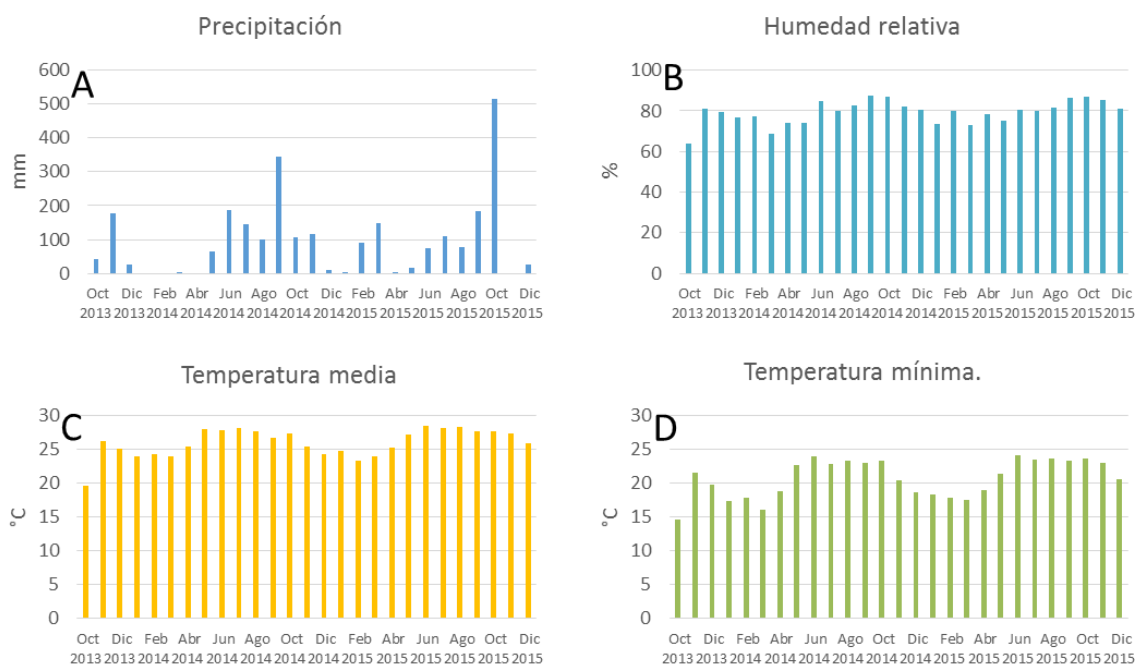


Figura 15. Condiciones meteorológicas principales durante el periodo de estudio. Tecomán, Colima. Octubre de 2013 a diciembre de 2015.

El municipio de Tecomán, cuenta con un clima tropical seco, la temperatura promedio anual fue de 26° C, la mínima de 20.78° C, mientras que el promedio de

la máxima fue de 32.65° C. La temperatura de este municipio es considerado isotérmica puesto que las temperaturas no varían mucho durante las cuatro estaciones del año (Pérez, *et al.* 2002). Se sabe que, en las regiones tropicales, la presencia de temperaturas mínimas durante las noches, inducen brotaciones en cítricos (Davenport, 2000). Robles-González y Medina Urrutia (1981) reportaron que en Colima, se tienen dos periodos de floración; el primero de noviembre a marzo, es cuando se registra la floración más importante, y el segundo en los meses de junio a septiembre, cuando inician las lluvias. En el presente trabajo las brotaciones se presentaron cuando aumentó la temperatura junto con la presencia de las lluvias y brotaciones de baja intensidad se registraron entre los meses de agosto y diciembre.

Asociación entre población de *C. Las* y variables externas

En el cuadro 14 se muestra la asociación de variables de dinámica de *C. Las*, en material vegetal de limón mexicano, con las variables atmosféricas presentes en Tecomán, Colima. ($P \leq 0.05$). Tmed=Temperatura media; HR=Humedad Relativa; Tmin=Temperatura mínima; PP=Precipitación pluvial; CONTEO= Cantidad semanal de psílicos atrapados en trampas amarillas pegajosas. En primera instancia se identifica una relación inversa y altamente significativa (r de Pearson = -0.934, $p < 0.0001$) (Cuadro 14) entre las concentraciones de Bacteria viva y Bacteria muerta, en el periodo de análisis de material vegetal de limón mexicano.

Cuadro 14. Asociación de variables de dinámica de población de *C. Las* en material vegetal de limón mexicano, con variables atmosféricas en Tecomán, Colima.

| | Vivas | Muertas | Tmed | HR | Tmin | PP | Conteo |
|----------------|-------|--------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Vivas | 1.000 | -0.909 <0.0001** | 0.0065 (0.938)ns | 0.0945 (0.758)ns | 0.138 (0.651)ns | -0.153 (0.616)ns | -0.137 (0.686)ns |
| Muertas | | 1.000 | 0.061 (0.841)ns | 0.0118 (0.969)ns | -0.028 (0.925)ns | 0.085 (0.781)ns | 0.231 (0.494)ns |
| Tmed | | | 1.000 | 0.439 (0.132)ns | 0.922 <0.0001** | 0.500 (0.081)ns | -0.094 (0.782)ns |
| HR | | | | 1.000 | 0.594 (0.032)** | 0.5192 (0.073)ns | 0.166 (0.625)ns |
| Tmin | | | | | 1.000 | 0.524 (0.065)ns | -0.076 (0.822)ns |
| PP | | | | | | 1.000 | 0.500 (0.117)ns |
| Conteo | | | | | | | 1.000 |

ns= relación no significativa ($p < 0.05$). ** Relación altamente significativa ($p < 0.0001$)

En la medida en que aumentó la concentración de bacteria viva, disminuyó la de bacteria muerta en material vegetal de limón mexicano, fenómeno posiblemente relacionado con el concepto de “Quorum sensing”, el cual se refiere a la comunicación entre poblaciones de bacterias mediante la generación de moléculas difusibles, para regular el crecimiento de su población, una vez que se alcanza una concentración crítica (Antunes *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2014). Hasta donde se tiene conocimiento este documento representa el primer reporte en Tecomán, Colima, México, sobre la variación estacional de la concentración de la bacteria *C. Las*, en limón mexicano y el fenómeno de “Quorum sensing” de la

bacteria *C. Las* en la región; lo cual aporta fundamentos para posibles modificaciones a las prácticas o a los esquemas de muestreo y seguimiento en la detección de *C. Las*.

No se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones de bacterias vivas y muertas con las variables de tiempo atmosférico analizadas. Los meses en los cuales se presentaron bajas temperaturas nocturnas, son los mismos en los que se pudo observar una mayor concentración de bacterias vivas, mientras que en los meses más cálidos, es cuando se notó un incremento en el número de bacterias muertas.

De acuerdo con el seguimiento del conteo semanal de adultos del PAC en trampas amarillas pegajosas (Figura 16), se observó que las cantidades de adultos aumentaron durante los meses previos a la brotación de otoño e invierno, y disminuyeron entre la primavera y el verano.

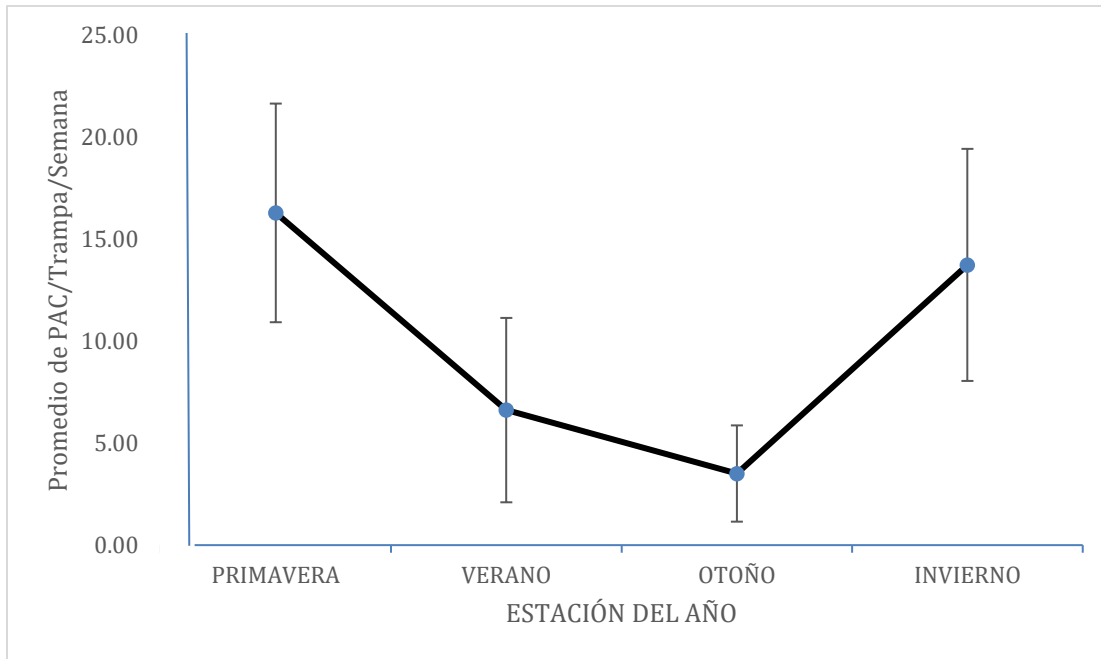


Figura 16 Conteo promedio semanal de adultos de PAC durante el periodo de estudio, en limón mexicano. Tecomán, Colima. De enero a diciembre de 2015. Barras de error en cada promedio representan una desviación estándar (n=13).

DISCUSIÓN

Dinámica de *C. Las* en árboles de limón mexicano

Los primeros reportes de la presencia del HLB en el Continente Americano ocurrieron en Brasil (Basanezzi *et al.*, 2006) y posteriormente en Florida, Estados Unidos de América (Grafton Cardwell *et al.*, 2013) y curiosamente los ataques de este patógeno fueron sobre cítricos dulces (variedades de naranja). En el caso del ataque de la enfermedad en áreas citrícolas de México, se desarrolló principalmente en limón mexicano, clasificado como cítrico agrio (Robles-González *et al.*, 2013), sin que hasta la fecha se hayan generado hipótesis explicativas del comportamiento señalado. Algunos trabajos posteriores al ataque inicial de la bacteria (2009) y presencia de PAC (Coronado y Ruiz, 2004) en las regiones

citrícolas, mencionan que uno de los factores predominantes que podrían explicar el comportamiento señalado es la superficie establecida de esta variedad de limón (Torres-Pacheco *et al.*, 2013). Se tienen documentos publicados que muestran hipótesis dramáticas acerca de que el jugo de naranja está a punto de desaparecer debido a la peligrosidad del insecto vector y de la bacteria asociada (Raithore *et al.*, 2015), haciendo referencia a que los árboles de cítricos están en peligro de extinción por el efecto de la enfermedad; incluso se llegó a establecer un periodo de vida máximo a partir de la infección inicial. Pero, recientemente se han publicado trabajos hechos en las regiones citricolas de China atacadas por el HLB desde hace casi 100 años, los cuales muestran evidencias de que las huertas de cítricos, atacados por el HLB, aún se mantienen en producción (Deng *et al.*, 2012).

En México son escasos los reportes publicados sobre las concentraciones de *C. Las* en limón mexicano y, en general para cítricos, lo que justifica la investigación sobre estos aportes de conocimientos epidemiológicos. Se observó un rango de variación de la concentración de *C. Las* en material vegetal de limón mexicano, similar al reporte de Hu *et al.* (2014), en cítricos dulces en condiciones de invernadero. También se observó una variación cíclica de la concentración de la bacteria *C. Las*, lo cual coincide, en parte, con lo reportado para el estado Florida, E.U. (Hu *et al.*, 2014) y Brasil (Sauer *et al.*, 2015). Esta variación cíclica identificada apoya la hipótesis de que la distribución de la bacteria varía a lo largo del año y en función del tipo de hospedante (Hu *et al.*, 2014). Este fenómeno tendría que considerarse en las estrategias de manejo y control del PAC, debido a

que los resultados de los muestreos y su diagnóstico, tanto de material vegetal como de psílicos asociados, dependerán de la fase creciente o decreciente de dicha variación. Aunque en el presente estudio no se evaluó la concentración de *C. Las* en PAC, se considera que la cantidad de bacteria viva en el insecto estaría asociada con las fases de variación detectadas de acuerdo con lo reportado por Yan *et al.* (2014).

Se observó el fenómeno de una variación de la concentración de *C. Las* en el periodo de un año completo (2014); algo similar se reportó para el caso de la variación estacional de la concentración de *C. Las* en cítricos dulces de Florida, E.U., entre el inicio del 2011 y hacia el final del mismo año (Hu *et al.*, 2014). Esta variación anual de la concentración de *C. Las* al parecer está más relacionada con el fenómeno de “Quorum sensing” (QS), que con las variables meteorológicas y las poblaciones de PAC en las huertas infectadas. Parker *et al.* (2014) reportaron en pruebas de laboratorio que la bacteria *C. Las*, desarrollada en medios de cultivo con jugos de cítricos adicionados, encontraron que la viabilidad de la bacteria mostró tendencias de crecimiento cíclico, con fases decrecientes y crecientes durante el periodo del experimento. El desarrollo cíclico u oscilatorio es una característica de las poblaciones bacteriales atribuible a fluctuaciones internas o externas al sistema, relacionadas principalmente con presencia de recursos alimenticios (Parker *et al.*, 2014). De acuerdo con algunos reportes, el fenómeno de QS tiene relación con el estado fisiológico y nutrimental del hospedante. Este resultado tiene importancia porque permite conocer la distribución de bacterias viables y no viables en árboles infectados, y de esta manera es factible deducir la

época de mayor probabilidad de dispersión de la bacteria, por parte del PAC. A su vez, esta probabilidad de dispersión tiene relación con la distribución de asimilados en los árboles durante el año, porque los asimilados representan la disponibilidad de fuentes de carbono para el crecimiento y desarrollo de *C. Las*.

Diferencias en las concentraciones de *C. Las* entre hojas jóvenes y maduras

La mayor concentración de *C. Las*, en hojas fotosintéticas, respecto a la encontrada en hojas jóvenes, es una tendencia contraria a lo reportado por diversos investigadores (Folimonova *et al.*, 2009; Folimonova & Achor., 2010); aunque una posible explicación a este hallazgo se refiere a la presencia de mayor fuente de energía en las hojas maduras o activas fotosintéticamente (Razi *et al.*, 2015). De manera complementaria también se tienen reportes que apoyan la versión de que la morfología de las hojas jóvenes representan la opción de alimento y de oviposición para *Diaphorina citri*.

Condiciones de tiempo atmosférico durante el estudio

La relación estadística entre las variables atmosféricas y la concentración de *C. Las*, no se presentó de manera significativa en este trabajo, pero los valores de correlación entre la concentración de bacterias vivas y la precipitación pluvial se manifestó inversamente proporcional (r de Pearson -0.153, $P=0.616$), lo que significa que la bacteria viva se reduce a medida que aumenta la precipitación en la región y a la inversa. Otro fenómeno similar ocurrió con el conteo de PAC y la

Precipitación pluvial (r de Pearson -0.137 , $P=0.686$), aunque no fue estadísticamente significativo, la cantidad de PAC en las trampas amarillas disminuyó conforme aumenta la precipitación pluvial en la región. Esta falta de correlación, entre variables atmosféricas con la concentración de *C. Las* y las poblaciones de PAC, se han reportado de manera previa en diferentes zonas cítricas del mundo (Gottwald, 2008; Beloti *et al.*, 2013).

Posible efecto de “Quorum sensing” en *C. Las*

Durante el desarrollo del presente trabajo se detectaron cuatro fechas en las cuales se pudo haber presentado el efecto de “quorum sensing”, debido a que la cantidad de bacteria muerta fue superior en comparación con las vivas. En octubre de 2013 el promedio de bacterias vivas fue de 4.3 *C. Las*/gramos de tejido mientras que la concentración de las muertas fue de 6.7 *C. Las*/gramos de tejido; en febrero de 2014 se presentó un comportamiento similar pues las bacterias vivas tuvieron una concentración de 4.0 *C. Las*/gramos de tejido y las muertas 6.8 *C. Las*/gramo de tejido; posteriormente en mayo de 2015, la concentración de bacterias vivas fue de 4.2 *C. Las*/gramos de tejido y las muertas 6.4 *C. Las*/gramos de tejido; en la penúltima evaluación realizada en septiembre de 2015 se presentó nuevamente este tipo de comportamiento, las bacterias vivas presentaron una concentración de 4.2 *C. Las*/gramos de tejido y las muertas 6.3 *C. Las*/gramos de tejido (Fig. 1). Este comportamiento podría estar ligado a la formación de biopelículas por parte de *C. Las*, lo cual explicaría este tipo de comportamiento, puesto que estaríamos cuantificando a las bacterias muertas que

recubren a las vivas cuando se presenta el “quorum sensing”, lo cual tiene sentido puesto que, es en etapas calurosas cuando se identificó este comportamiento y se estaría presentando como respuesta ante condiciones desfavorables para *C. Las* (Antunes *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2014). Existen reportes en los cuales se han identificado los genes responsables de la comunicación entre bacteria en el genoma de *C. Las* (Yan *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La variación de la concentración de la bacteria no está asociada con el efecto de las variables de tiempo atmosférico estudiadas, al menos, para la región de Tecomán, Colima, y en el periodo de tiempo marcado.

La detección de la variación cíclica de la concentración de *C. Las* en material vegetal de limón mexicano, es otro fundamento epidemiológico para el manejo de la enfermedad, de manera práctica en programas de muestreo y de control de la enfermedad.

Estos resultados representan el primer aporte en conocimiento para limón mexicano en Tecomán, Colima, México, de la posible presencia del fenómeno de 'Quorum sensing' presentándose en la dinámica poblacional de *C. Las* en el cultivo de limón mexicano, lo cual apunta a que la variación de la bacteria pudiera estar asociada con el estado nutrimental de los árboles de limón mexicano de la región de Tecomán, Colima, México.

A partir de estos resultados es factible mencionar que la convivencia del PAC, la bacteria y los árboles de cítricos representan evidencia de las estrategias desarrolladas para evolucionar de manera conjunta. Las prácticas culturales aplicadas por los productores citrícolas, principalmente el manejo de la nutrición de las plantaciones, ayudan a mantener la viabilidad del cultivo aun con las infecciones debidas a la enfermedad. La presencia de estas enfermedades obliga a que, los gobiernos de diferentes niveles y los productores, se unan para

promover investigaciones específicas, que coadyuven en el combate de la enfermedad.

PERSPECTIVAS

Aunque en el presente estudio no se evaluó la concentración de *C. Las* en PAC, se considera que la cantidad de bacteria viva en el insecto estaría asociada con las fases de variación detectadas. Lo anterior, debería ser objeto de evaluación en ensayos futuros, por la importancia epidemiológica que representa en las acciones de caracterización de dispersión de la enfermedad del HLB.

Durante el proceso de toma de muestras se colectaron hojas asintomáticas a la enfermedad; sin embargo, estas hojas contenían altas concentraciones de *C. Las*, por lo cual se puede decir que no existe una relación alguna entre la concentración de bacterias y la severidad de los síntomas; lo anterior coincide con lo reportado por Gottwald (2008), quien mencionó que no se tiene evidencia de relación directa entre la sintomatología del HLB y la concentración de *C. Las*.

Como resultado del presente trabajo se busca focalizar acciones de muestreo y control de PAC en periodos de alta concentración de bacteria. Modificar las cantidades de muestras a lo largo del año, aumentando el tamaño de muestra en temporada baja de *C. Las* y disminuyendo el tamaño de muestra cuando aumenta la concentración de *C. Las*.

La variación identificada en la concentración de *C. Las* en las temporadas, indica una mayor cantidad de estrés en los árboles debido a la presencia de bacteria

viva, esto podría servir para apoyar programas regionales de manejo nutricional en limón mexicano. Se recomienda repetir este tipo de trabajos en otras regiones cítricas para validar la variación cíclica de *C. Las* en otras variedades de cítricos y reforzar las recomendaciones de manejo nutricional, de muestreo y control.

Este trabajo sienta las bases para conocer y caracterizar la dinámica poblacional de la bacteria en material vegetal y psílicos, de manera regional, que permitan fortalecer esquemas de manejo y seguimiento epidemiológico.

Es factible comentar que una de las líneas de investigación en la búsqueda de alternativas de solución para este problema, está en el uso de herramientas de edición de genomas, utilizando CRISPR-CAS, para modificar los genes que intervienen en el proceso de infección de esta bacteria, sea en los mecanismos de infección en insectos, como en las plantas de cítricos.

LITERATURA CITADA

Agusti, M. 2003. Citricultura. 2da Edición, revisada y ampliada. Ediciones Mundi-Prensa. 422 p.

Alemán, J., Baños, H., y Revelo, J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. Revista Protección Vegetal 22(3):154-165.

Alvarez, S., E. Rohrig, D. Solís and M. H. Thomas. 2016. Citrus Greening Disease (Huanglongbing) in Florida: Economic impact, management and the potential for biological control. Agric Res. DOI 10.1007/s40003-016.0204-z

Amaro, AA, Maia and Gonzales, MA. 1998. Economic effects originated from citrus variegated chlorosis. Pages 123-139 in: Citrus variegated Chlorosis. L. C. Donadio and C.S. Mareira, eds. FUNEP, Jaboticabol, SP, Brazil.

Bastianel, M., Novelli, V., Kitajima, E. W., Kubo, K. S, Bassanezi, R. B., Machado, M. A and Freitas-Astúa, J. 2010. Citrus leprosis Centennial of an unusual mitevirus pathosystem. Plant Disease 94(3): 284-292.

Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, new/emerging, century-old disease. Journal of Plant Pathology 88(1): 7-37.

CABI, 2014. Crop Protection Compendium. Global Module. CAB International. UK. Disponible en <http://www.cabi.org> Fecha de consulta diciembre 2016

Caruso ME, Ferraz de Olivera R, Vasconcelos RR, Lázaro MC, Sanches SE, Carlos PL. 2007. Deficiencia hídrica agrava os síntomas fisiológicos da clorose variegada dos citros em laranjeira “Natal”. *Bragantia: revista de ciencias agrónomicas*, (66)003:373-379.

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF). 2004. NIMF No. Glosario de Términos Fitosanitarios. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. FAO, Roma, Italia.

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF). 2006. NIMF No. 8 Determinación de la Situación de una Plaga en un Área. Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias. FAO, Roma, Italia.

Crane, J.H. 2013. Key Lime Growing in the Florida Home Landscape. P. 1-9. Horticultural Sci. Dept., Univ. of Florida. Coop.Extn. Service, Gainesville, Fla.

Deng, XL, YD Gao, JC Chen, XL Pu, WW Kong and HP Li. 2012. Current Situation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in Guangdong, China, where citrus Huanglongbing was first described. *Journal of Integrative Agriculture*. 11 (3): 424-429

EPPO. 2015. PQR-EPPO Data base on quarantine pests.
<http://www.eppo.int>

EPPO/CABI. 2009. Data Sheets ib Quarantine Pests: *Xylella fastidiosa*.
http://www.eppe.org.QUARANTINE/bacteria/Xylella_fastidiosa/XYLEFA_ds.pdf

FAO, 2017 <http://www.fao.org/docrep/007/y5143s/y5143s0z.htm>

Flores-Sánchez, J. 2011. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing de los cítricos (HLB) en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.

Folimonova, SY., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, S. Gowda and WO, Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) under different conditions. *Phytopathology*. 99: 1346-1354.

FUNDECITRUS. 2009. CVC-Clorose variegada dos citrus. Fondo de Defesa da Citricultura. San Paulo Br. 12 p.

Gmitter, F.G. Jr, Chen, C. Rao, M.N. and Soneji, J.R. 2007. Citrus Fruit. In: C. Kole (Ed.). *Fruits and Nuts. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants*. P. 265-279. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany.

Grafton-Cardwell, E. E., Stelinski, L.L., Stansly, P.A. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology* 58:413-432.

Guo, Y., Zhang, Y., Li, J. L., and Wang, N. 2012. Diffusible signal factormediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:165-179.

Haapalainen M. 2014. Biology and epidemics of *Candidatus Liberibacter* species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology*. 165: 172-198.

Hollis, D. 1987. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro Islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). *Systematic Entomology*. 12: 47-61.

Hruegger, R. R. and Navarro, L. 2007. Citrus Germplasm Resources. In: I.A. Khan (Ed.). *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. P. 45-140. Wallingford, Oxfordshire, UK. CAB International.

Hu, H., A. Roy, and R.H. Brlansky. 2014. Live populations dynamics of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, the bacterial agent associated with citrus huanglongbing, in citrus and non-citrus host. *Plant. Dis.* 98: 876-884.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2010. Evaluación del Impacto Económico del Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. SAGARPA-SENASICA. México, DF. 144 p.

Irey, M. S., T. Gast, J. Cote, P. Gadea, O. Santiago, L. Briefman, and J. H. Graham. 2011. Seasonal variability in HLB testing data in plant and psyllid samples in Florida. *Proc. 2nd Int. Res. Conf. Huanglongbing, Orlando, FL*. p. 72.

Lee C., K. Jaai, S.G. Shin, S. Hwang. 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 123: 273-280

León M, G. A., Elliot, W. K., y Freitas A, J. 2016. Diagnóstico y recomendaciones de manejo de los cítricos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (CORPOICA-MADR). Boletín técnico. No. 47. Villacencio, Colombia. 24 p.
[http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/43742/MANUAL_LEPRO SIS.pdf](http://corpomail.corpoica.org.co/BACFILES/BACDIGITAL/43742/MANUAL_LEPRO_SIS.pdf)

Li, WB, CH Zhou, WD Pria Junior, DC Teixeira, VS Miranda, EO Pereira, AJ Ayres, CX He, PI Costa, JS Hartung. 2002. Citrus and coffee strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 84:591-597.

Li, WL., Q. Cong, J. Pei, L. N. Kinch and N. V. Grishin. 2012. The ABC transporters in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Proteins*. 2614-2628

Loh, J., Pierson, E. A., Pierson, L. S., 3rd, Stacey, G., and Chatterjee, A. 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:285-290.

Lopes, S.A., Luiz, F.Q.B.F., Martins, E.C., Fassini, C.G., Sousa, M.C., Barbosa, J.C. and Beattle, G.A.C. 2013. "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. *Plant Disease* 97(12): 1563-1570.

Manjunath, K.L., Halbert, S.E., Ramadugu, C., Webb, S. and Lee, R.F. 2008. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* and Its Importance in the Management of Citrus huanglongbing in Florida. *The American Phytopathological Society* 98(4): 387-396.

Morton, C.M. Grant, M. and Blackmore S. 2003. Phylogenetic relationships of the aurantiodeae inferred from chloroplast DNA sequence data. *American Journal of Botany* 90(10):1463-1469.

Morton, J. 1987. Mexican Lime In: Julia F. Morton. *Fruits of warm climates*. P. 168-172. Miami, Florida.

Munyaneza, J.E., T. Mustafa, T.W. Fisher, V.G. Sengoda and D.R. Horton. 2016. Assessing the Likelihood of Transmission of *Candidatus Liberibacter solanacearum* to Carrot by Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae). *Plos One*. 11 (8): e0161016. DOI: 10.1371/journal.pone.0161016.

National Research Council. 2010. *Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening*. The National Academies Press. Washington, D. C. DOI: <https://doi.org/10.17226/12880>.

Nealson, K. H., and Hastings, J. W. 1979. Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* 43:496-518.

Orozco-Santos, M., García-Mariscal K. y Varela-Fuentes S. 2013. Los cítricos y su sanidad. In: S.E. Varela-Fuentes, M. Orozco-Santos, R.I. Torres Acosta y G.L. Silva Aguirre, (Eds.). *Guía técnica para identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos*. P. 1-13. Departamento de Fomento Editorial de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Bermúdez-Guzmán M. J., Carrillo Medrano, S. H., Medina-Urrutia, V. M., Hernández-Fuentes, L. M., Gómez-Jaimes, R., Manzano-

Sánchez, G., Farías-Larios, J., Nieto-Ángel, D., Mijangos-Hernández, E., Sánchez-de la Torre, J. A. y Varela-Fuentes, S. 2014. El Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 449 p.

Ouvrard, D., P Chalise and DM Percy. 2016. Host-plant Leaps versus host-plant shuffle: a global survey reveals contrasting patterns in an oligophagous insect group (Hemiptera, Psylloidea). *Systematics and Biodiversity*. 13 (5): 434-454.

Parker, J. K., S. R. Wisotsky, E. G. Johnson, F. M. Hijaz, N. Killiny, M. E. Hiff and L. de La Fuente. 2014. Viability of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' prolonged by addition of Citrus juice to culture medium. *Phytopathology*. 104: 15-26

Pérez-Zárate, L. A., F. Osorio-Acosta, J. A. Villanueva-Jiménez, I. D. Ortega-Arenas y R. G. Chiquito-Contreras. 2016. Factores que inciden en el control químico de *Diaphorina citri* Kuwayama en Áreas Regionales de Control. *Southwestern Entomologist*. 41 (4): 1037-1050.

Quiñones, B., Dulla, G., and Lindow, S. E. 2005. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 18:682-693.

Raithore, S., S. Dea, A. Plotto, J. Bai, J. Manthey, J. Narciso, M. Irey, E. Baldwin. 2015. Effect of blending Huanglongbing (HLB) disease affected orange juice with juice from healthy orange on flavor quality. *Food and Science and Technology*. 62: 868-874

Rojas B., M. M. 2010. Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. Rev. Colomb. Biotecnol. 13 (2): 135-143

Sambrook, J. & Green M.R. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sauer, A.V., C.A. Zanutto, P.T.R. Nocchi, M.A. Machado, C.H. Bock and W. M. C. Nunes. 2015. Seasonal variation in populations of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" in citrus trees in Paraná state, Brazil. Plant Dis. 99: 1125-1132.

SENASICA. 2016. Cancro de los cítricos (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Ficha Técnica No. 33. 28 p.

Shrestha, R. L., D. D. Dhakal, D. M. Gautum, K. P. Paudyal, I. S. Shrestha. 2012. Study of fruits diversity and selections of elite acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) genotypes in Nepal. American Journal of Plant Science. 3: 1098-1104.

SIAP. 2015. Producción Agrícola: Cíclicos y Perennes 2013. Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA-Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-ls-produccion-agricola-por-estado/>. Consultado: 20 de enero de 2017.

Swingle, W. T. y Reece P. C. 1967. The botany of Citrus and its will relative of the oranges subfamily. In: W. Reuther, H. J. Webber, L. D. Batchelor (Eds). The Citrus Industry.p.190-430. Berkeley, California. University of California Press.

Trivedi P., U.S. Sagaram, J.S. Kim, R.H. Brlansky, M.E. Rogers, L.L.

Stelinski, C. Oswalt, C. Wang. 2009. Quantification of viable '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in host using quantitative using PCR with the Aid of Ethidium Monoazide (EMA). J. Plant Pathol. 124: 553-563.

Tsai, J.H., Wang, J.J., Yong-hong, L. 2002. Seasonal abundance of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in the Southern Florida. Florida Entomologist 85(3):446-451.

Vandecandelaere, E., and J. E. Mery. 2007. FAO-AGNS. Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco del estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen.

http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Limon_Chile.pdf. Consultada: 16 de abril de 2014.

Vegas, R. U. and C. M. Narrea. 2011. Manejo integrado del cultivo de limón. Jornada de Capacitación Pp. 1-43. UNALM-Agrobanco. Cieneguillo, Sullana-Piura.

Von Bodman, S. B., Bauer, W. D., and Coplin, D. L. 2003. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 41:455-482.

Wang, L. and Mustapha, A. (2010), EMA-Real-Time PCR as a Reliable Method for Detection of Viable *Salmonella* in Chicken and Eggs. Journal of Food Science, 75: M134–M139. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01525.x

Waters, C. M., and Bassler, B. L. 2005. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 21:319-346

Yan, Q., A. Sreedharan, S. Wei, J. Wang, K. Pelz-Stelinski, S. Folimonova and N. Wang. 2014. Global gene expression changes in '*Candidatus Liberibacter*

asiaticus' during the transmission in distinct hosts between plant and insect.
Molecular Plant Pathology. 14 (4): 391-404.

Zadjali, T. S., R. Ibrahim and A. K. Al-Rawahi. 2008. First record of
Diaphorina citri Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) from the Sultane of Oman.
Insecta Mundi Pp. 1-7.

ANEXOS

PROGRAMA DE SAS PARA ANÁLISIS ESTADÍSTICO GLOBAL DE DINAMICA POBLACIONAL DE CLAS EN MUESTRAS VEGETALES DE LIMÓN MEXICANO, DE TECOMÁN, COLIMA. 2013 A 2015.

```
DATA CONCENTRA_FINAL;  
INPUT DATE$ TRAT$ TREE RAMA HOJA$ CT_N CT_E TOTAL VIVAS MUERTAS T_MED  
HR_MED T_MIN PP;  
DATALINES;
```

(BASE DE DATOS CON 2562 ELEMENTOS)

```
/*PROC PRINT;  
RUN;  
QUIT;*/  
PROC SORT; BY DATE HOJA;  
RUN;  
QUIT;
```

***PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE VARIACIÓN PARA PROBAR LA SIGNIFICACNIA DE EFECTOS DE FACTORES (FECHA Y TIPO DE HOJA) SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIA VIVAS Y MUERTAS**

```
PROC MEANS; BY DATE HOJA;  
VAR VIVAS MUERTAS;  
RUN;  
QUIT;  
/*PROC FREQ; BY DATE;  
TABLE DATE*HOJA;  
RUN;  
QUIT;  
PROC GLM; BY DATE;  
CLASS HOJA;  
MODEL VIVAS MUERTAS=HOJA;  
MEANS HOJA/TUKEY LINES;  
RUN;  
QUIT;
```

***PROCEDIMIENTO DE CORRELACIÓN DE PEARSON PARA PROBAR POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS CLAS VIVAS Y MUERTAS CON VARIABLES DE TIEMPO ATMOSFÉRICO Y CONTEO DE PSÍLIDOS ADULTOS.**

```
PROC CORR; BY DATE;  
VAR VIVAS MUERTAS T_MED T_MIN HR_MED PP CONTEO;  
RUN;  
QUIT;
```



Research Article

Dynamics of Huanglongbing-associated Bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Citrus aurantifolia* Swingle (Mexican Lime)

^{1,2}Jose Abel López-Buenfil, ^{1,2}Jose Abraham Ramírez-Pool, ¹Roberto Ruiz-Medrano, ¹María del Carmen Montes-Horcasitas, ²Claudio Chavarín-Palacio, ³Jesús Moya-Hinojosa, ²Francisco Javier Trujillo-Arriaga, ⁴Rosalía Lira-Carmona and ¹Beatriz Xoconostle-Cázares

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508 San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, Ciudad de México, US

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Unidad Integral de Servicios, Diagnóstico y Constatación, Km 37.5, Carretera Federal México-Pachuca, Tecámac, C.P. 55740, Estado de México, US

Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Colonia San Manuel, Ciudad Universitaria, C.P. 72592 Puebla, México, US

Hospital de Pediatría, Hospital General Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, Avenida Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, C.P. 06720, Ciudad de México, US

Abstract

Background: The bacterial disease citrus huanglongbing (HLB), associated with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (C.Las) has severely impacted the citrus industry, causing a significant reduction in production and fruit quality. In the present study, it was monitored the C.Las population dynamics in symptomatic, HLB-positive Mexican lime trees (*Citrus aurantifolia* Swingle) in a tropical, citrus-producing area of Mexico. The objective of this study was to identify the dynamics of the population of huanglongbing-associated bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* and its insect vector in *Citrus aurantifolia* Swingle (Mexican lime). **Materials and Methods:** Leaf samples were collected every 2 months over a period of 26 months for quantification of bacterial titers and young and mature leaves were collected in each season to determine preferential sites of bacterial accumulation. The proportion of living and dead bacterial cells could be determined through the use of quantitative real-time PCR in the presence of ethidium monoazide (EMA-qPCR). **Results:** It was observed a lower bacterial titer at high temperatures in the infected trees relative to titers in mild weather, despite a higher accumulation of the insect vector *Diaphorina citri* in these conditions. This study also revealed seasonal fluctuations in the titers of bacteria in mature leaves when compared to young leaves. No statistically significant correlation between any meteorological variable, C.Las concentration and *D. citri* population could be drawn. **Conclusion:** Although, HLB management strategies have focused on vector control, host tree phenology may be important. The evaluation of citrus phenology, C.Las concentration, ACP population and environmental conditions provides insights into the cyclical, seasonal variations of both the HLB pathogen and its vector. These findings should help in the design of integrative HLB control strategies that take into account the accumulation of the pathogen and the presence of its vector.

Key words: *Candidatus Liberibacter asiaticus*, huanglongbing, *Citrus aurantifolia*, population dynamics, plant management, epidemiology, bacterial quantification, environment influence

Received:

Accepted:

Published:

Citation: Jose Abel López-Buenfil, Jose Abraham Ramírez-Pool, Roberto Ruiz-Medrano, María del Carmen Montes-Horcasitas, Claudio Chavarín-Palacio, Jesús Moya-Hinojosa, Francisco Javier Trujillo-Arriaga, Rosalía Lira-Carmona and Beatriz Xoconostle-Cázares, 2017. Dynamics of huanglongbing-associated bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Citrus aurantifolia* Swingle (Mexican lime).

Corresponding Author: Beatriz Xoconostle-Cázares, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN 2508 San Pedro Zacatenco, C.P. 07360 Ciudad de México, US Tel: +52-55-57473318

Copyright: © 2017 Jose Abel López-Buenfil et al. This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing interest: The authors have declared that no competing interest exists.

Data Availability: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

INTRODUCTION

Citrus huanglongbing (HLB) is one of the most devastating diseases of citrus worldwide. This disease is associated with four phloem-restricted β -proteobacteria, "Candidatus Liberibacter" spp.,¹ which prevent the translocation of photoassimilates from source to sink plant tissues. The four reported bacterial species associated with HLB are "Candidatus Liberibacter asiaticus" (C.Las), which is the most widely distributed, infecting citrus crops in Asia, Africa and the America, "Candidatus Liberibacter africanus" (C.Laf) found only in Africa, "Candidatus Liberibacter americanus" (C.Lam) present only in Brazil¹ and "Candidatus Liberibacter caribbeanus" (C.Lca) recently reported in Colombia^{2,3}. The bacteria are transmitted by at least two insect vectors. The Asian citrus psyllid (ACP), *Diaphorina citri*, transmits three of the four species: C.Las, C.Lam and C.Lca^{4,5}, while *Trioza erytreae* only transmits C.Laf⁶.

Citrus fruits are a high value crop in Mexico. The Pacific region of Mexico is renowned for its production of Mexican limes, with the state of Colima as one of the principal producers of this particular citrus fruit. According to data from the Food and Agriculture Organization, Mexico produces over two million tons of limes and lemons, making it the third largest producer globally, preceded only by India and China⁷. The total contribution of the citrus industry to the Mexican economy is valued at 56 million dollars⁸. The first reported cases of HLB in Mexico were detected in Mexican lime trees from the Tizimín municipality in Yucatan. The HLB has the potential to greatly disrupt the total production of not just Mexican lemons and limes but all Mexican citrus fruits. Unfortunately, as of yet, there is no cure for HLB. So far in Mexico, HLB management strategies are based on vector control with chemical insecticides. Monitoring the ACP population using yellow sticky traps is an important phytosanitary measure used to decide which strategies for insecticide application to pursue⁹. Thus far, this has been the most effective way to mitigate the rapid spread of HLB in orchards when used in conjunction with disposal of infected trees and the use of healthy bud wood.

Attempts to correlate seasonal fluctuations in C.Las population with ACP populations and their effects on the spread and severity of HLB have yielded mixed results. Measurement of bacterial viability by propidium monoazide qPCR (PMA-qPCR) in graft-infected, greenhouse grown sweet orange and *Severinia buxifolia*, a non-host plant, across 20 months (August, 2010-April, 2012) demonstrated that the populations of live C.Las were lower during the winter months^{8,9}. In Brazil, the population dynamics of C.Las in naturally infected sweet orange trees were monitored for

2 years (April, 2010-April, 2012) using qPCR, revealing that bacterial concentrations tended to be highest in autumn and lowest in spring and summer⁹. A similar study carried out in Florida reported large numbers of HLB-positive trees diagnosed between August and January, though the highest bacterial concentrations were found in December¹⁰. Conversely, in Pakistan, the number of trees diagnosed with HLB was largest during the summer, in spite of fewer C.Las circulating in the ACP vector population¹¹.

Epidemiological models developed for HLB have assumed a linear relationship between infection and manifestation of symptoms because as of yet, it has not been possible to precisely determine the point where infection begins¹². Attempts to characterize the epidemiology of HLB are also hampered by the lack of studies on the variation of C.Las concentration in both plant tissues and the ACP vector¹³, again stemming from the difficulty in defining a starting point of infection. Under controlled conditions, the incubation period of HLB is estimated to range from 3-12 months. However, the incubation periods seen in the field can last 5 years^{14,15}. This discrepancy illustrates the importance of understanding how a plant pathogen progresses throughout its pathology and how that relates to crop management practices. So far, information on the behavior of C.Las in the field has been scarce since the complexity of its pathology makes it a difficult disease to observe.

It is worth noting that various technical reports have indicated a weak correlation between the concentration of the bacteria and the severity of the HLB symptoms. It seems as though the expression of symptoms in an infected tree depends on host factors such as citrus variety, age and nutritional status, among others^{13,16}. As such, visual quantification of the characteristic diffuse mottle in individual trees is not indicative of C.Las concentration in the plant¹⁹.

In this study, it was monitored HLB-infected Mexican lime trees in Tecoman, Colima, Mexico for over 2 years in order to track bacterial titer fluctuations and potentially reveal any seasonal patterns. Both living and dead C.Las concentrations were quantified in leaf midrib tissues using EMA-qPCR. Young and mature leaves were also sampled and analyzed separately to determine how the changes in C.Las titer vary across tissues in distinct stages of development. Counts of adult ACP within the orchard and meteorological data were also collected throughout the experimental period. While there were some slight seasonal variations in C.Las concentration observed, statistical analyses failed to uncover any meaningful relationships between the bacterial titers and the environmental variables considered in our study. To our knowledge, the data herein constitutes the first work on C.Las population dynamics in Mexican lime in this country. It will

serve as a useful complement to existing ACP control strategies; this will, in turn, produce more effective, integrated disease management protocols and yield further insight into the epidemiology of HLB.

MATERIALS AND METHODS

Tree selection: The state of Colima was chosen for the experiment because HLB is endemic to the area and it is one of the largest producers of Mexican lime. The trial was run in a citrus orchard called "Rancho el Pandelo y Las Animas" in the town of Tecoman, Colima State with the following geographical reference coordinates: 18.93487°-103.92576°. In June, 2013, leaf samples were collected from 53 years old trees, exhibiting the diffuse mottling typical of HLB for molecular diagnosis of HLB in the laboratory.

Total DNA purification and HLB detection: Finely minced leaf midrib tissue (100 mg) was transferred to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing a porcelain pellet. About 550 μ L of PBS (50 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.2) was added and the tissue was macerated using a TissueLyser LT homogenizer (Qiagen; Hilden, Germany). The DNA purification was performed with the commercial AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep kit (Axygen Biosciences) according to the manufacturer's instructions. The DNA was resuspended in 100 μ L of elution buffer before quantifying concentration and purity with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher, Scientific; Waltham, MA). All samples were stored at -20°C for further use.

Molecular detection of C.Las by PCR: End-point PCR was employed for C.Las detection using a previously described primer pair¹⁷. A T100 Thermal Cycler (Bio-Rad; Hercules, CA) was used to carry out all the 25 μ L PCR reactions containing 2 μ L of sample DNA (50 ng μ L⁻¹) and reagents at the following concentrations: 1x buffer (Invitrogen), 2.5 mM MgCl_2 (Invitrogen), 0.16 mM of each dNTP (Invitrogen), 0.5 μ M forward primer 011 (5'-GCGCAAATGCGTGAGCGGTACCA-3'), 0.5 μ M reverse primer 012c (5'-TCGGCCGCCCTTCGAAACC CAT-3') and 1 U of platinum Taq (Invitrogen). The amplification program consisted of an initial denaturing step at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 62°C for 30 sec, 72°C for 60 sec with a final extension at 72°C for 10 min. Positive HLB infection was confirmed by resolution of the 1160 bp PCR product on a 1% (w/v) agarose gel.

Twenty four HLB-positive trees, averaging 1.8 m in height, were selected. The trees were planted with an 8 m spacing between rows and 4 m between columns. The trees were isolated from the orchard with anti-aphid mesh tunnels

measuring 6.363 m high (12 trees structure⁻¹). Crop management was performed according to the regional practices. Leaf samples were taken every 2 months, starting in October, 2013.

Quantification of live and dead bacteria: Leaf samples for the determination of live HLB titers were collected in March (spring), May (summer), September (autumn) and December (winter). Seven young and mature leaves from four branches per tree were collected; all seven leaves from the same branch. Non-infected trees were similarly sampled to serve as a control. Young leaves were identified by their apical position on the selected branch while mature, photosynthetically active leaves were collected from the basal part of the same branch. Young and mature leaves were processed separately. The plant material was prepared for DNA extraction as follows: Leaf midribs (100 mg) were finely minced using disposable blades, weighed and transferred to a 1.5 mL microcentrifuge tube for homogenization with the TissueLyser LT (Qiagen). Duplicate samples were prepared: one for standard genomic DNA extraction and the other for extraction in the presence of Ethidium MonoAzide (EMA) to assess live/dead bacterial concentration. The homogenized tissue samples were stored at -80°C pending further processing.

DNA extraction from live bacteria: The DNA extraction from live bacteria was performed according to the previously described EMA method¹⁸ with the following modifications: About 300 μ L of PBS buffer (50 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.2) was added to a 1.5 mL microcentrifuge tube containing plant tissue and the sample was agitated for 5 min. The EMA was added to the samples to a final concentration of 100 μ g mL⁻¹ and gently shaken for 5 min in the dark. The EMA was bound to free DNA by exposing the samples to a 650 W halogen bulb for 2 min while the samples were on ice. The samples were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min, the supernatant was discarded and finally the tissue was macerated with a TissueLyser LT (Qiagen). The DNA extraction proceeded using the previously mentioned method. The DNA concentration and purity was determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

C.Las 16S recombinant plasmid construct: A C.Las 16S rDNA fragment was amplified using previously described primers 011/012¹⁹ yielding a PCR product of 1160 bp, which was then cloned into the pGEM®-T-Easy vector (Promega; Madison, WI) by following the manufacturer's instructions. Chemically competent Mach1-T1 *E. coli* cells were transformed by heat shock and plated on LB agar with 100 μ g mL⁻¹ ampicillin. The bacterial colonies containing the insert were identified by

a-complementation. Plasmid purification was performed using the PureLink Quick Miniprep Plasmid Kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was determined with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). To calculate a quantification curve, the plasmid copy number was determined as follows:

$$\text{Copies of 16S plasmid} = \frac{\text{Concentration (ng)} \times \text{Avogadro's number}}{\text{Length (bp)} \times 1 \times 10^6 \times 650}$$

where, 650 is the mass of each base pair in daltons and Avogadro's number is 6.022×10^{23} . Ten-fold serial dilutions of plasmid DNA at 10^8 , 10^7 , 10^6 and 10^5 copies μL^{-1} were prepared.

Detection of C.Las by quantitative real time PCR: The real-time PCR reactions for detecting C.Las used previously reported primers and probes^{17,19}. All qPCR amplifications were run on the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Each 25 μL reaction contained 2 μL of sample DNA and the following reagents: 1x PCR buffer (Invitrogen), 2.4 mM MgCl_2 (Invitrogen), 0.24 mM of each dNTP (Invitrogen), 0.12 mM forward HLBas (5'-AGCTCGGCGGCATATACG-3'), 0.12 mM reverse HLB (5'-TCCGCGTTACGTAGAAGGAAATAG-3'), 0.12 μM HLB probe (5'-6-FAM-AGACGGAGTGTGGCCAAC-3'BHQ-1), 0.12 mM forward C0X (5'-GTATGCGCACACGTCTTCCAGA-3'), 0.12 mM reverse C0X (5'-GCCAAAAAGACTGCTGGCATTTC-3'), 0.12 μM C0X probe (5'-TET-ATCATGCAGGCACTTCTGG-3' BHQ-2) and 1 U Taq platinum (Invitrogen). Each DNA sample and the standard curve reactions were assayed in triplicate. The qPCR assays were run at 94°C for 20 sec, followed by 40 cycles of 94°C for 1 sec then 58°C for 40 sec. Fluorescence signal amplification was set for each cycle. Ct values obtained from the standard curve reactions were used to draw a linear regression plot, from which the resulting equation was calculated: $y = -3.4282x + 46.596$, with an $R^2 = 0.9997$. Based on that equation, following formula was obtained for determining bacterial titer:

$$\text{Concentration} = 10^{\frac{(46.596 - y)}{3.4282}}$$

The C.Las concentrations in the experimental samples were determined by interpolating their Ct values.

Asian citrus psyllid quantification: Two sticky 24 × 18 cm yellow traps were placed at the center of each tunnel of

Mexican lime trees. The old traps were collected and new yellow traps were installed on the same dates as leaf sampling. Positive ACP identification and count was performed at the Laboratory of Entomology and Acarology of the National Phytosanitary Reference Centre.

Weather information: Meteorological data were obtained from the National Agricultural Meteorological Station Network of the National Institute of Forestry, Agriculture and Fisheries (INIFAP), from the Tecoman station in Colima, located at 18.96683°-103.84227°. Average temperature, minimum temperature, maximum temperature, average relative humidity and rainfall were all monitored during the trial period.

Statistical analysis: The database generated from the quantification of C.Las in the various samples obtained from distinct places on 24 Mexican lime trees was compiled in Microsoft Excel and then transferred to SAS²⁰ for an analysis of variation and identification of statistically significant differences between aggregation factors (evaluation dates, trees, branches, young and mature leaves) using the Fisher 'F' ratio of variances (PROC GLM in SAS). Having identified the significant relationship of the above factors, a multiple comparison of averages was applied with the Tukey test ($\alpha = 0.05$). The identification of possible statistical correlations between atmospheric variables, ACP counts from the yellow traps and concentration of C.Las was performed using the SAS PROC CORR procedure to generate the estimations of Pearson's "r" with a probability of $p < 0.05$.

RESULTS

C.Las population dynamics in Mexican lime trees: During the 2 years trial period, the total C.Las titer peaked numerous times (Fig. 1). The first peak, in December, 2013 shows an increase in the concentration of living bacteria. The next peak in total bacterial titer, in May, 2014, actually has a greater proportion of dead cells. The ratio of live/dead C.Las skewed towards live cells again in November, 2014. Interestingly, the total bacterial titer after the winter of 2014 never returns to the same levels, though there are two peaks in 2015, during July and December. In July, 2015, there was a majority of dead C.Las, while in December, 2015, there was a return to a majority of live cells. The ratio of live/dead bacteria was largest during the autumn and winter peaks (December, 2013, November, 2014 and December, 2015), while a higher proportion of dead C.Las was seen during the hot summer months. These fluctuations followed a particular pattern, with highest total titers of bacteria present in months with mild

temperatures and decreasing during those with high tropical temperatures. Indeed, these high titers also coincided with the periods of new shoot emergence.

The concentrations of living C.Las display a slightly different behavior. After the first peak concentration of live C.Las in December, 2013, there was a fairly long period-from July, 2014 to November, 2015, where the ratio of live/dead bacteria remained elevated. Thereafter, a steady reduction was observed until July, 2015. Finally, the last recorded peak in live C.Las concentration occurred in December, 2015. Throughout the evaluation period, the trees exhibited typical HLB-associated symptoms even as the bacterial titers

fluctuated between each assessment date. Live C.Las concentrations varied across samples from 9.93×10^3 to 5.93×10^6 C.Las g^{-1} tissue, while the titer of total bacteria ranged from 5.38×10^3 to 1.98×10^7 C.Las g^{-1} tissue.

A comparison between average concentrations obtained during the different assay dates revealed that the largest titers of live bacteria were present in December, 2013, September, 2014 and November, 2014, while the lowest titers of live C.Las corresponded to October, 2013, February, 2014, May, 2015 and September, 2015 (Table 1). As concentrations of live C.Las decreased, the proportion of dead cells increased.

Table 1: Average log concentrations of live and dead C.Las bacteria recorded in Mexican lime

| Date of evaluation | Total samples | Average log live HLB | Tukey (p<0.05) | Average log dead HLB | Tukey (p<0.05) |
|--------------------|---------------|----------------------|----------------|----------------------|----------------|
| November, 2014 | 96 | 6.570 | A | 0.519 | F |
| September, 2014 | 96 | 6.392 | A | 0.305 | FF |
| December, 2013 | 96 | 6.270 | AB | 0.472 | EF |
| January, 2015 | 96 | 5.965 | BC | 0.593 | EF |
| July, 2014 | 96 | 5.840 | CD | 0.632 | EF |
| December, 2015 | 96 | 5.680 | CD | 0.596 | D |
| July, 2015 | 96 | 5.551 | D | 1.197 | DE |
| March, 2015 | 576 | 5.006 | E | 0.939 | AB |
| May, 2014 | 96 | 4.720 | EF | 2.375 | B |
| October, 2013 | 96 | 4.434 | FG | 2.223 | C |
| September, 2015 | 576 | 4.377 | G | 1.653 | B |
| May, 2015 | 450 | 4.284 | G | 2.091 | A |
| February, 2014 | 96 | 4.234 | G | 2.657 | |
| | | DMS = 0.343 | | DMS = 0.351 | |

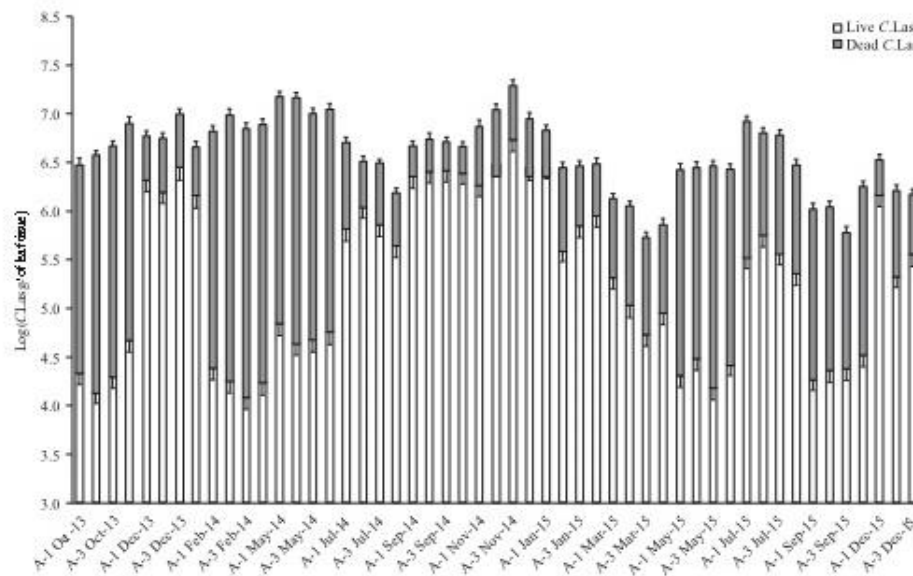


Fig. 1: Fluctuation of dead and live *Candidatus Liberibacter asiaticus* (C.Las). Bacteria was detected in the open field trial from October, 2013 to December, 2015. Bacterial quantification was performed by real-time PCR and normalized by tissue leaf weight

Differences in C.Las titers between young and mature leaves: The quantification of live and dead C.Las in both developing and photosynthetic leaves indicated that a higher

total concentration of bacteria is present in mature leaves (Fig. 2). No disease symptoms were observed in the young leaves sampled, even though they contained high

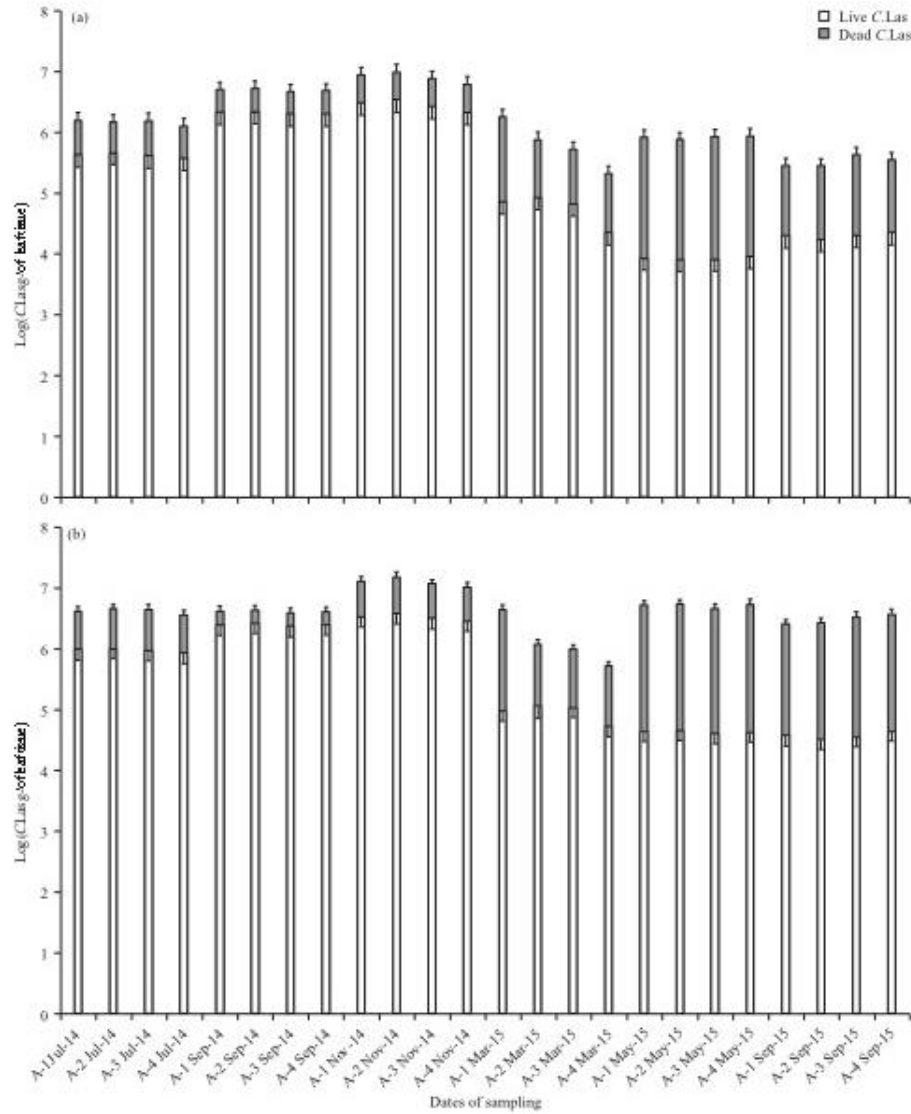


Fig. 2(a-b): Differences in C.Las titers between young and mature photosynthetic leaves. The quantification of live and dead C.Las in both developing and photosynthetic leaves showed a higher bacterial concentration is present in mature leaves. (a) Bacteria present in young leaves, grey: Dead C.Las, white: Live C.Las and (b) Bacteria present in mature leaves, grey: Dead C.Las, white: Live C.Las. A-1 to A-4 represents pooled samples from 6 trees, while the collect month and year are indicated

concentrations of C.Las, which strongly supports the idea that the bacterial titer is not proportional to the severity of HLB symptoms.

Significant variation in bacterial concentration was observed within the same tree, ranging from $8.79 \cdot 10^7$ to $1.76 \cdot 10^8$ C.Las g^{-1} of tissue. Despite the fact that this tendency was similar for all sampled trees, in some cases the differences in concentration was very drastic. It was noted that, generally, the mature leaves contained a higher total concentration of bacteria, as well as a greater proportion of live C.Las, this is probably due to their high photoassimilate content, which can be employed as a carbon source by C.Las ($F = 12.45$, $p < 0.0001$). Yet, in the last two evaluations (September and December, 2015), the titers of dead bacteria were also higher in mature leaves than in developing leaves (Table 2). Other studies reported that young leaves harbor greater numbers of bacteria compared to mature leaves. Supposedly, this distribution takes advantage of the ACP feeding preference for younger leaves²¹ to bolster C.Las transmission, when in actuality the ACP seeks out new growth for deposition of eggs. Consequently, it is possible that the high concentrations seen in mature leaves are indicative of the bacterium attempting to evade high ambient temperatures by mobilizing towards the basal part of the branches¹¹.

Dynamics of C.Las population in 2015: The dynamics of living and dead C.Las were monitored in both young and mature leaves sampled during four different evaluation periods in 2015 (spring, summer, autumn and winter) (Fig. 3). Highest concentration of total bacteria occurred in spring, with dead bacteria present in low concentrations and mature leaves exhibiting higher titers (Fig. 3a, b). In summer, a drastic increase was observed in the concentration of dead bacteria (Fig. 3c, d). The trend in autumn showed a pattern similar to the one in summer. The concentration of dead bacteria exhibited an increase compared to the dynamics seen in the spring. However, dead bacteria were present at low concentrations in young leaves (Fig. 3e, f). In winter, dead bacteria declined overall, while in young leaves the total concentration of bacteria was noticeably lower than in mature leaves (Fig. 3g, h). The total concentration of C.Las was greater in older leaves in all seasons (Fig. 3b, d, f, h).

It is pertinent to mention that the major periods of citrus shoot emergence in Tecoman take place during the summer and autumn months. That period overlaps with spring and summer. The seasons with the greatest total concentrations of C.Las (Table 3). Nevertheless, the results of the statistical analyses indicate that the largest numbers of dead bacteria are present in these seasons, while, in autumn and winter, there is a recovery of living bacteria.

Weather conditions during the study: Tecoman, Colima State has a dry tropical climate: The average annual maximum and minimum temperatures were 32.65 and 20.78°C, respectively, with an average annual temperature of 26°C (Fig. 4), this tropical municipality is considered an isothermal area since the temperatures do not vary much during the four seasons. It is known that in tropical regions, the low temperatures during the nights induce new shoot growth in citrus²². For the state of Colima there are two periods of shoot emergence reported. The first and most important, is from November to March, while the second is from June until September, when the rains begin. During this study, new shoot growth was observed when the temperatures increased and the rains arrived. In fact, some slight new growth was recorded between the months of August and December.

Associations between C.Las population and external variables: An inverse, highly significant relationship ($r = -0.934$ Pearson, $p < 0.0001$) between the concentrations of live and dead bacteria emerged from the analyses of the Mexican lime tissues during the experimental period (Table 4). Based on the strength of this inverse relationship, it is suggested that the concentration of live bacteria correlates with a concomitant reduction of dead bacteria in Mexican lime, this could be caused by a compromised defense response on behalf of the plant, which could be affected by the temperature or other environmental variables. As a

Table 2: Average log concentration of C.Las found in young and mature leaves of Mexican lime

| Leaf age | Total No. of samples | Average log C.Las | Tukey (p<0.05) |
|-------------|----------------------|-------------------|----------------|
| Mature | 1329 | 5.109 | A |
| Young | 1137 | 4.804 | B |
| DMS = 0.085 | | | |

Table 3: Comparison of the average concentrations of live and dead C.Las in Mexican lime, based on tissue type and season

| Parameters | Total young | Live young | Dead young | Total mature | Live mature | Dead mature |
|------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Summer | 58676* | 39311* | 1926* | 67149* | 4715* | 19999* |
| Spring | 58507* | 49186* | 09318* | 60444* | 5060* | 0991* |
| Autumn | 56848* | 50035* | 0680* | 68338* | 6254* | 0577* |
| Winter | 55886* | 42477* | 1341* | 64860* | 4518* | 19788* |
| Mean value | 5.7480 (0.697) | 4.5253 (0.6601) | 1.2202 (0.680) | 6.5185 (0.5312) | 5.1346 (0.7157) | 1.3867 (0.5604) |
| DMS | 0.527 | 0.4987 | 0.5139 | 0.4013 | 0.5406 | 0.4233 |

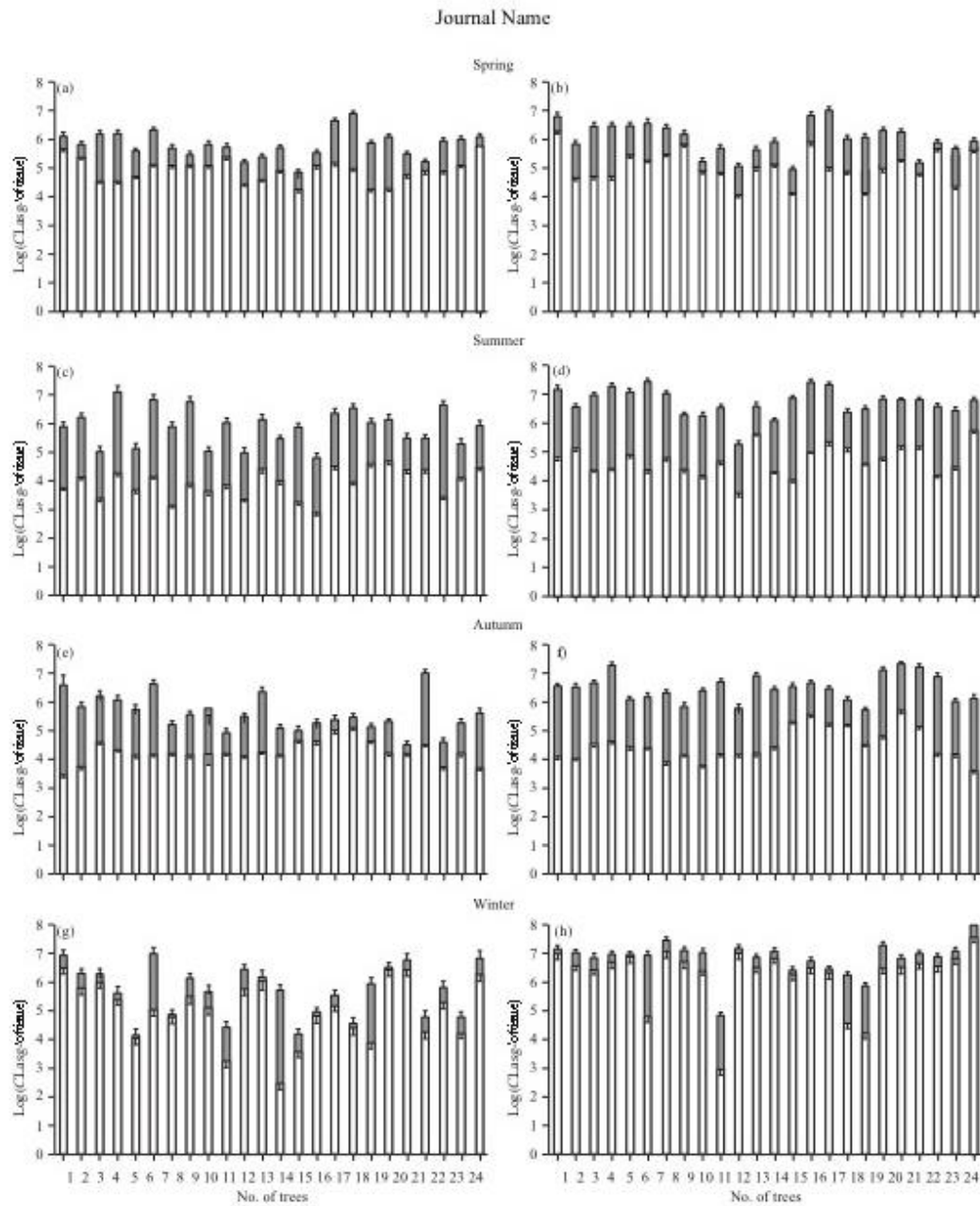


Fig. 3(a-h): Dynamics of C.Las population in 2015. Representation of living and dead C.Las in both young and mature leaves sampled during four different evaluation periods in 2015. (a, c, e, g) Young leaves and (b, d, f, h) Mature, photosynthetic leaves. Grey bars are dead bacteria, while white are alive. A-1 to A-24 are measurements of each tested tree

speculative note, it is also possible that quorum sensing may regulate oscillations in the bacteria population²³. There was no correlation between live bacterial concentration and the citrus Asian psyllid density, according to statistical analysis [Corr test,

parameters ($r = -0.137$, $p = 0.686$)]. Hence, this represents the first evidence from the Tecoman region, Colima, Mexico. In addition, there was a period of elevated bacterial concentrations between July and November, 2014 (Fig. 1),

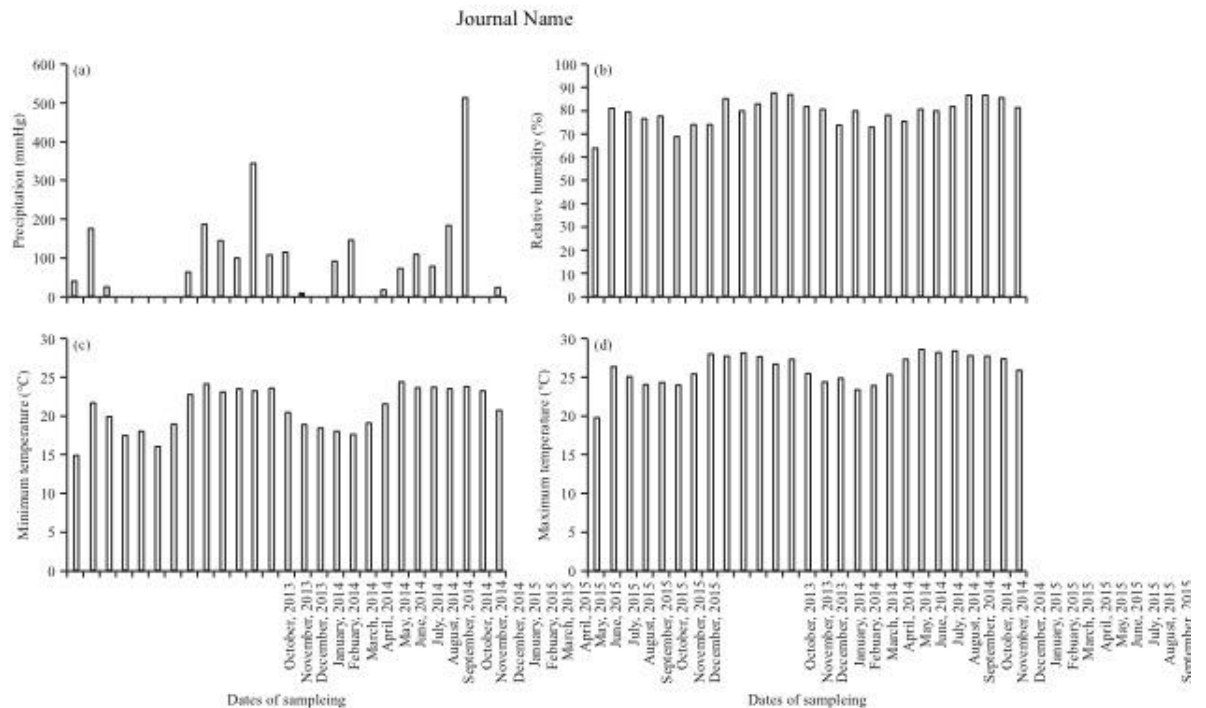


Fig. 4(a-d): Weather conditions during the study, (a) Precipitation (mmHg), (b) Relative humidity (%), (c) Minimum temperature (°C) and (d) Maximum temperature (°C)

Table 4: Statistical correlations between C.Las titers and environmental variables

| Parameters | Live | Dead | Temperature (°C _{max}) | Relative humidity | Temperature (°C _{min}) | Precipitation | ACP count |
|----------------------------------|-------|---------------------------------|----------------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Live | 1.000 | -0.909-0.0001^{**} | 0.0065 (0.938) ^{ns} | 0.0945 (0.758) ^{ns} | 0.138 (0.651) ^{ns} | -0.153 (0.610) ^{ns} | -0.137 (0.680) ^{ns} |
| Dead | | 1.000 | 0.061 (0.841) ^{ns} | 0.0118 (0.969) ^{ns} | -0.028 (0.925) ^{ns} | 0.085 (0.781) ^{ns} | 0.231 (0.494) ^{ns} |
| Temperature (°C _{max}) | | | 1.000 | 0.439 (0.132) ^{ns} | 0.922 -0.0001^{**} | 0.500 (0.081) ^{ns} | -0.094 (0.782) ^{ns} |
| Relative humidity | | | | 1.000 | 0.594 (0.032) ^{**} | 0.5192 (0.073) ^{ns} | 0.166 (0.625) ^{ns} |
| Temperature (°C _{min}) | | | | | 1.000 | 0.524 (0.065) ^{ns} | -0.076 (0.822) ^{ns} |
| Precipitation | | | | | | 1.000 | 0.500 (0.117) ^{ns} |
| ACP count | | | | | | | 1.000 |

occurring simultaneously with the period of new shoot emergence reported for the region. These sustained levels of C.Las were somehow related to the emergence of new growth, although our statistical analyses failed to establish a concrete correlation. Interestingly, it appears that the months with low nighttime temperatures are the same in which the highest concentrations of live bacteria are detected; conversely, there is an increase in the number of dead bacteria in the warmest months. Moreover, no relationship between bacterial titer and severity of HLB symptoms were observed.

DISCUSSION

The population dynamics of C.Las in Mexican lime were elucidated by monitoring the concentrations of both live and

dead bacteria throughout 2014 and 2015, identifying a similar pattern of cyclical behavior as previously⁸. This variation coincides with reports from Florida, USA and Parana, Brazil and supports the hypothesis that the bacterial distribution changes throughout the year, depending on the host tree phenology and the environmental conditions^{8,9}. This cyclic variation should now be factored into the rationale of HLB management and ACP control strategies, since diagnostic results from sampling both plant material and psyllid vector can be skewed, depending on whether the C.Las population is in decline or on the rise.

The trends in variation of C.Las population in Mexican lime were observed over a period of a full year (January to December, 2014), similar to the trial that has been reported for C.Las in sweet orange⁸. On a speculative note, this annual

variation in the concentration of C.Las could be more closely associated with the phenomenon of Quorum Sensing (QS), in addition to the meteorological variables or ACP populations found in infected orchards. Laboratory tests with C.Las, grown in culture media supplemented with citrus juices, found that the viability of the bacteria showed cyclical growth patterns, with increasing and decreasing phases throughout the experimental period. Cyclic or oscillatory development is a feature of bacterial populations attributable to internal or external fluctuations in the system, mainly related to the presence of nutrients. According to some reports, QS phenomena are related to the physiological and nutritional state of the host. By knowing the distribution of viable and non-viable bacteria in infected trees, it is possible to infer the periods when ACP transmission of C.Las is most probable. In turn, the probability of transmission is also most likely related to the distribution of photoassimilates within the trees throughout the year. Therefore, it is necessary to characterize these physiological aspects of Mexican lime varieties, since the presence of photoassimilates contributes to the carbon sources available for C.Las growth and development.

The finding of higher C.Las concentrations in mature leaves, compared to young leaves, runs contrary to the trend reported by several research groups²⁴. In fact, the presence of major carbohydrate stores in the more photosynthetically active mature leaves would make them a more favorable environment for C.Las and could explain the difference in reported distributions^{11,25}.

This study demonstrated a lack of statistically significant relationships between environmental variables and C.Las concentration. The correlation values between the concentration of live bacteria and rainfall demonstrated an inversely proportional relationship (Pearson $r = -0.153$, $p = 0.616$), indicating that the number of living bacteria is reduced when precipitation increases in the region, albeit not in a statistically significant manner. Alternatively, a similar phenomenon occurred with ACP count and rainfall (Pearson's $r = -0.137$, $p = 0.686$), where the amount of ACP found in the yellow traps decreased with increasing rainfall in the region, although it was also not statistically significant (Table 4). This lack of correlations or presence of weak correlations between atmospheric variables, C.Las concentration and ACP populations has been reported in different citrus-growing areas of the world^{16,26}. While the evidence gathered thus far supports the notion of a dynamic C.Las population within an infected citrus tree, the research community has been unable to decisively associate any one environmental variable to bacterial titer.

These were time points when the average log concentrations of dead bacteria greatly surpassed the average log concentrations of live C.Las. The first instance was October, 2013, when the titer of live bacteria only reached log 4.3 C.Las g⁻¹ of tissue, compared to the log 6.7 C.Las g⁻¹ of tissue recorded for the dead C.Las. This represents a 100 fold increase in dead bacterial cells over living C.Las. The same was seen again in February, 2014, May, 2015 and September, 2015. This distinct proportion of dead to live cells could be associated with the formation of a biofilm. The dead cells quantified during these periods would be those that make up the biofilm and cover their living relatives. As the behavior is seen during warmer months, this could be another defense mechanism used by C.Las to protect itself from high temperatures. There have been recent reports of genes which encode components of bacterial communication systems found via quorum sensing in the C.Las genome^{26,27}, which could be a strategy used by these bacteria to regulate its population.

CONCLUSION

The evaluation of citrus phenology, C.Las concentration, ACP population and environmental conditions provides insights into the cyclical, seasonal variations of both the HLB pathogen and its vector. Depending on the season, bacterial population fluctuates, representing the first report on the seasonal variation of C.Las concentration in Mexican lime. The understanding of the fluctuation of HLB-associated bacteria and its insect vector populations will help in the design of integrative control strategies. This information should be consolidated into existing HLB agronomic management practices and decision-making policies.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by SENASICA 2014-2015 grant to BX-C and RR-M. The authors acknowledge the critical opinion of the present manuscript to the members of the laboratory.

REFERENCES

1. Antunes, L.C.M., R.B.R. Ferreira, M.M.C. Buckner and B.B. Finlay. 2010. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, 156: 2271-2282.
2. Beloti, V.H., G.R. Rugno, M.R. Felipe, A.O. Carmo-Uehara, L.F. Garbim, W.A. Godoy and P.T. Yamamoto. 2013. Population dynamics of *Oiaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) in orchards of Valencia orange, Ponkan mandarin and Murcott Tangor trees. *Florida Entomol.*, 96: 173-179.

3. Bove, J.M., 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.*, 88: 7-37.
4. Oa Graca, J.V. and L. Kornsten, 2004. Citrus Huanglongbing: Review, Present Status and Feature Strategies. In: *Oiseases of Fruits and Vegetables: Volume I OIagnosis and Managemen*, Naqvi, S.A.M.H. (Ed.). Kuwer Academic Publisher, The Netherlands, pp: 229-245.
5. Oavenport, T.L., 2000. Processes influencing floral initiation and bloom: The role of phytohormones in a conceptual flowering model. *HortTechnology*, 10: 733-739.
6. FAO., 2012. *Statistics*. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome, Italy.
7. Folimonova, S.Y., C.J. Robertson, S.M. Garnsey, S. Gowda and W.O. Dawson, 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology*, 99: 1346-1354.
8. Folimonova, S.Y. and O.S. Achor, 2010. Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology*, 100: 949-958.
9. Fraser, L.R. and O. Singh, 1966. Greening virus, a threat to citrus industry. *Indian Hortic.*, 10: 21-22.
10. Gottwald, T.R., J.V. da Graca and R.B. Bassanezi, 2007. Citrus huanglongbing: The pathogen and its impact. *Plant Health Progr.* 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV
11. Hu, H., A. Roy and R.H. Bransky, 2014. Live population dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterial agent associated with citrus huanglongbing, in citrus and non-citrus hosts. *Plant Ois.*, 98: 876-884.
12. Irey, M.S., T. Gast, J. Cote, P. Gadea, O. Santiago, L. Briefman and J.H. Graham, 2011. Seasonal variability in HLB testing data in plant and psyllid samples in Florida. *Proceedings of the 2nd International Research Conference on Huanglongbing*, January 10-14, 2011, Orlando, FL., pp: 72.
13. Jagoueix, S., M.J. Bove and M. Garnier, 1996. PCR detection of the two *Candidatus liberobacter* species associated with greening disease of citrus. *Mol. Cell. Probes*, 10: 43-50.
14. Keremane, M.L., C. Ramadugu, A. Castaneda, J.E. Oiaz and E.A. Penaranda et al., 2015. Report of *Candidatus Liberibacter caribbeanus*, a new citrus-and psyllid-associated *Liberibacter* from Colombia, South America. *Proceedings of the APS Annual Meeting*, August 1-5, 2015, Pasadena, CA.
15. Lee, C., J. Kim, S.G. Shin and S. Hwang, 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 123: 273-280.
16. Lopes, S.A., G.F. Frare, E. Bertolini, M. Cambra and N.G. Fernandes et al., 2009. *Liberibacter* associated with citrus Huanglongbing in Brazil: *Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. *Plant Ois.*, 93: 257-262.
17. Parker, J.K., S.R. Wisotsky, E.G. Johnson, F.M. Hijaz, N. Killiny, M.E. Hilf and L. Oe La Fuente, 2014. Viability of *Candidatus Liberibacter asiaticus* prolonged by addition of citrus juice to culture medium. *Phytopathology*, 104: 15-26.
18. Luo, X., A.L. Yen, K.S. Powell, F. Wu and Y. Wang et al., 2015. Feeding behavior of *Oiaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its acquisition of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, on huanglongbing-infected *Citrus reticulata* leaves of several maturity stages. *Florida Entomol.*, 98: 186-192.
19. Manjunath, K.L., S.E. Halbert, C. Ramadugu, S. Webb and R.F. Lee, 2008. Oetection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Oiaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Phytopathology*, 98: 387-396.
20. SAS., 2009. *Statistical Analysis System for Windows*. Version 9, Statistical Analysis System, Cary, NC.
21. Razi, M.F., M.L. Keremane, C. Ramadugu, M. Roose, I.A. Khan and R.F. Lee, 2014. Oetection of citrus huanglongbing-associated *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus and *Oiaphorina citri* in Pakistan, seasonal variability and implications for disease management. *Phytopathology*, 104: 257-268.
22. Robles, G.P., A.H. Sanchez and V.I. Oelgadillo, 2009. Programa nacional para la deteccion del huanglongbing (*Candidatus Liberibacter spp.*) en Maxico. Oireccion General de Sanidad Vegetal, SENASICA-SAGARPA.
23. Sauer, A.V., C.A. Zanutto, P.T.R. Nocchi, M.A. Machado, C.H. Bock and W.M. Nunes, 2015. Seasonal variation in populations of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus trees in Parana state, Brazil. *Plant Ois.*, 99: 1125-1132.
24. Tabachnick, W.J., 2015. *Oiaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) vector competence for the citrus greening pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *J. Econ. Entomol.*, 108: 839-848.
25. Trivedi, P., U.S. Sagaram, J.S. Kim, R.H. Bransky and M.E. Rogers et al., 2009. Quantification of viable *Candidatus Liberibacter asiaticus* in hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA). *Eur. J. Plant Pathol.*, 124: 553-563.
26. Yamamoto, P.T., M.R. Felipe, L.F. Garbin, J.H.C. Coelho, E.C. Martins and A.P.R. Leite, 2006. *Oiaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): Vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. *Proceedings of the Huanglongbing-Greening International Workshop Fundecitrus*, July 16-20, 2006, Araguara, pp: 96.
27. Yan, Q., A. Sreedharan, S. Wei, J. Wang, K. Pelz Stelinski, S. Folimonova and N. Wang, 2013. Global gene expression changes in *Candidatus Liberibacter asiaticus* during the transmission in distinct hosts between plant and insect. *Mol. Plant Pathol.*, 14: 391-404.