



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
SINALOA  
FACULTAD DE AGRICULTURA DEL  
VALLE DEL FUERTE**



**PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*  
[Christm.] Swingle) INFECTADO POR *Candidatus Liberibacter asiaticus***

**IRVING EDÉN MORÁN FLORES**

**TESIS**

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

**LICENCIADO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA CON  
ACENTUACIÓN EN PROTECCIÓN VEGETAL**

Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, Diciembre de 2017

La presente tesis titulada “**Propagación *in vitro* de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swingle) infectado por *Candidatus Liberibacter asiaticus*”, fue realizada por **Irving Edén Morán Flores** bajo la dirección del Comité de Tesis particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:**

LICENCIADO EN INGENIERÍA AGRONÓMICA CON ACENTUACIÓN EN  
PROTECCIÓN VEGETAL

COMITÉ DE TESIS

---

**Dr. Miguel Ángel Apodaca  
Sánchez**

Director de tesis

---

**Dra. Sandra Pérez Álvarez**

Codirector de tesis

---

**Dra. Norma Elena Leyva  
López**

Asesor de tesis

---

**M.C. Ángela Paulina Arce  
Leal**

Asesor de tesis

## **DEDICATORIA**

A mi familia

Con mucho cariño para todos ellos.

A mi madre

Con todo mi amor. Tú me alientas para seguir desarrollándome como profesionalista y como ser humano. Te admiro por ser tan fuerte e inteligente.

A mi padre

Con mucho cariño, gracias por tu apoyo y por tu amistad, es tiempo de crecer y materializar lo que nuestra mente es capaz de crear. Admiro tu fortaleza.

A mi tío Blas

Con mucho cariño, mi segundo padre. Tú me enseñaste a usar mi mente para ver el mundo desde una perspectiva diferente. Admiro tu inteligencia.

A mis abuelos

Con mucho amor dedicado a mi Nana, mi segunda madre; a mi Tata por ser un ejemplo como ser humano, y a mis abuelitos paternos quienes ya están en el cielo.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó gracias a la contribución de un colectivo de personas que me asesoraron y me asistieron:

A mis padres que me motivan y me han brindado su apoyo a lo largo de mi vida, aun en las circunstancias más difíciles. Gracias por su amor y por sus consejos.

A mis asesores: Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez, Dra. Sandra Pérez Álvarez, Dra. Norma Elena Leyva López y M.C. Ángela Paulina Arce Leal, por brindarme la oportunidad de formar parte del equipo y realizar el presente trabajo.

Al profesor Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez, por su colaboración en la realización de la presente tesis, gracias por sus consejos y enseñanzas a lo largo de mi preparación profesional.

A la Dra. Sandra Pérez Álvarez, quien con sus conocimientos y experiencia ha contribuido a mi formación profesional, gracias por sus enseñanzas, regaños, pero sobre todo, gracias por su ayuda.

A la Dra. Norma Elena Leyva López, por su apoyo, colaboración y la atención brindada durante el desarrollo del proyecto de tesis, gracias por recibirme en el equipo, por sus consejos y por todas sus enseñanzas.

A la M.C. Ángela Paulina Arce Leal, por todas sus enseñanzas en el laboratorio y por su ayuda durante el desarrollo de los análisis moleculares de los experimentos de mi Tesis.

A la Dra. María Elena Santos Cervantes, por sus consejos y su atención. Gracias por su colaboración para la realización del presente trabajo.

A las y los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos; Zeiby, Carlos, Bernardo, Marco, Jael, Bricia, por su atención, por su ayuda y colaboración. Compañeros gracias.

A las y los compañeros del CIIDIR-Unidad Sinaloa quienes me brindaron su amistad; la realización de este proyecto es el resultado de su colaboración y apoyo. Gracias por la excelente atención y dedicación.

## ÍNDICE

Índice de cuadros.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Resumen .....	vi
Abstract.....	viii
I. Introducción .....	1
II. Objetivos.....	5
III. Hipótesis .....	6
IV. Revisión de literatura.....	7
4.1. Cítricos .....	7
4.1.1. Origen y Taxonomía .....	7
4.1.2. Importancia mundial de los cítricos.....	8
4.1.3. Importancia nacional de los cítricos.....	8
4.2. Limón Mexicano.....	9
4.2.1. Morfología.....	9
4.2.2. Producción nacional de limón Mexicano .....	10
4.2.3. Principales enfermedades .....	10
4.3. Huanglongbing.....	13
4.3.1. Generalidades .....	13
4.3.2. Distribución de la enfermedad .....	13
4.3.3. Síntomas.....	14
4.3.3. Diseminación .....	17
4.3.5. Manejo de la enfermedad .....	17
4.3.6. <i>Candidatus Liberibacter</i> spp .....	19
4.4. Cultivo de tejidos vegetales .....	21
4.4.1. Cultivo de tejidos vegetales .....	21
4.4.2. Asepsia.....	22
4.4.3. Medio de cultivo.....	23
4.4.4. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetales.....	25
4.4.5. Morfogénesis y organogénesis .....	27
V. Materiales y métodos .....	29
5.1. Material vegetal. ....	29
5.2. Colecta de muestras para la identificación de CLas.....	30

5.3. Identificación molecular de CLas por PCR en árboles de limón mexicano. ....	31
5.3.1. Extracción de ADN de nervaduras.....	31
5.3.2. Determinación de concentración y calidad del ADN. ....	32
5.3.3. Identificación de CLas por PCR.....	32
5.3.4. Electroforesis del producto de PCR.....	34
5.4. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos de limón mexicano infectado por CLas. ....	34
5.4.1. Medio de cultivo.....	34
5.4.2. Desinfección de segmentos nodales. ....	36
5.4.3. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales.....	39
5.4.4. Multiplicación de brotes <i>in vitro</i> .....	40
5.5. Identificación molecular de CLas por PCR en explantes <i>in vitro</i> de limón mexicano. ....	42
5.6. Análisis estadístico. ....	42
VI. Resultados y Discusiones.....	44
6.1. Identificación molecular de CLas por PCR en árboles de limón mexicano. ....	31
6.1.1. Extracción de ADN de nervaduras.....	44
6.1.2. Identificación de CLas por PCR.....	45
6.2. Desinfección de segmentos nodales. ....	46
6.2.1. Evaluación del hipoclorito de sodio.....	46
6.2.2. Evaluación de fungicidas químicos sintéticos.....	46
6.3. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales.....	53
6.5. Multiplicación de brotes <i>in vitro</i> . ....	54
6.6. Extracción de ADN de tejidos cultivados <i>in vitro</i> . ....	60
6.7. Identificación de CLas por PCR convencional en explantes <i>in vitro</i> . ....	60
VII. Conclusiones.....	63
VIII. Bibliografía.....	64

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1:</b> Cebadores (primers) utilizados en la identificación de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> , en tejidos de limón mexicano.....	39
<b>Cuadro 2.</b> Composición del medio basal Murashige y Skoog con vitaminas MS.	42
<b>Cuadro 3.</b> Comparación de tratamientos a base de hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales provenientes de un árbol de limón mexicano previamente cultivado en un invernadero de investigación.....	43
<b>Cuadro 4.</b> Comparación de tratamientos a base de combinaciones de clorotalonil y procloraz, para desinfectar el material vegetal proveniente de un árbol de limón mexicano en condiciones de traspatio.....	45
<b>Cuadro 5.</b> Comparación entre tratamientos a base de reguladores de crecimiento vegetales en el medio de cultivo, para estimular la formación de brotes.....	48
<b>Cuadro 6.</b> Valores de la concentración y rango de pureza del extracto de ADN, obtenidos mediante CTAB 3%, a partir de material vegetal tomado de un árbol de limón mexicano desarrollado en un invernadero y otro cultivado en traspatio.....	51
<b>Cuadro 7.</b> Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición en hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la primera evaluación semanal.....	54
<b>Cuadro 8.</b> Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición en hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la segunda evaluación semanal.....	54

<b>Cuadro 9.</b> Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición en hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la tercera evaluación semanal.....	55
<b>Cuadro 10.</b> Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición en hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la evaluación final.....	55
<b>Cuadro 11.</b> Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición de la mezcla de clorotalonil + procloraz + hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la primera evaluación semanal.....	57
<b>Cuadro 12.</b> Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición de la mezcla de clorotalonil + procloraz + hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la segunda evaluación semanal.....	57
<b>Cuadro 13.</b> Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición de la mezcla de clorotalonil + procloraz + hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la tercera evaluación semanal.....	58
<b>Cuadro 14.</b> Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición de la mezcla de clorotalonil + procloraz + hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la evaluación final.....	58
<b>Cuadro 15.</b> Valores de la concentración y rango de pureza del extracto de ADN, obtenidos mediante CTAB 3%, a partir de material vegetal tomado de explantes de limón mexicano cultivados <i>in vitro</i> .....	66

## Índice de figuras

- Figura 1.** Principales pises productores de cítricos.....13
- Figura 2.** Limón mexicano (*Citrus aurantifolia*): a) flores; b) hojas y frutos; c) árbol maduro.....15
- Figura 3.** Síntomas de HLB en limón mexicano: a) moteado asimétrico y manchas color verde claro de forma irregular; b) acorchamiento de nervaduras; c) frutos en desarrollo; d) verdeado en árbol maduro.....22
- Figura 4.** Síntomas de HLB en árboles de limón mexicano en el municipio de Guasave, Sinaloa: a) hojas con moteados cloróticos y manchas de forma irregular color verde claro; b) rama donante de segmentos nodales; c) rama de limón mexicano con síntomas..... 37
- Figura 5.** Productos de amplificación de la reacción de la PCR convencional para la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en extractos de ADN de limón mexicano con síntomas de HLB: M: marcador de peso molecular; carril 1: control positivo (CLas); carril 2: control negativo (agua); carril 3: planta en condiciones de invernadero; carril 4: planta en condiciones de traspatio..... 52
- Figura 6.** Explantes *in vitro* de limón mexicano: a) segmento nodal durante la primera semana de la etapa de establecimiento; b) desarrollo de brote a partir de la yema axilar del segmento nodal durante la cuarta semana de la etapa de establecimiento..... 60
- Figura 7.** Explantes de limón mexicano con brotes desarrollados *in vitro* a partir de segmentos nodales: a) brote axilar desarrollado en medio MS (control); b) brote axilar desarrollado en medio MS con 1 mg L<sup>-1</sup> 6-BAP; c) brote axilar desarrollado en medio MS con 0.1 mg L<sup>-1</sup> ANA; d) brote axilar desarrollado en medio MS con 1 mg L<sup>-1</sup> 6-BAP y 0.1 mg L<sup>-1</sup> ANA; e) brotes (axilar y adventicios) desarrollado en medio MS con 1 mg L<sup>-1</sup> 6-BAP y 0.5 mg L<sup>-1</sup> Kinetina..... 61

**Figura 8.** Longitud promedio de los brotes regenerados por efecto de los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetales en el medio de cultivo en explantes de limón mexicano..... 62

**Figura 9.** Número de hojas (promedio) en los brotes regenerados por efecto de los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetales en el medio de cultivo en explantes de limón mexicano..... 63

**Figura 10.** Coeficiente de multiplicación por efecto de los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetales en el medio de cultivo en explantes de limón mexicano..... 64

**Figura 11.** Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en muestras de tejidos de limón mexicano cultivados *in vitro* mediante PCR convencional: M: marcador de peso molecular; carril 1: control positivo (CLAs); carril 2: control negativo (agua); carril 3: explante 4 (cuatro semanas); carril 4: explante 23 (cuatro semanas); carril 5: explante 4 (ocho semanas); carril 6: explante 23 (ocho semanas); carril 7: explante completo 25 (cuatro semanas); carril 8: explante completo 15 (cuatro semanas)..... 68

## Resumen

En México, el huanglongbing (HLB) causa drásticas pérdidas en el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), agente causal del HLB en México, es una  $\alpha$ -proteobacteria no-cultivable, restringida al floema. Diversos estudios tendientes a cultivar a CLas *in vitro* han fracasado debido a la inadaptabilidad de la bacteria. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método para co-cultivar a CLas en explantes *in vitro*, provenientes de árboles de limón infectados con CLas. Hojas y segmentos nodales de una planta de limón (cuatro años), crecida en invernadero, y de una planta de diez años cultivada en un huerto de traspatio, fueron confirmadas como positivas a CLas, mediante PCR. En una primera etapa (E1) de establecimiento, se probó el hipoclorito de sodio (NaClO) 1 y 2%, exposición de 15, 20 y 25 minutos, para desinfectar la superficie de segmentos nodales provenientes de la planta de limón procedente del invernadero. No hubo diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey,  $p= 0.05$ ), si bien la mayor desinfección (60%) se obtuvo con NaClO 2%, 20 minutos. En un segundo ensayo de E1, se compararon mezclas de procloraz (0.078, 0.031 mL<sup>L-1</sup>) + clorotalonil (0.208, 0.078 mL<sup>L-1</sup>), 1-9 hr de exposición, cada una seguido de una inmersión en NaClO 2% por 20 minutos, para desinfectar segmentos nodales obtenidos en la planta de traspatio. No hubo diferencias estadísticas entre tratamientos, aunque el mayor control (30%) se obtuvo con procloraz + clorotalonil 0.031 + 0.078 mL<sup>L-1</sup> 6 horas, seguido de una inmersión en NaClO 2% 20 minutos de exposición. En una segunda etapa (multiplicación) se probaron 4 combinaciones de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) con ácido naftalenacético ANA o kinetina K (incorporadas en el medio MS) para estimular el desarrollo de brotes en explantes limpios sobrevivientes en E1. Hubo un significativo mayor número de brotes promedio en los explantes cultivados en MS+6-BAP (1 mg<sup>L-1</sup>)+K (0.5 mg<sup>L-1</sup>), en los cuales mediante PCR se confirmó a CLas. Los resultados comprobaron la efectividad de las técnicas del cultivo de tejidos *in vitro* vía organogénesis directa para cultivar segmentos nodales de limón mexicano infectados con CLas.

**Palabras clave:** *Citrus aurantifolia*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, cultivo *in vitro*.

## I. INTRODUCCIÓN

El limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] es un importante cultivo que se desarrolla en países con clima subtropical. La importancia de este cultivo se debe a su valor nutricional, principalmente por el alto contenido en vitamina C, ácido cítrico y aceites esenciales; lo cual, a su vez, genera una enorme demanda por parte de industrias de alimentos, medicinas, cosméticos, entre otras (FAO, 2014). Además, el proceso productivo y comercial del limón, deriva en una fuentes de ingresos para miles de familias que dependen de esta actividad para su sustento y una fuente de empleo para millones de jornaleros, que son contratados para llevar a cabo las labores manuales que se requieren durante el proceso de producción (SIAP-SAGARPA, 2016).

México es el principal productor de limón mexicano en el mundo, con más de 171,000 hectáreas plantadas y un volumen de producción superior a 2 millones 200 mil toneladas anuales. Los principales estados productores colindan con el Océano Pacífico: Michoacán, Colima, Oaxaca y Guerrero (SIAP-SAGARPA, 2016).

La superficie dedicada a este cultivo ha registrado un incremento del 23% en los últimos 10 años. De las frutas cosechadas se destinaron aproximadamente el 40% al consumo fresco y el 60% a la industria, como insumo para elaborar variados productos: aceites esenciales, jugos, concentrados, pectina, ácido cítrico, cáscara cristalizada y fermentos, entre otros (SAGARPA, 2016).

Existen diversos factores que influyen en el desarrollo de este cultivo, pero el más importante es la sanidad. En la actualidad, el cultivo de cítricos en México se encuentra amenazado por diversas plagas y enfermedades (SENASICA, 2016). Una de las principales plagas transfronterizas emergentes, que ha surgido en los últimos años en América Latina y el Caribe es el Huanglongbing (HLB). El HLB es una enfermedad originaria de Asia que afecta diversas especies de cítricos; actualmente se considera como la enfermedad más devastadora de los cítricos en el mundo, debido a los daños que causa, a la dificultad de su diagnóstico y a la velocidad de su dispersión (FAO, 2014).

La enfermedad y los costos de su manejo traen consigo pérdidas directas en el rendimiento, volumen y valor de la producción con consecuencias económicas, sociales y ambientales negativas. El impacto económico del HLB está asociado a la importancia de los hospedantes, entre los que se encuentran todas las especies comerciales de cítricos (FAO, 2014).

La reducción del rendimiento en la producción de frutos se produce paulatinamente después de que la planta es infectada por el patógeno, debido a defoliación, deformación y caída de los frutos, con la consiguiente reducción del valor comercial de éstos. El HLB causa inevitablemente la muerte de las plantas en un período máximo de ocho años, una vez infectadas, dependiendo de la edad y condiciones de cultivo (Bové, 2006). Por esta razón y a la falta de métodos eficientes de manejo, se estima que a nivel global la enfermedad ha provocado la pérdida de millones de árboles en países como Sudáfrica, donde se informó hasta el 100 % de pérdidas de la cosecha (FAO, 2014). En México, el HLB se

detectó en 2009 y luego se dispersó rápidamente en 22 estados productores. En algunos estados como en Colima causó una reducción del 58% en la producción (SENASICA, 2016).

Las enfermedades ocasionadas por microorganismos parásitos obligados de las plantas son especialmente problemáticas y provocan un serio impacto económico en las regiones productoras. El agente causal del HLB es una  $\alpha$ -proteobacteria que se ubica en la categoría *Candidatus*, en la que se sitúan las bacterias que no han podido ser cultivadas en medios artificiales, por lo que no cumplen con los postulados de Koch (Bové, 2006).

Debido a la naturaleza fastidiosa de *Candidatus Liberibacter* spp., métodos estándares microbiológicos no pueden ser aplicados directamente para el estudio de la bacteria, por lo tanto, los detalles de la etiología de la enfermedad son limitados. A la fecha, la interacción planta-microorganismo generada por la infección de *Candidatus Liberibacter* spp. no ha sido bien estudiada (Zhao *et al.*, 2015), debido a la incapacidad de mantener condiciones adecuadas para el desarrollo del organismo causal del HLB fuera de su hospedero (Sechler *et al.* 2008; Davis *et al.*, 2008).

En el ámbito de la biotecnología existen métodos que permiten cultivar tejidos u órganos vegetales, bajo determinadas condiciones físicas y químicas en un ambiente controlado (Loyola *et al.*, 2008). El cultivo de tejidos es un método ampliamente utilizado en diferentes especies del género *Citrus* (Samarina *et al.*, 2010). En el presente estudio se aplican técnicas de cultivo de tejidos en limón mexicano para propagar material vegetal infectado con *Candidatus Liberibacter*

asiaticus, a partir de segmentos nodales de plantas maduras; con el propósito de profundizar en el estudio de la biología de la bacteria y, disponer de una fuente constante de material vegetal positivo a HLB bajo condiciones controladas.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Establecer plantas de *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediante el cultivo de tejidos.

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Identificar a *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de limón mexicano donantes de tejidos para cultivo *in vitro*.
- 2) Desarrollar un método adecuado para el cultivo *in vitro* de segmentos nodales de limón mexicano infectados con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

## III. HIPOTESIS

El empleo de las técnicas del cultivo de tejidos vegetales permitirá obtener y mantener plantas de *Citrus aurantifolia* infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus* en condiciones *in vitro*.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Cítricos

#### 4.1.1. Origen y taxonomía

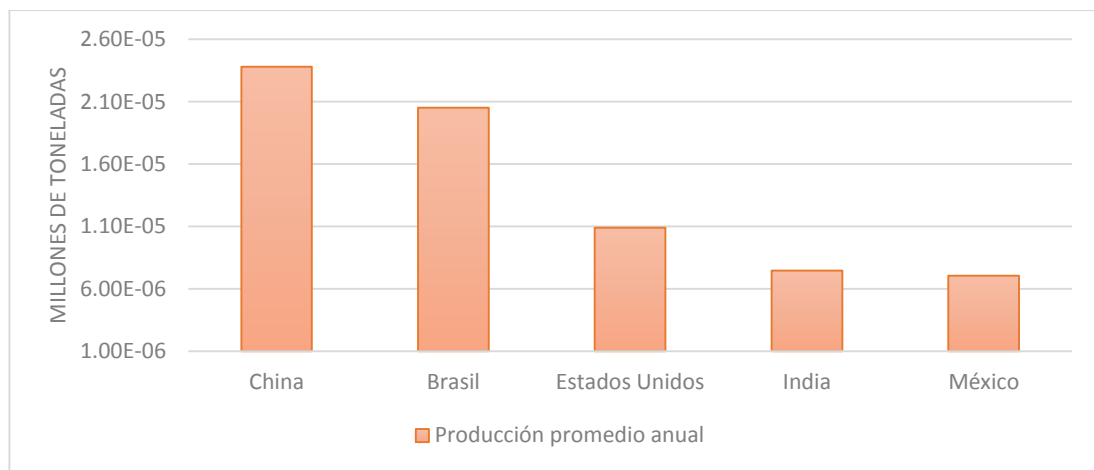
Los cítricos cultivados pertenecen al orden de las Geraniales, familia de las rutáceas y se agrupan bajo los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*. *Citrus*, es considerado el género más importante de esta familia, por su amplia gama de especies de interés para la fruticultura a nivel mundial. El género *Citrus* designa las especies de grandes arbustos o árboles perennes (entre 5 y 15 m), cuyos frutos poseen un alto contenido en vitamina C y ácido cítrico, el cual les proporciona sabor ácido. El fruto característico de las especies del género *Citrus*, es un hesperidio (SIAP-SAGARPA, 2016).

Este género, oriundo del Asia tropical y subtropical está conformado por tres especies principales (*Citrus máxima* Merr., *Citrus medica* L. y *Citrus reticulata* Blanco). En este género se ubican también numerosos híbridos cultivados,

incluyendo las especies más ampliamente comercializadas, como los limones: *Citrus aurantifolia* (Cristm.) Swingle, *Citrus latifolia* Tanaka, *Citrus limon* (L.) Osbeck; la naranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; el pomelo *Citrus paradisi* Macfad y la mandarina *Citrus reticulata* Blanco (FAO, 2016).

#### 4.1.2. Importancia de la citricultura a nivel mundial

La citricultura mundial ha experimentado importantes aumentos en su producción e industrialización en la última década. La producción anual supera las 163 millones de toneladas, lo que representa casi la quinta parte de toda la producción frutícola. Los principales países productores de cítricos son: China, Nigeria, India, Colombia, Brasil, Estados Unidos y México (Figura. 1) (FAO, 2016).



**Figura 1.** Principales países productores de cítricos (FAOSTAT, 2016).

#### 4.1.3. Importancia de la citricultura en México

La citricultura en México es una actividad de gran importancia económica y social, se estima que cerca de 69 mil familias dependen de los ingresos generados por esta actividad. La citricultura nacional se ubica en regiones con clima tropical y

sub-tropical, concentrándose en 28 estados, con una superficie plantada de 530,209 hectáreas y una producción cercana a los 7 millones de toneladas anuales. Los principales estados productores de cítricos son: Veracruz, Tamaulipas, Michoacán, Colima y Oaxaca (SIAP-SAGARPA, 2015).

## **4.2. Limón mexicano**

### **4.2.1. Morfología**

El limón mexicano (*C. aurantifolia*) (también conocido como limón gallego, limón criollo, “mexican lime”, “west indian lime”, o “key lime”), es un árbol o arbusto de 4 a 5 m de altura, con tronco a menudo torcido y ramas con espinas axilares cortas y duras. Las hojas son oblongo-ovales o elíptico-ovales, con una longitud de 2.5 a 9 cm y 1.5 a 5.5 cm de ancho, con su base redondeada, ápice recortado, márgenes ligeramente crenulados y los pecíolos alados. Las flores son blancas de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, fragantes, que se disponen en inflorescencias axilares de 1 a 7 flores. Los frutos son ovales o globosos con un ápice ligeramente deprimido, de color verde oscuro al principio, pasando a verde amarillento o amarillo en la madurez (Fig. 2). Los frutos miden generalmente de 3.5 a 5 cm de diámetro; su piel es delgada y se rompe con facilidad; la pulpa es verdosa, jugosa, muy ácida. Las semillas son pequeñas y ovales (Davies y Albrigo, 1994).



**Figura 2.** Limón mexicano (*Citrus aurantifolia*): a) flores; b) hojas y frutos; c) árbol maduro.

#### **4.2.2. Producción nacional**

El limón mexicano se desarrolla en la mayor parte del territorio nacional, con una superficie plantada de más de 81,000 hectáreas. La producción promedio anual de frutos es superior a un millón de toneladas. Los principales estados productores son; Michoacán (633,425 ton), Colima (166,804 ton), Oaxaca (73,348 ton) y Guerrero (71,443 ton). Esta actividad genera más de 70,000 empleos directos, 250,000 indirectos y la contratación de 28 millones de jornales al año (SIAP-SAGARPA, 2016).

#### **4.2.3. Principales enfermedades**

##### **4.2.3.1. Enfermedades virales y viroidales**

**Psorosis.** Es una enfermedad de avance lento, tarda de 10 a 20 años en expresar los síntomas. Todas las especies de cítricos son susceptibles y está presente en todas las áreas citrícolas de México. El síntoma característico de la enfermedad es el descortezamiento del árbol en forma de escamas, localizadas o generalizado en el tronco o sus ramas. Los árboles se tornan improductivos al poco tiempo de presentarse la enfermedad. El patógeno asociado con la psorosis

es un virus de ARN de cadena simple, las partículas son filamentosas espiraladas y pertenece al género *Spirovirus*. La enfermedad se ha eliminado con éxito utilizando clones nucleares y el micro injerto *in vitro* y termoterapia. Los árboles productores de semilla para porta injertos, deben también de ser indexados porque existen informes de posible transmisión por semilla del virus (Velázquez *et al.*, 2010).

**Exocortis.** Esta enfermedad está distribuida en todas las áreas cítricas de México. Aproximadamente el 50% de los árboles están infectados, pero como la citricultura está basada en el uso del porta injerto tolerante de naranjo agrio, no hay síntomas visibles en los árboles. Los patrones trifoliados, citranges, lima Rangpur, limas dulces y las cidras son susceptibles a la enfermedad. En los árboles susceptibles la enfermedad produce un descortezamiento en el tronco que afecta de forma muy severa la producción, aunque pocas veces mueren. La enfermedad es producida por el viroide CEVd (Bernard *et al.*, 2009).

**Tristeza.** Enfermedad originaria de Asia que se ha diseminado a todo el mundo por medio de plantas o material vegetativo infectado. El agente causal de la enfermedad es el Virus tristeza de los cítricos, miembro de la familia Closteroviridae, es transmitido por varias especies de áfidos y su vector principal es *Toxoptera citricida*. En general, los árboles se mantienen asintomáticos lo que sugiere una prevalencia de variantes poco agresivas (Herrera *et al.*, 2009).

#### **4.2.3.2. Enfermedades bacterianas**

**Cáncer de los cítricos.** Es causado por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* (Hasse) Vauterin con dos patovares (*X. axonopodis* pv. citri y *X. axonopodis* pv. aurantifolii) distribuidos en todo Asia, África, en las islas del océano Pacífico e Índico y en América en Brasil, Argentina y E. U. A. Los síntomas característicos de la enfermedad en las hojas, frutos y tallos son costras o lesiones crateriformes irregulares, mismas que en las hojas pueden rodearse por un halo amarillo, el cual tiende a desaparecer conforme envejece la lesión. *X. axonopodis* es una bacteria en forma de bastón, Gram negativa, con un flagelo polar (Graham *et al.*, 2004).

**Clorosis Variegada.** El agente causal es la bacteria limitada al xilema, Gram negativa *Xylella fastidiosa* (Wells) cuyas células tienen triple pared celular corrugada y pueden ser aisladas en medios especializados. Los síntomas iniciales son pequeños puntos cloróticos sobre el haz de la hoja, mientras que por el envés se desarrollan pústulas gomosas; posteriormente las manchas amarillas forman un variegado clorótico, las hojas nuevas son más pequeñas y tienden a curvarse hacia arriba. El tamaño de los frutos se reduce y presentan una maduración precoz; su sabor es muy ácido por lo que, no son aptos para su consumo. El principal síntoma de la enfermedad es una marcada clorosis en las hojas, en los espacios intervenales, con manchas oscuras visibles en el envés y áreas cloróticas en el haz (Hopkins y Purcell, 2002).

**Huanglongbing (HLB).** Huanglongbing la enfermedad más destructiva, causada por una bacteria restringida al floema de los cítricos, tentativamente llamada

*Candidatus Liberibacter* spp. El síntoma primario es la aparición de brotes amarillos en el árbol, de allí el nombre de “Huanglongbing” (enfermedad del dragón amarillo). El amarillamiento general del árbol se debe a la presencia de hojas amarillo pálido, así como hojas con manchas moteadas y de tamaño reducido. Los frutos de los árboles afectados, son pequeños y pobres en jugo (SENASICA, 2016).

### **4.3. Huanglongbing**

#### **4.3.1. Generalidades**

El HLB es una de las más graves enfermedades que han afectado a la citricultura (da Graça, 2008), fue descrita hace más de un siglo al este de Asia y en la actualidad se encuentra presente en más de 40 países afectando a todas las variedades comerciales de cítricos, registrando importantes pérdidas económicas en Asia, África, Medio Oriente y América (Esquivel *et al.*, 2012).

El HLB es ocasionado por la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., que causa inevitablemente la muerte productiva de las plantas, en un período máximo de ocho años; dependiendo de la edad y condiciones de cultivo. En el continente americano, es transmitida por el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* Kuwayama el cual se encuentra distribuido en prácticamente todas las zonas citrícolas de México (SENASICA, 2016).

#### **4.3.2. Distribución de la enfermedad**

El HLB se detectó por primera vez en Asia (China) hace más de un siglo; posteriormente se informó su presencia en India y Sudáfrica; a través de los años

se diseminó a otros países de Asia, tales como Arabia Saudita, Bután, Filipinas, Indonesia, Isla Reunión, Japón, Madagascar, Malasia, Nepal, Pakistán, Sri Lanka, Taiwán y Vietnam, entre otros. En 2004 se detectó en Brasil y en 2005 se consignó en Estados Unidos; actualmente está presente en muchos países de Centro América y del Caribe (CABI, 2006; NAPPO, 2012).

En México la enfermedad se detectó por primera vez en 2009 en árboles de traspatio, en una comunidad costera del municipio de Tizimín, estado de Yucatán. A la fecha se ha registrado su presencia en 22 estados productores entre los cuales se encuentran: Yucatán, Quintana Roo, Nayarit y Jalisco en 2009; Sinaloa, Campeche, Colima y Michoacán en 2010; Chiapas, Hidalgo, Baja California Sur en 2011; Tabasco en 2012; Guerrero, Puebla y Zacatecas en 2013; Oaxaca en 2014; Veracruz, Querétaro, Baja California, San Luis Potosí, Tamaulipas y Nuevo León en 2015, (SENASICA, 2016).

#### **4.3.3. Síntomas**

El HLB es una enfermedad que afecta los tejidos del floema y causa problemas en la translocación de foto asimilados en las plantas infectadas. *Candidatus Liberibacter spp.* se distribuye de manera desigual en el floema de la planta hospedera, en la nervadura central de las hojas, en raíces, en diferentes partes florales y frutos. Hasta la fecha, no se ha encontrado en el endospermo y embriones de semillas procedentes de frutos infectados (Li *et al.*, 2008). Los árboles de cítricos son frecuentemente afectados por otros problemas que ocasionan síntomas similares que pueden confundirse con los del HLB. Los

síntomas en hojas pueden confundirse con deficiencias nutricionales, con daños de insectos u otras enfermedades (SENASICA, 2016).

*Candidatus Liberibacter* spp. tiene la capacidad de obtener su fuente de carbono al metabolizar azúcares (glucosa y fructosa) ocasionando un desbalance metabólico en el hospedero por reducción de nutrientes o por interferencia en la transportación de nutrientes debido a que provoca cambios a nivel ultra estructural en el floema, así como taponamientos en los poros cribosos debido a la acumulación de calosa y diversos foto asimilados, llevándolo a la expresión de la enfermedad (Duan *et al.*, 2009).

En los árboles de limón mexicano, la sintomatología expresa un moteado difuso asimétrico en las hojas maduras, manchas irregulares verdes-claras o amarillas mezcladas con un verde normal sin una clara división entre ellas (por ambos lados de la hoja). Las manchas generalmente no se extienden al otro lado de la vena central, distribución asimétrica que caracteriza a la enfermedad y la distingue de síntomas de deficiencias nutricionales u otras enfermedades. Se observa el aclaramiento y, en algunos casos, el engrosamiento de las nervaduras de las hojas con un aspecto corchoso (Figura.- 3). Las hojas jóvenes afectadas permanecen de tamaño pequeño, presentan síntomas parecidos a deficiencias de minerales como zinc, hierro, manganeso, calcio, azufre, boro y magnesio (Maschio, 2011).

Las plantas muestran, en pocos años después de ocurrida la infección, una considerable defoliación y muerte apical, generalizándose también el moteado y el amarillamiento (SENASICA, 2016). Se desarrollan brotes múltiples con hojas

pequeñas, pálidas y moteadas creciendo en posición erecta. Durante la infección se muestran fuertes floraciones con un pobre cuajado de frutos; se presenta la caída prematura de frutos y los que se mantienen en el árbol son pequeños y asimétricos (Fig. 3); toman la coloración normal sólo en la parte expuesta al sol, mientras que la otra parte toma una coloración verde-olivo intenso (Gottwald *et al.*, 2009).

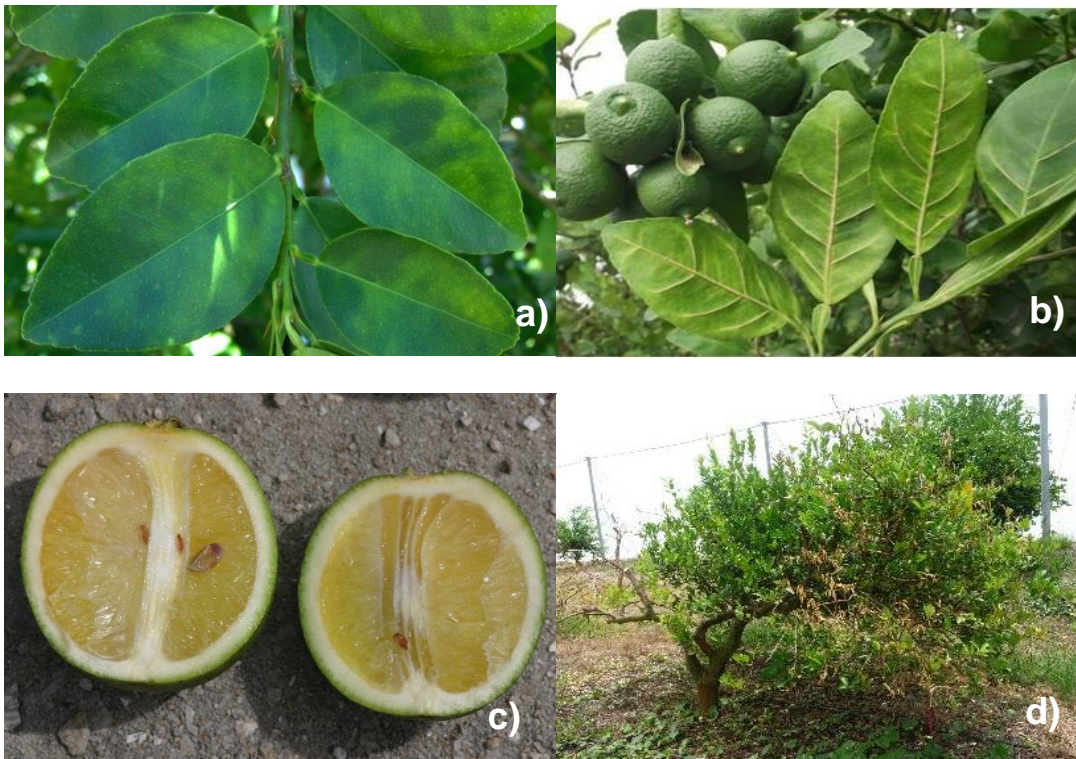
Los frutos de cítricos dulces infectados con HLB presentan desarrollo anormal, son pequeños y con lados irregulares de pobre coloración. Estos poseen una baja cantidad de jugo, además de poca concentración de sólidos solubles y azúcares, por lo que son muy ácidos y no pueden utilizarse en la industria por su sabor amargo-salado desagradable. Las semillas son pequeñas, generalmente atrofiadas (muy pocas logran buen desarrollo), con una coloración oscura y dispareja, a menudo con manchas. El sistema radicular se encuentra poco desarrollado y con poca cantidad de pelos absorbentes (SENASICA, 2016).

#### **4.3.4. Diseminación**

El HLB puede ser transmitido por el injerto de material vegetal infectado con *Candidatus Liberibacter* spp., pero la principal forma de diseminación de este patógeno es a través de dos vectores: *Diaphorina citri* para las variantes asiática (CLas) y americana (CLam); *Trioza erythrae* Del Guercio para la africana (CLaf). Ambos insectos pertenecen al Orden Hemiptera, Familia Psyllidae (Bové, 2006). En México se encuentra presente el psílido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri*, y está relacionado con la transmisión de la especie *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Adultos y ninfas del tercer al quinto instar de *D. citri*, pueden adquirir a

la bacteria al alimentarse de una planta infectada con esta enfermedad (da Graça, 2008).

El psílido asiático de los cítricos requiere un periodo relativamente prolongado de tiempo alimentándose de una planta infectada para adquirir a CLas, sin embargo una exposición prolongada a una fuente de alimento infectada, incrementa sus probabilidades de adquirir a la bacteria hasta en un 39%. Las ninfas que emergen de las oviposiciones de *D. citri* en árboles infectados con CLas, pueden adquirir en un 100% de su población a CLas, al alimentarse durante varias semanas de una planta infectada (Pelz *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Síntomas de HLB en limón mexicano: a) moteado asimétrico y manchas color verde claro de forma irregular; b) acorchamiento de nervaduras; c) frutos en desarrollo; d) verdeado en árbol maduro.

#### **4.3.5. Manejo de la enfermedad**

Actualmente no existe cura para los árboles infectados con HLB y el manejo de la enfermedad se basa en métodos preventivos: utilización de plantas certificadas, monitoreo de las poblaciones de psílidos y aplicaciones de insecticidas para el manejo del vector. Los árboles infectados con HLB son erradicados para evitar que se conviertan en fuentes de inóculo diseminando la enfermedad a plantas y huertas aledañas. En las huertas localizadas dentro de los focos de HLB, o las cercanas al mismo, se deben realizar aplicaciones de insecticidas sistémicos y de contacto para el control de *D. citri* como vector. Esta actividad solamente será efectiva si se acompaña de la detección y eliminación oportuna de plantas con síntomas (SENASICA, 2010), además de realizar diferentes actividades para el manejo del mismo, teniendo presente que solo a través de todas ellas se puede manejar un brote de esta enfermedad.

##### **4.3.5.1. Control biológico de *D. citri***

Se ha informado la existencia de dos especies de parasitoides de *Diaphorina citri* en Asia: *Tamarixia radiata* (Waterston) (Hymenoptera: Eulophidae) y *Diaphorencyrtus aligarhensis* (Hymenoptera: Encyrtidae). Además, en México se han observado depredadores de *D. citri* como *Chilocorus cacti*, *Harmonia axyridis*, entre otras especies de la familia Coccinellidae. *Chrysoperla comanche* (Banks), *Chrysoperla rufilabris* (Burmeister), *Chrysoperla carnea* s. lat., *Ceraeochrysa valida* (Banks), entre otras especies de la familia Chrysopidae (Cortez *et al.*, 2016).

#### **4.3.5.2. Control químico para *D. citri***

El control químico del psílido asiático de los cítricos está basado en la aplicación de diversos insecticidas sintéticos (Rogers *et al.*, 2011) las cuales han sido eficientes hasta un 90% (INIFAP, 2010). Sin embargo, la resistencia a insecticidas se ha desarrollado en poblaciones de campo de *D. citri* (Tiwari *et al.*, 2011), por lo cual, es recomendable la implementación de un programa de aplicación de insecticidas para el manejo del psílido asiático de los cítricos (INIFAP, 2010) que consiste en monitorear las poblaciones de psíidos y realizar diversas aplicaciones de insecticidas con diferente modo de acción. Es importante que los grupos de insecticidas propuestos estén basados en el manejo de grupos toxicológicos de acuerdo al modo de acción, en diferentes etapas de aplicación de acuerdo al desarrollo del cultivo, para evitar la selección de resistencia del insecto (IRAC, 2016).

Para el caso de plagas cuarentenarias, como el HLB de los cítricos, las campañas oficiales de monitoreo tienen como objetivo detectar oportunamente la aparición de brotes en las zonas citrícolas y urbanas (traspacios) del país, así como el control de los brotes detectados. Para ello, se realiza la búsqueda de síntomas similares a los ocasionados por el HLB, así como la toma de muestras vegetales y de psíidos para su diagnóstico en la Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal y otros laboratorios aprobados por la DGSV, para en caso de una detección positiva implementar las actividades de confinamiento, control y/o supresión (SENASICA, 2016).

#### **4.3.6. *Candidatus Liberibacter* spp**

El agente causal del HLB es una  $\alpha$ -proteobacteria gram negativa que pertenece a la familia Rhizobiaceae y se ubica en la categoría *Candidatus*, categoría corresponde a bacterias que no han cumplido con los cuatro postulados de Koch debido a que no han podido ser cultivadas en medios artificiales. Actualmente se han identificado tres especies de la bacteria: *Ca. Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. Liberibacter americanus* (CLam) y *Ca. Liberibacter africanus* (CLaf) (Bové, 2006), siendo CLas el agente causal del HLB identificado en México. La distribución de CLas es heterogénea en el floema de la corteza del tallo, nervadura central de las hojas, algunas raíces, en partes florales y del fruto (principalmente en el pedúnculo). A la fecha, no se ha encontrado en el endospermo y embriones de semillas procedentes de frutos infectados (Tatineni *et al.*, 2008).

Se han ensayado varios métodos para el control de las bacterias en plantas infectadas, tales como: aplicaciones de antibióticos y otras moléculas (Zhang *et al.*, 2012); así como termoterapia (Hoffman *et al.*, 2013). También se han desarrollado métodos para obtener material vegetal sano a partir de árboles con HLB como el micro injerto *in vitro* de ápices caulinares (MIV) (Juárez *et al.*, 2015; Zamora *et al.*, 2015); esta última técnica resultó la más eficaz para la eliminación de los patógenos sistémicos en cítricos y se utiliza, generalmente, combinada con termoterapia. La exclusión de HLB mediante MIV se confirmó experimentalmente en 1987 en China, y luego se utilizó satisfactoriamente por otros autores en diferentes países (Zhao *et al.*, 2010).

#### **4.3.6.1. Identificación de CLas mediante PCR convencional**

El diagnóstico para identificar a *Candidatus Liberibacter asiaticus* hace empleo de métodos moleculares. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Serrato *et al.*, 2014). Los cebadores o primers son diseñados en base a la secuencia de interés y sintetizados artificialmente, a la secuencia de ADN. Estos oligonucleótidos delimitan la secuencia a ser amplificada (Garbus *et al.*, 2004). La electroforesis permite separar fragmentos de ADN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza (Fierro, 2014).

#### **4.3.6.2. Cultivo *in vitro* de *Candidatus Liberibacter asiaticus***

Se han realizado diversos trabajos con el propósito de establecer las condiciones adecuadas para el cultivo de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en condiciones artificiales. En 2008, Sechler y colaboradores, diseñaron un medio de cultivo con extracto de venas de cítricos, registrando un desarrollo sostenido por hasta cinco transferencias de colonias simples de la bacteria, antes de que disminuyera su viabilidad. Ese mismo año (2008), Davis y colaboradores intentaron aislar a CLas realizando el co-cultivo de la misma en presencia de una actinobacteria presente en los cítricos. Los co-cultivos mantuvieron su viabilidad durante diez transferencias semanales a medio fresco. La inadaptabilidad de CLas a medios

artificiales y condiciones externas a las células de su hospedero, dificultan el estudio y comprensión de su biología. En consecuencia, no existe cura y el manejo regional de la enfermedad (medidas de cuarentena, plantas certificadas, eliminación de fuentes de inoculo y manejo del insecto vector) es la única solución disponible para el control de la misma (SENASICA, 2015).

#### **4.4. Cultivo de tejidos vegetales**

##### **4.4.1. Cultivo de tejidos vegetales**

En la biotecnología, el cultivo de tejidos vegetales constituye un conjunto de técnicas utilizadas para el cultivo aséptico de células, tejidos y órganos (explantes) bajo condiciones *in vitro*. El cultivo de tejidos vegetales se fundamenta en la totipotencia celular; explora las condiciones que promueven la división celular y la regeneración de plantas en base a la información genética que éstas contienen en sus células. Para que las células expresen su potencial intrínseco, es necesario proveerles artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas (Loyola *et al.*, 2008).

##### **4.4.2. Asepsia**

Las condiciones físicas en las que normalmente se incuban los cultivos, propician un ambiente favorable para la proliferación de microorganismos (hongos y bacterias) que pueden destruir los cultivos. Uno de los principales requisitos para un exitoso cultivo de tejidos vegetales, es mantener los cultivos libres de microorganismos contaminadores que se albergan en la superficie de los tejidos

de las plantas (Roca y Mroginsky, 1993). Esta contaminación puede evitarse esterilizando la superficie del material vegetal, antes de establecerlo en el medio de cultivo. Hongos y bacterias sistémicos, o bien que invaden el interior de los tejidos, son difíciles de eliminar, generalmente este material se descarta del cultivo de tejidos (Bhojwani y Dantu, 2013).

La esterilización es el proceso mediante el cual un material, lugar o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora. En la terminología médica y de quienes trabajan con cultivo de tejidos vegetales, utilizan la palabra aséptico como sinónimo de estéril. La desinfección se limita a utilizar métodos químicos para la eliminación de microorganismos, mientras que la esterilización hace uso de métodos físicos para llevar a cabo el mismo propósito. La solución de hipoclorito de sodio (NaClO) en concentraciones del 1% al 3%, es una de las preparaciones más útiles como germicida y agente oxidante, ya que sirve para la esterilización de casi cualquier tipo de superficie, siempre y cuando no ocasione lesiones y/o daños en el tejido. El NaClO se ha utilizado ampliamente como esterilizante superficial de tejidos de las plantas debido a su amplio rango de efectividad y la facilidad con la que se enjuaga para eliminar residuos oxidantes indeseables (Roca y Mroginski, 1993).

La adición de agentes tenso activos junto con el desinfectante es una práctica recomendada. Entre los más usados figuran Tween-20 (0,01–0.1%). El lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfección. La inmersión de los explantes en soluciones conteniendo sustancias antibióticas y /o antimicóticas puede ser de utilidad, pero deben ser

utilizados en casos excepcionales. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias (Mroginski *et al.*, 2004).

#### **4.4.3. Medio de cultivo**

En el cultivo de tejidos vegetales, se requiere de un medio en el cual, se debe proveer al explante los elementos necesarios para lograr su crecimiento y óptimo desarrollo (Loyola *et al.*, 2008). Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos, requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos (Mroginski *et al.*, 2004). Es importante elegir el medio apropiado para el propósito del cultivo; el medio más utilizado para el cultivo de tejidos vegetales es el propuesto en 1962 por Murashige y Skoog (Loyola *et al.*, 2008). Hay que considerar que, existen innumerables formulaciones de medios, pero cada uno de ellos debe suministrar (Roca y Mroginski, 1993; Mroginski *et al.*, 2004):

- **Carbono.** Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos. Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono en el medio. La sacarosa es el azúcar más utilizado.
- **Minerales.** El medio debe proveer cualitativamente los mismos nutrientes esenciales que requiere una planta completa (macronutrientes y micronutrientes).

- **Vitaminas.** Los medios de cultivo contienen comúnmente algunas vitaminas. De todas las que se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos.
- **Agente gelificante.** Se adiciona al medio para proveer, en medio sólidos, mayor soporte al explante. El agar (0.6 y 1.0%) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse agar gel (0.4-0.6%), transfer gel (2.0-2.6%), phyta gel (0.25- 0.4%), agarosa (0.8-0.9%) y gelrite (0.1-0.2%).
- **Reguladores de crecimiento vegetales.** En algunos cultivos es necesario agregar reguladores de crecimiento al medio, para estimular respuestas morfo génicas en los cultivos, algunos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA) y/o citocininas (6-BAP, BA, Kinetina, ZEA, 2iP, Thidiazurón). En algunos casos giberelinas (en especial AG<sub>3</sub>). Son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemos o para la elongación de brotes.
- **Otros compuestos.** Se pueden utilizar antibióticos para controlar patógenos. Además de la glicina, otros aminoácidos como la L-tirosina, asparagina y cisteína, son incorporados como una fuente inmediata de nitrógeno. El carbón activado (0.1 a 5%) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos. También son frecuentemente utilizados ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico, así como L-glutamina y caseína hidrolizada. Aún hoy se siguen utilizando ciertos componentes de

composición química no bien definida como agua de coco (5 a 15%), jugo de tomate y puré de banana.

#### **4.4.4. Efecto de los reguladores de crecimiento vegetales**

Los reguladores de crecimiento vegetales son mensajeros químicos que, actuando en muy bajas concentraciones regulan los mecanismos para el desarrollo y crecimiento de los órganos vegetales, estimulando o inhibiendo la división y la diferenciación celular. Estos incluyen compuestos que, pueden ser sintetizados de manera artificial, así como las fitohormonas que se producen de manera natural en el interior de las plantas (Neumann *et al.*, 2009).

Aunque, los explantes contienen ciertos niveles de fitohormonas endógenas (reguladores de crecimiento sintetizados naturalmente), en ocasiones es necesario suplementarlos de manera exógena para provocar una respuesta por parte del explante. La naturaleza de los reguladores utilizados para suplementar el medio varía de acuerdo a la variedad de la planta, la naturaleza del tejido y a la etapa del cultivo (inducción a la formación de callos, embriogénesis somática, diferenciación de raíces, brotes o multiplicación) (Bhojwani y Dantu, 2013).

Dos de los más importantes reguladores de crecimiento utilizados para controlar organogénesis y embriogénesis son los grupos de las citoquininas y las auxinas, mismas que estimulan la diferenciación celular en el cultivo. Una señal mayor de citoquininas promueve la formación de brotes (Al-Barhany, 2002). Las auxinas están involucradas en el desarrollo de muchos procesos en las plantas,

incluyendo la elongación de vástagos y entrenudos, tropismos, dominancia apical, abscisión y enraizamiento. En el cultivo de tejidos, las auxinas son utilizadas para inducir la división celular, diferenciación celular, embriogénica y organogénica. Generalmente, bajas concentraciones de auxinas favorecen la iniciación del enraizamiento, mientras que, en altas concentraciones, inducen a la formación de callos (Bhojwani y Dantu, 2013).

En la naturaleza, las citoquininas están involucradas en la división celular, modificación de la dominancia apical y la diferenciación de brotes. La incorporación de estos compuestos en el medio de cultivo principalmente desencadena la división celular, para inducir la diferenciación de brotes adventicios de callos y órganos, y para la proliferación de brotes adventicios liberándolos de la dominancia apical de las yemas axilares (Bhojwani y Dantu, 2013). El efecto de los reguladores de crecimiento varía, la respuesta en la planta es particular incluso entre variedades e híbridos (Pérez y Ochoa, 1997).

#### **4.4.5. Morfogénesis y organogénesis**

La morfogénesis es la regeneración tejido celular vegetal, para dar lugar a una nueva planta mediante embriogénesis somática u organogénesis. Ambas vías (embriogénesis y organogénesis) involucran un desarrollo organizado, que consiste en que las células se vuelvan competentes mediante su diferenciación y así, estas adquieran la capacidad de responder a señales hormonales. Aplicando señales hormonales exógenas, las células son inducidas a formar órganos específicos. Posteriormente, las células forman órganos y adquieren la capacidad de diferenciación, para cumplir funciones específicas

independientemente de la aplicación de señales hormonales exógenas (Pérez, 2013).

La organogénesis es la formación de raíces o brotes a partir de una sección de tejido vegetal. La vía para regenerar una planta puede ser indirecta, formando callos; células no especializadas, desorganizadas e indiferenciadas; o directa, sin formación de callos, formando células diferenciadas que dan origen a una nueva estructura a partir del tejido original de la planta. En la organogénesis directa existen dos vías que derivan en el desarrollo de estructuras: organogénesis axilar en la cual se forman brotes a partir de yemas preexistentes; u organogénesis adventicia, en la cual hay una inducción de regiones meristemáticas (Pérez, 2013).

#### **4.4.5.1. Organogénesis en cítricos**

La regeneración de cítricos por organogénesis ha sido estudiada de manera muy amplia. Destacan dos principales métodos propuestos para la micro propagación de cítricos (Carimi y De Pasquale, 2015). El primero se basa en los siguientes pasos: 1) establecimiento de cultivos primarios; 2) incubación de explantes en medio para proliferación (en presencia de citoquininas o citoquininas con auxinas) tendiente a inducir la regeneración de brotes; 3) incubación de los brotes regenerados (1-2 cm) en medio de enraizamiento (en presencia de auxinas); 4) incubación de los brotes enraizados en medio de elongación (medio basal sin reguladores de crecimiento vegetales); 5) establecimiento de las plantas en sustrato (Duran *et al.*, 1989). El segundo método se basa en los siguientes pasos: 1) establecimiento de cultivos primarios; 2) incubación de explantes en medio

para proliferación (en presencia de citocininas o citocininas con auxinas) para inducir la regeneración de brotes; 3) incubación de los brotes regenerados (1-2 cm) en medio de elongación (en presencia de citoquininas con ácido giberelico); 4) incubación de los brotes elongados (2.0 cm) en medio de enraizamiento (en presencia de auxinas); 5) establecimiento de las plantas en sustrato (Chakravarty y Goswami, 1999; Paudyal y Haq, 2000).

El cultivo de tejidos es un método ampliamente utilizado en diferentes especies del género *Citrus* (Samarina *et al.*, 2010). Algunas de las áreas donde se ha aplicado incluye: el cultivo y morfogénesis de tejido de cítricos infectado con virus tristeza de los cítricos y virus clorosis variegada de los cítricos (Duran *et al.*, 1988); regeneración de plantas de *Citrus ácida* a partir de callos (Chakravarty y Goswami, 1999); cultivo de protoplastos (Rathore *et al.*, 2007); selección *in vitro* de resistencia a diversos patógenos e investigaciones moleculares (Pérez *et al.*, 2010); propagación y enraizamiento de tres especies de cítricos porta injertos utilizando diferentes reguladores de crecimiento vegetales (Pérez *et al.*, 2012); micro propagación de *Citrus limon* sin semilla y evaluación de la fidelidad genética de las plantas micro propagadas utilizando marcadores RAPD (Goswami *et al.*, 2013).

#### **4.4.5.2. Organogénesis en limón mexicano**

La organogénesis directa mediante el cultivo de tejidos vegetales, se ha utilizado en algunos experimentos en limón mexicano, como: cultivo de tejidos de *Citrus*

*sinensis*, *Citrus medica* y *Citrus aurantifolia* (Duran *et al.*, 1989); regeneración de plantas de *C. aurantifolia* a partir de raíces (Bhat *et al.*, 1992); regeneración de mandarina y limón mexicano por organogénesis directa (Pérez y Ochoa, 1997); estudio del efecto de fitohormonas en la multiplicación y enraizamiento de *C. aurantifolia* (Al- Bahrany, 2002); micro propagaron de *C. aurantifolia* establecido a partir de semillas (Hernández *et al.*, 2013).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

El sitio de estudio se llevó localizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos, del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Unidad Sinaloa, durante el periodo comprendido de agosto del 2015 hasta agosto de 2016.

### 5.1. Material vegetal

Inicialmente, en la primera etapa de la desinfección, se utilizaron 70 muestras procedentes de una planta de limón Mexicano (*C. aurantifolia*) mayor de cuatro años cultivada en condiciones de invernadero, inoculada mediante injerto de yemas infectadas con CLas sobre el patrón de limón volkameriano (*Citrus volkameriana*, Ten. y Pasq). La planta se desarrolló en maceta de 40 litros de capacidad con 20 kg de sustrato (30% peat moss, 30% tierra de río y 40% perlita,

v/v) y se mantuvo en invernadero con luz natural a una temperatura de 23-28°C y humedad relativa de 31-45%.

En diciembre de 2015, en la planta donante, así como en el total de las plantas de limón mexicano en condiciones de invernadero; se presentaron daños en la parte aérea, secando los tejidos desde el ápice y avanzando en dirección descendente; síntomas similares a los ocasionados por *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. (Picos *et al.*, 2014), lo que culminó en la muerte de las plantas. Por lo cual, en enero de 2016, fue necesario encontrar una fuente alterna de material vegetal infectado con CLas.

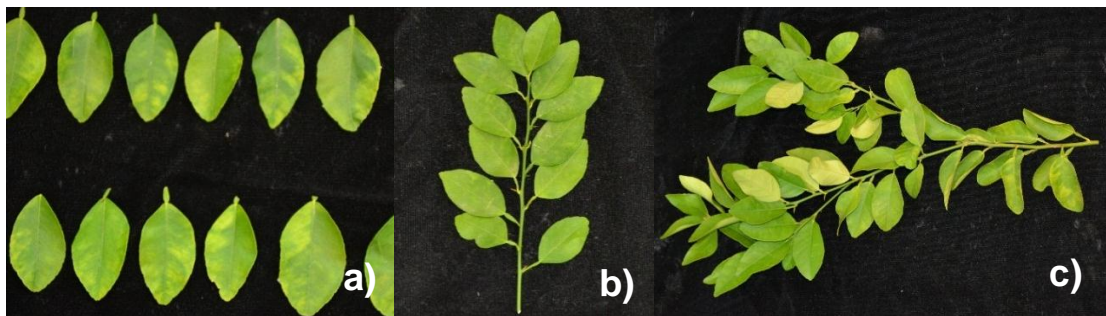
Se utilizaron 90 muestras de *Citrus aurantifolia*, procedentes de una planta con síntomas de HLB, mayor a diez años localizada en el patio de una casa de la comunidad San José de la Brecha, municipio de Guasave (N 25° 20.418', O 108° 26.468'). La planta desarrollada en el suelo de la región, expuesta a la temperatura y condiciones ambientales locales, no había recibido aplicaciones de fertilizantes y careció de un manejo fitosanitario adecuado.

## **5.2. Colecta de muestras para la identificación de CLas**

Se utilizaron las nervaduras de 10 hojas con síntomas de HLB para la identificación molecular de la bacteria. Mientras que, para el cultivo de tejidos vegetales se utilizaron los segmentos nodales de las ramas con síntomas de HLB, de las plantas con CLas (PCR+).

En el primer muestreo (noviembre 2015) se colectaron diez ramas con hojas sintomáticas en un árbol de limón mexicano, cultivado en condiciones de

invernadero. El segundo muestreo se realizó en árboles de limón mexicano en condiciones de traspatio en enero del 2016, se colectaron 10 ramas con hojas sintomáticas. Los síntomas característicos en el material vegetal muestreado, fueron el moteado asimétrico por ambos lados de las hojas y manchas de color verde claro con formas irregulares (Fig. 4).



**Figura 4.** Síntomas de HLB en árboles de limón mexicano desarrollados en el municipio de Guasave, Sinaloa: a) hojas con moteados cloróticos y manchas de forma irregular color verde claro; b) rama donante de segmentos nodales; c) rama de limón mexicano con síntomas.

### **5.3. Identificación molecular de CLas por PCR en árboles de limón mexicano**

#### **5.3.1. Extracción de ADN de nervaduras**

Para la identificación de CLas en las muestras de árboles limón mexicano en condiciones de invernadero y traspatio, se utilizaron hojas con síntomas putativos a HLB. Las nervaduras, separadas de la lámina foliar, se congelaron con nitrógeno líquido (-195.8°C), posteriormente fue liofilizado (LABCONCO, USA) y pulverizado.

El ADN total se obtuvo mediante el método de CTAB (bromuro de cetil-trimetilamonio) al 3% con algunas modificaciones (Zhang *et al.*, 1998). Para la

extracción de cada muestra se utilizó 20 mg de tejido liofilizado. A cada muestra se le adicionó 800  $\mu\text{L}$  del buffer de extracción de ADN con CTAB al 3% (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol) precalentado a 60°C. Posteriormente se incubó a 60°C por 30 minutos, se adicionó a cada muestra 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión siete veces. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante. Después se adicionó 40  $\mu\text{L}$  de enzima RNAsa (20  $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) y se incubó por 20 minutos a 37°C. Se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión varias veces y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se precipitó el ADN con 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol (-20°C) al 100%. Se centrifugó inmediatamente por 10 minutos a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 1,000  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se centrifugó por 4 minutos a 13,000 rpm. Finalmente se dejó secar la pastilla que contiene el ADN y se re suspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril. El ADN obtenido se almacenó a -20°C para su análisis posterior.

### **5.3.2. Determinación de la concentración y calidad del ADN**

Para determinar la concentración de ADN se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), obteniendo la concentración de ADN en  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ . La relación  $A_{260}/A_{280}$  (ADN/proteína) se utilizó para verificar la pureza y calidad del ADN extraído, considerándose como valores de referencia  $A_{260}/A_{280} > 1.8$  (Cuadro 6).

Para determinar la integridad del ADN se realizó la electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio ( $0.2 \mu\text{L mL}^{-1}$ ). Se cargaron  $2 \mu\text{L}$  de la muestra del ADN junto con  $6 \mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril y  $2 \mu\text{L}$  de buffer de carga (colorante naranja G). El gel se corrió a 80 v durante 40 minutos. Las bandas se visualizaron en un trans iluminador de luz ultravioleta y se colocaron en un foto documentador de imágenes para registrar resultados (GelDoc, Biorad, U.S.A.).

### 5.3.3. Identificación de CLas mediante PCR

El estado sanitario de las plantas muestreadas se confirmó molecularmente utilizando la metodología de PCR convencional utilizando los cebadores o iniciadores específicos rplA2/rplJ5 (Cuadro 1), que amplifican un fragmento de 703 pb correspondiente a ADN ribosomal de la región 16s del  $\beta$ -operón de la bacteria (Hocquellet *et al.*, 1999).

**Cuadro 1:** Cebadores (primers) utilizados en la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, en tejidos de limón mexicano.

Cebadores	Secuencia	Referencia
A2	TATTAAAGGTTGACCTTTTCGAGTTT	Hocquellet <i>et al.</i> , 1999
J5	ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA	

Los ensayos de PCR se realizaron en micrtubos (Eppendorf) de  $200 \mu\text{L}$  con un volumen total de reacción de  $25 \mu\text{L}$ , conteniendo  $14.8 \mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril,  $2.5 \mu\text{L}$  de buffer (1x),  $1 \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (2 mM),  $0.5 \mu\text{L}$  de nucleótidos trifosfatados o dNTP's (0.2 mM), para el caso de los primer A2/J5;  $0.2 \mu\text{L}$  (1

unidad) de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Brasil) y 0.5  $\mu\text{L}$  (0.2 pmol) de cada primer (A2/J5). Se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  (20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) de ADN genómico total en cada una de las reacciones realizadas. Las mezclas se incubaron en un termo ciclador automático (Veriti™, Applied Biosystem). Se utilizaron las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C por dos minutos; 35 ciclos de: desnaturalización de 30 segundos a 94 °C; acoplamiento por 30 segundos a 62 °C y polimerización durante un minuto a 72 °C; con una extensión final a 72 °C por diez minutos.

#### **5.3.4. Electroforesis del producto de PCR**

Para determinar la presencia de CLas en el tejido de los explantes *in vitro* se utilizaron geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.2  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Se cargaron 8  $\mu\text{L}$  de la muestra del producto de PCR, junto con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (colorante naranja G), un control positivo a CLas, un control negativo (Agua bi destilada y buffer con colorante naranja G) y un marcador de peso molecular de 1 kb. Se aplicaron 80 v durante 80 minutos. Finalmente, las bandas se visualizaron en un trans iluminador de luz ultravioleta y se colocaron en un foto documentador de imágenes para registrar resultados (GelDoc, Biorad, U.S.A.).

#### **5.4. Cultivo de tejidos vegetales**

El trabajo consistió de dos fases: **establecimiento** (Etapa 1= E1) y *multiplicación* (Etapa 2 = E2).

En E1 se corrieron dos ensayos, en el que se probaron tratamientos químicos buscando un producto eficaz en la eliminación de contaminantes fúngicos y bacterianos, pero que fuera tolerado por CLas presente en los segmentos nodales. En un primer ensayo de se comparó la eficacia del hipoclorito de sodio, en la desinfección de segmentos nodales de limón mexicano, procedentes de un árbol de 4 años desarrollado en condiciones de invernadero, diagnosticado por PCR como infectado por CLas. En un segunda ensayo, se comparó la eficacia de mezclas de dos fungicidas químicos (procloraz y clorotalonil) en segmentos nodales, de un árbol de limón mexicano de diez años, procedente de un árbol de traspatio, también infectado con CLas.

En la etapa de **multiplicación** (E2), los explantes infectados con CLas, que sobrevivieron y resultaron limpios en E1, se sometieron a tratamientos hormonales, tendientes a obtener un rápido desarrollo *in vitro*.

#### **5.4.1. Medio de cultivo**

Para las etapas de establecimiento y multiplicación del vegetal, se empleó el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962), con vitaminas MS (Cuadro 2), a una concentración de  $4.43 \text{ g L}^{-1}$  (Phytotechnology Laboratories); suplementado con sacarosa ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich) y como agente gelificante se agregaron  $3.0 \text{ g L}^{-1}$  de Gellan Gum Powder (Phytotechnology Laboratories), se añadieron reguladores del crecimiento vegetal de acuerdo a la etapa del cultivo. El medio se distribuyó en volúmenes de 15 mL en tubos de ensaye (150 mm x 25 mm) para la fase de establecimiento y 25 mL en frascos de vidrio (250 ml)

para la fase de multiplicación. Los recipientes con el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave a 15 psi / 121°C, durante 20 minutos.

**Cuadro 2.** Composición del medio basal Murashige y Skoog con vitaminas MS.

<b>Componente</b>	<b>Mg L<sup>-1</sup></b>
Nitrato de amonio	1650
Ácido bórico	6.2
Cloruro de calcio, anhidro	332.2
Cloruro de cobalto•6H <sub>2</sub> O	0.025
Sulfato cúprico•5H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	37.26
Sulfato ferroso •7H <sub>2</sub> O	27.8
Sulfato de magnesio, anhidro	180.7
Sulfato de manganeso•H <sub>2</sub> O	16.9
Ácido molibdico (Sodium Salt)• 2H <sub>2</sub> O	0.25
Yoduro de potasio	0.83
Nitrato de potasio	1900
Fosfato monobásico de potasio	170
Sulfato de zinc•7H <sub>2</sub> O	8.6
Glicina (base libre)	2
Mio-inositol	100
Ácido nicotínico (ácido libre)	0.5

Piridoxina•HCl	0.5
Tiamina•HCl	0.1

#### 5.4.2. Desinfección de segmentos nodales de limón mexicano

##### 5.4.2.1. Evaluación del hipoclorito de sodio

Los segmentos nodales se lavaron con agua corriente y detergente Tween 20 (0.1%); después se enjuagaron tres veces con agua destilada. Se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) 1% y 2%, como agente desinfectante con detergente Tween 20 (0.1%) como agente tenso activo, comparando tres periodos de exposición: 15, 20 y 25 minutos (Cuadro 3). Una vez transcurrido el tiempo, el material vegetal se enjuagó tres veces con agua destilada estéril y se secó sobre papel filtro, para proceder a su establecimiento *in vitro*.

En este bioensayo, se utilizó un diseño completamente al azar, en el cual se probaron seis tratamientos y un testigo (Cuadro 3) con diez repeticiones; cada explante representó una repetición.

**Cuadro 3.** Comparación de tratamientos a base de hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales provenientes de un árbol de limón mexicano previamente cultivado en un invernadero de investigación.

Concentración de NaClO (%)	Tiempo de inmersión (minutos)
-------------------------------	----------------------------------

Testigo	0
1	15
1	20
1	25
2	15
2	20
2	25

Concentración de ingrediente activo. Cloralex (5±1 % NaClO).

#### **5.4.2.2. Evaluación de fungicidas químicos sintéticos**

El árbol de limón mexicano, del cual se obtuvo material para el ensayo con hipoclorito, se secó y murió aparentemente por una infección fúngica. Ante la falta de otro árbol de limón mexicano cultivado en invernadero, que permitiera obtener nuevos segmentos nodales limpios, se optó por utilizar como fuente donadora a otro árbol, pero en este caso proveniente de un huerto de traspatio, para realizar un segundo bioensayo. Cabe aclarar que en el bioensayo anterior, la ineficacia del hipoclorito de sodio en la desinfección de segmentos nodales, provocó que al final del ensayo no se contara con material suficiente para poder continuar con la siguiente fase del trabajo (multiplicación). Por lo tanto, se realizó un nuevo ensayo, en el que se probaron otros tratamientos desinfectantes a base de clorotalonil+ procloraz (Cuadro 4).

Los segmentos nodales provenientes de un árbol desarrollado en condiciones de traspatio, se lavaron previamente con agua corriente y detergente Tween 20 (0.1%), después se enjuagaron tres veces con agua destilada. En la campana de flujo laminar, los segmentos se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2

% con detergente Tween 20 (0.1%) durante 20 minutos, después se sometieron a diferentes tratamientos a base de clorotalonil y procloraz, cada uno a dos concentraciones y ocho periodos de exposición (Cuadro. 4). El tratamiento testigo, consistió en enjuagar los segmentos nodales con agua destilada estéril y secarlos sobre papel filtro para proceder a su establecimiento *in vitro*. Una vez transcurrido el tiempo determinado para cada tratamiento con clorotalonil y procloraz, los segmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. De nuevo, los segmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se recortaron los extremos y se secaron sobre papel filtro para proceder a su establecimiento *in vitro*.

En la evaluación del efecto de fungicidas sintéticos químicos, sobre la desinfección, se utilizó un diseño completamente al azar, el cual se compone por ocho tratamientos y un testigo con diez repeticiones, cada explante representó una repetición.

**Cuadro 4.** Comparación de tratamientos a base de combinaciones de clorotalonil y procloraz, para desinfectar el material vegetal proveniente de un árbol de limón mexicano en condiciones de traspatio.

<b>Fungicidas</b>	<b>Concentración i.a. (mL L<sup>-1</sup>)<sup>a</sup></b>	<b>Tiempo de inmersión (h)</b>
Agua estéril	-	-
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	2
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	3
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	4
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	5
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	6

Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	7
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	8
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	9

<sup>a</sup> Concentración del ingrediente activo (i.a.). Sportak® 45CE (31.25 % procloraz). ECO® 720 (52.0% Clorotalonil).

En todos los tratamientos, excepto el testigo absoluto, el material tratado con la mezcla clorotalonil+procloraz se sumergió en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % con detergente Tween 20 (0.1%) durante 20 minutos.

En ambos experimentos se midió la contaminación, de acuerdo al porcentaje de muestras con signos de infección por agentes microbianos, y se comparó el comportamiento entre los tratamientos durante cuatro evaluaciones semanales, a partir del establecimiento.

#### **5.4.3. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de limón mexicano**

El cultivo de tejidos vegetales inicia con el establecimiento del material vegetal en condiciones *in vitro*; para ello, las actividades correspondientes a la presente etapa del ensayo, se realizaron en la campana de flujo laminar, con el propósito de proporcionar las condiciones de asepsia adecuadas para realizar el cultivo. Las muestras provenientes, tanto de plantas de *C. aurantifolia* en condiciones de invernadero, como en huerto de traspatio, se disecaron en segmentos nodales con una yema axilar, con una longitud máxima de 2.0 cm y un diámetro aproximado de 0.5 cm. Después de aplicarle al material vegetal los tratamientos de desinfección descritos en el apartado anterior, los segmentos se secaron sobre papel filtro, se cortaron ambos extremos (aproximadamente 2.0 mm) utilizando bisturí y pinzas estériles, debido a que generalmente en estas zonas se observó oxidación del tejido. Los segmentos se establecieron sobre 15 mL de medio MS (con vitaminas MS) (Murashige y Skoog, 1962) (Cuadro 2), dentro de

tubos de ensaye de vidrio (25 mm x 150 mm) (Figura 6), un segmento por tubo de ensaye; los tapones de los tubos se fabricaron con algodón y gasa.

Los tubos con explantes se colocaron en cámara de crecimiento a una temperatura de 27°C, humedad relativa 60% y un fotoperiodo de 16 h luz durante 30 días. Cada semana se documentó por escrito y mediante imágenes fotográficas, la evolución de los explantes.

Una vez concluida la etapa de establecimiento (E1), la eficacia de los tratamientos en la desinfección se estimó o cuantificó considerando las siguientes variables:

- a) **Desinfección (%)**. Se determinó según el número de explantes contaminados del total que se ensayaron.
- b) **Supervivencia (%)**. Se calculó considerando la proporción de explantes vivos y sin contaminación.
- c) **Desarrollo de brotes (%)**. Se estimó según por el número de explantes con brotes axilares desarrollados.

#### **5.4.4. Multiplicación de brotes *in vitro***

Después de cumplir con el tiempo de incubación especificado para la etapa de establecimiento, se seleccionaron los explantes libres de contaminación, tanto los que desarrollaron brotes axilares durante su incubación en la etapa de establecimiento, así como los segmentos que no desarrollaron brotes. Los brotes se seccionaron eliminando la dominancia apical; en todos los explantes se diseccionaron restos de tejidos como callosidades, así como las hojas más

desarrolladas y tejidos con señales de daño por oxidación; luego se transfirieron a frascos de vidrio con nuevo medio de cultivo (MS con vitaminas), suplementado con reguladores de crecimiento, según los respectivos tratamientos. Los explantes se establecieron en 25 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas MS (Cuadro 2) contenidos en frascos de vidrio (250 mL).

Con el propósito de incrementar el número de brotes regenerados a partir de segmentos nodales, se evaluó el efecto de reguladores de crecimiento vegetales como citoquininas 6-BAP (= 6-bencilaminopurina) (Phytotechnology Laboratories) y K (= Kinetina) (Phytotechnology Laboratories); la auxina ANA (= ácido 1-naftalenacético) (Sigma-Aldrich), agregados previamente al medio de cultivo para estimular la formación de nuevos brotes (organogénesis directa) en los explantes (segmentos nodales) provenientes de árboles de limón mexicano infectados con CLas. Las actividades correspondientes al presente ensayo se realizaron en campanas de flujo laminar con el propósito de proporcionar las condiciones de asepsia adecuadas para realizar el cultivo de tejidos vegetales.

**Cuadro 5.** Comparación entre tratamientos a base de reguladores de crecimiento vegetales incorporados en el medio de cultivo MS vitaminado, para estimular la formación de brotes.

<b>Reguladores de crecimiento vegetales<sup>a</sup></b>	<b>Concentración (mg L<sup>-1</sup>)</b>
-	-
ANA	0.01
6-BAP	0.1

---

6-BAP + ANA	0.1 + 0.01
6-BAP + K	0.1 + 0.5

---

<sup>a</sup> Reguladores de crecimiento vegetales. 6-BAP (= 6-bencilaminopurina); ANA (= ácido 1-naftalenacetico); K (= Kinetina).

Los frascos se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 27°C, humedad relativa 50% y un fotoperiodo de 16 h luz, durante cuatro semanas; posteriormente se realizó un sub cultivo, durante el cual, los explantes se cambiaron a nuevo medio de cultivo (MS vitaminado) suplementado con reguladores de crecimiento, según los respectivos tratamientos, donde se incubaron durante cuatro semanas adicionales. Cada semana se efectuaron evaluaciones con registro escrito de las variables evaluadas y se tomaron fotografías de la evolución de los brotes.

Para la interpretación de los datos en la etapa de multiplicación se utilizó un diseño completamente al azar en el cuál se probaron cuatro tratamientos y un testigo con diez repeticiones, cada explante representó una repetición.

Después de cuatro semanas en incubación, las variables evaluadas fueron:

- a) **Coefficiente de multiplicación (%).** Se determinó calculando, en promedio, la cantidad de brotes nuevos por explante en relación al número inicial.
- b) **Longitud de brotes (cm).** Se calculó la longitud media de los brotes desarrollados.
- c) **Número de hojas por brote.** Se cuantificó el promedio del número de hojas presentes en los brotes desarrollados.

### **5.5. Identificación molecular de CLas por PCR en explantes *in vitro* de limón mexicano**

Para la identificación de CLas en explantes de limón mexicano en condiciones *in vitro*, se utilizaron tejidos (brotes), así como explantes completos seleccionados al azar, después de cuatro y ocho semanas de cultivo en el medio de multiplicación. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido (-195.8°C) para posteriormente someterse a un proceso para liofilizar el tejido y proceder a pulverizarlo. El procedimiento para la extracción del ADN total y para la identificación molecular de CLas fue idéntico al descrito previamente en el apartado 6.3 (identificación molecular de CLas por PCR en árboles de limón mexicano).

### **5.6 Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos en los experimentos de desinfección y la fase de multiplicación fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y cuando hubo diferencias significativas, se realizó la prueba de Tukey para la comparación de medias con un nivel de confiabilidad de 0.05, utilizando el paquete SAS®.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1. Identificación molecular de CLas por PCR en árboles de limón mexicano**

### 6.1.1. Extracción de ADN de nervaduras

El ADN total extraído presentó bandas sin impurezas, lo cual sugiere que presentó buena calidad al ser evaluado por electroforesis en geles de agarosa. Los valores de concentración de las muestras, estimadas mediante el espectrofotómetro NanoDrop, oscilaron entre los 115 y 280 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  y con una relación 260/280 que varió de 1.91 a 1.92 (Cuadro 6).

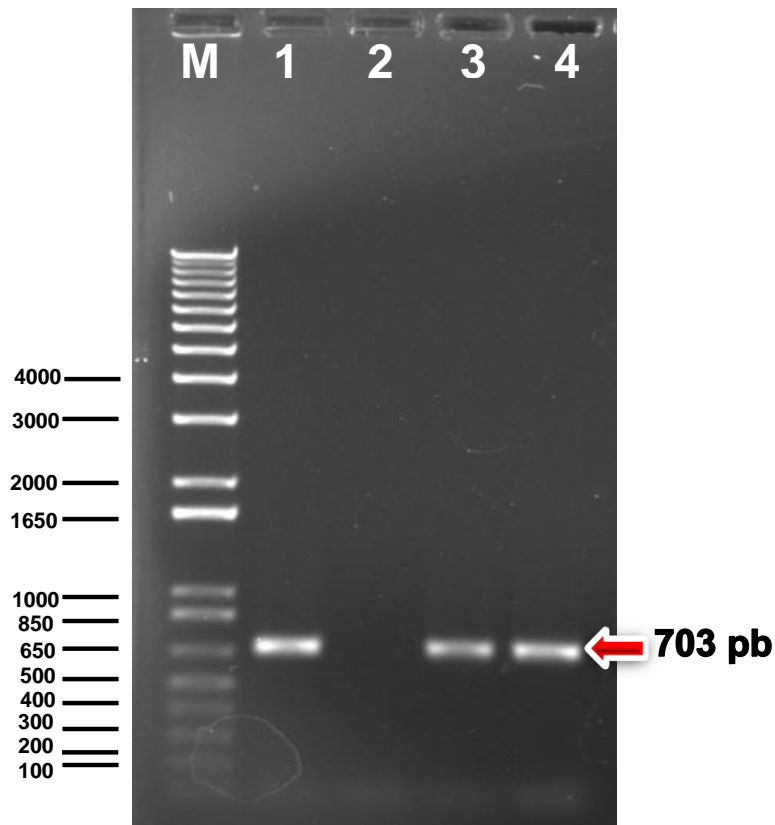
**Cuadro 6.** Valores de la concentración y rango de pureza del extracto de ADN, obtenidos mediante CTAB 3%, a partir de material vegetal tomado de un árbol de limón mexicano desarrollado en un invernadero y otro cultivado en traspatio.

Muestra	Concentración de ADN	Rango de Pureza
	ng $\mu\text{L}^{-1}$	260/280
Invernadero	280.8	1.91
Traspatio	115.6	1.92

En su conjunto, todos estos valores fueron útiles para la realización de los análisis de identificación molecular.

### 6.1.2. Identificación de CLas por PCR

La utilización de los iniciadores A2/J5, resultó en la amplificación de ADN en muestras de árboles de limón mexicano, con síntomas de HLB, colectadas en campo e invernadero (Fig. 5).



**Figura 5.** Productos de amplificación de la reacción de la PCR convencional para la identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón mexicano: M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen Life Technologies); carril 1: control positivo (CLAs); carril 2: control negativo (agua); carril 3: planta desarrollada en condiciones de invernadero; carril 4: planta desarrollada en condiciones de traspatio.

La presencia de bandas con un peso molecular de 703 pb en el gel de agarosa (0.8%), coincidió con lo informado por algunos autores, al igual que con control positivo de CLAs utilizado en este ensayo (Ruangwong y Akarapisan, 2006). El carril uno mostró una banda que corresponde al control positivo de CLAs. El carril dos, corresponde al control negativo. En los carriles tres y cuatro, se observó la presencia de bandas, correspondientes a un árbol desarrollado en condiciones de invernadero y a un árbol desarrollado en condiciones de traspatio, respectivamente, ambos con síntomas asociados con el HLB (Fig. 5). El peso de

estos fragmentos de ADN amplificados coincidió con el esperado para la identificación de CLas, según la metodología utilizada (Hocquellet *et al.*, 1999). Las bandas sugieren la amplificación de fragmentos de ADN ribosomal de la bacteria, esto permite la identificación directa de la especie *Candidatus Liberibacter asiaticus* según lo informado por Hocquellet y colaboradores (1999), así como por Ruangwong y Akarapisan (2006). El resultado de esta técnica confirmó la presencia de CLas en los árboles muestreados, lo que permitió realizar el cultivo de tejidos vegetales.

## **6.2. Desinfección de segmentos nodales de limón mexicano**

### **6.2.1. Evaluación del hipoclorito de sodio**

Se logró la desinfección, de un reducido porcentaje, de segmentos nodales de limón mexicano, provenientes de una planta desarrollada en condiciones de invernadero, utilizando hipoclorito de sodio (Cuadros 7, 8, 9 y 10). Al final de la evaluación (Cuadro 10), ningún tratamiento presentó diferencia significativa con respecto al resto de los tratamientos según la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con la solución desinfectante al 2% con una exposición de 20 minutos. Este tratamiento alcanzó el 60% de supervivencia con 40% de contaminación microbiana sin ocasionar daños en los tejidos, lo que permitió que dos terceras partes de los explantes desinfectados logaran desarrollar brotes a partir de las yemas axilares (Cuadro 10). Se observó que la mayoría de los contaminantes detectados corresponden a bacterias que forman burbujas por debajo de la superficie del medio.

**Cuadro 7.** Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición en hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la primera evaluación semanal.

<b>Concentración (NaClO %)</b>	<b>Tiempo de inmersión (minutos)</b>	<b>Contaminación (%)</b>	<b>Supervivencia (%)</b>	<b>Desarrollo de brotes (%)</b>
testigo	0	0	100	0
1	15	0	100	0
1	20	0	100	0
1	25	0	100	0
2	15	0	100	0
2	20	0	100	0
2	25	0	100	0

**Cuadro 8.** Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición en hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la segunda evaluación semanal.

<b>Concentración (NaClO %)</b>	<b>Tiempo de inmersión (minutos)</b>	<b>Contaminación (%)</b>	<b>Supervivencia (%)</b>	<b>Desarrollo de brotes (%)</b>
Testigo	0		100	0
1	15	10	90	10
1	20	10	90	10
1	25	10	100	20
2	15	50	50	10
2	20	0	100	20
2	25	0	100	0

**Cuadro 9.** Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición en hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la tercera evaluación semanal.

Concentración (NaClO %)	Tiempo		Supervivencia (%)	Desarrollo de brotes (%)
	de inmersión (minutos)	Contaminación (%)		
Testigo	0	100	0	0
1	15	80	20	20
1	20	40	60	20
1	25	50	50	20
2	15	80	20	20
2	20	40	60	40
2	25	50	50	30

**Cuadro 10.** Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición en hipoclorito de sodio para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la evaluación final.

Concentración (NaClO %)	Tiempo		Supervivencia (%)	Desarrollo de brotes (%)
	de inmersión (minutos)	Contaminación (%)		
Testigo	0	<b>100<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>ab</sup></b>	<b>0<sup>ab</sup></b>
1	15	<b>80<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>a</sup></b>
1	20	<b>60<sup>a</sup></b>	<b>40<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>a</sup></b>
1	25	<b>60<sup>a</sup></b>	<b>40<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>a</sup></b>
2	15	<b>80<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>a</sup></b>
<b>2</b>	<b>20</b>	<b>40<sup>a</sup></b>	<b>60<sup>a</sup></b>	<b>40<sup>a</sup></b>
2	25	<b>60<sup>a</sup></b>	<b>40<sup>a</sup></b>	<b>40<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup> Medias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05 \pm$  error estándar de la media (n=5).

Los resultados del presente ensayo demuestran la relativa ineficacia del NaClO como agente desinfectante superficial para material vegetal, al utilizar como fuente de segmentos nodales un árbol desarrollado bajo condiciones de invernadero (Al-Khayri, 2001; Samarina *et al.*, 2010; Bhojwami y Dantu, 2013). En nuestro estudio, el mejor tratamiento (numéricamente) con la solución desinfectante al 2% durante 20 minutos desinfectó tan solo el 60% de los segmentos, a diferencia del 88% de desinfección informado por Hernández y colaboradores (2013), utilizando NaClO 1% durante 20 minutos, en segmentos de plantas de *C. aurantifolia* provenientes de semillas germinadas *in vitro*.

### **6.2.2. Evaluación de fungicidas químicos sintéticos**

Aunque no se logró la desinfección de segmentos nodales de limón mexicano, provenientes de una planta desarrollada en un huerto de traspatio, con algunos tratamientos a base de clorotalonil con procloraz, además de hipoclorito de sodio, se logró desinfectar un total de 12 explantes. Ninguno de los tratamientos presentó diferencia significativa (Cuadros 11, 12, 13 y 14) con respecto al testigo según la prueba de (Tukey  $\alpha = 0.05$ ), sin embargo, los mejores resultados numéricos se obtuvieron con la mezcla de clorotalonil ( $0.078 \text{ mL L}^{-1}$ ) + procloraz ( $0.031 \text{ mL L}^{-1}$ ) durante 6 horas, seguido del tratamiento con una solución de NaClO al 2% durante 20 minutos (Cuadro 14). Este tratamiento alcanzó el 30% de supervivencia con 70% de contaminación microbiana sin ocasionar daños en los tejidos, lo que permitió que dos terceras partes de los explantes desinfectados lograran desarrollar brotes a partir de las yemas axilares (Cuadro 14).

**Cuadro 11.** Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición de la mezcla de clorotalonil + procloraz para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la primera evaluación semanal.

Fungicidas	Concentración i.a. (mL L <sup>-1</sup> )	Tiempo de inmersión (h)	Contaminación (%)	Supervivencia (%)	Desarrollo de brotes (%)
Testigo	0	0	100	0	0
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	2	10	90	0
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	3	20	80	0
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	4	0	100	0
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	5	10	90	0
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	6	0	100	0
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	7	10	90	0
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	8	10	90	0
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	9	0	100	0

Concentración del ingrediente activo (i.a.). Sportak® 45CE (31.25 % procloraz). ECO® 720 (52.0% Clorotalonil). Una vez transcurrido el tiempo determinado para cada tratamiento con clorotalonil y procloraz, los segmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % con detergente Tween 20 (0.1%) durante 20 minutos.

**Cuadro 12.** Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición de la mezcla de clorotalonil + procloraz para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la segunda evaluación semanal.

Fungicidas	Concentración i.a. (mL L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Tiempo de inmersión (h)	Contaminación (%)	Supervivencia (%)	Desarrollo de brotes (%)
Testigo	0	0	100	0	0
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	2	40	60	0
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	3	50	50	20
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	4	30	70	10
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	5	50	50	10
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	6	40	60	20
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	7	50	50	0
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	8	70	30	0
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	9	50	50	0

Concentración del ingrediente activo (i.a.). Sportak® 45CE (31.25 % procloraz). ECO® 720 (52.0% Clorotalonil). Una vez transcurrido el tiempo determinado para cada tratamiento con clorotalonil y procloraz, los segmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % con detergente Tween 20 (0.1%) durante 20 minutos.

**Cuadro 13.** Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición de la mezcla de clorotalonil + procloraz para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la tercera evaluación semanal.

Fungicidas	Concentración i.a. (mL L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Tiempo de inmersión (h)	Contaminación (%)	Supervivencia (%)	Desarrollo de brotes (%)
Testigo	0	0	100	0	0
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	2	50	50	0
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	3	60	40	20
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	4	50	50	10
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	5	70	30	10
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	6	60	40	20
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	7	70	30	10
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	8	80	20	0
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	9	60	40	0

Concentración del ingrediente activo (i.a.). Sportak® 45CE (31.25 % procloraz). ECO® 720 (52.0% Clorotalonil). Una vez transcurrido el tiempo determinado para cada tratamiento con clorotalonil y procloraz, los segmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % con detergente Tween 20 (0.1%) durante 20 minutos.

**Cuadro 14.** Efecto de distintas concentraciones y periodos de exposición de la mezcla de clorotalonil + procloraz para desinfectar segmentos nodales de limón mexicano, durante la evaluación final.

Fungicidas	Concentración i.a. (mL L <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	Tiempo de inmersión (h)	Contaminación (%)	Supervivencia (%)	Desarrollo de brotes (%)
Testigo	0	0	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	2	90 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	3	80 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	4	80 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>
Procloraz + Clorotalonil	0.078 + 0.208	5	80 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>

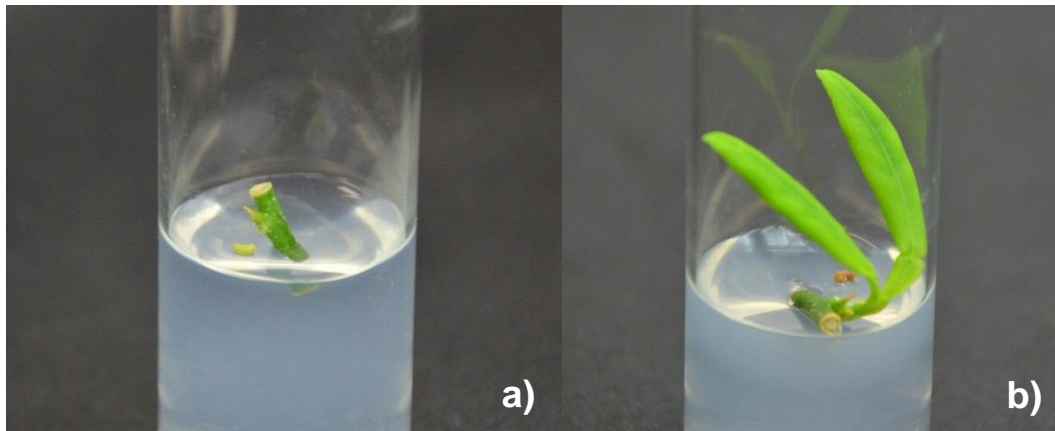
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	6	<b>70<sup>a</sup></b>	<b>30<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>a</sup></b>
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	7	<b>80<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>a</sup></b>	<b>10<sup>a</sup></b>
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	8	<b>100<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>a</sup></b>
Procloraz + Clorotalonil	0.031 + 0.078	9	<b>100<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>a</sup></b>	<b>0<sup>a</sup></b>

<sup>a</sup> Medias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05 \pm$  error estándar de la media ( $n=5$ ); <sup>b</sup> Concentración del ingrediente activo (i.a.). Sportak® 45CE (31.25 % procloraz). ECO® 720 (52.0% Clorotalonil). Una vez transcurrido el tiempo determinado para cada tratamiento con clorotalonil y procloraz, los segmentos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se sumergieron en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % con detergente Tween 20 (0.1%) durante 20 minutos.

La mezcla de clorotalonil + procloraz en dos diferentes dosis y con diferente tiempo de inmersión, seguido de inmersión en hipoclorito de sodio resultó poco efectiva contra la contaminación microbiana de los segmentos nodales. Se observó que la mayoría de los contaminantes detectados corresponden a bacterias que forman burbujas por debajo de la superficie del medio y a hongos de micelio filamentosos, los cuales, se sometieron a pruebas microbiológicas como; cultivo in vitro, observación de estructuras y caracterización morfológica. Los altos niveles de contaminación sugieren que el establecimiento es la etapa más problemática para realizar el cultivo de tejidos (Rocca, 1993). La utilización de plantas donantes previamente desarrolladas en condiciones de invernadero, puede reducir el índice de contaminación (Rathore *et al.*, 2004), por lo que se debe evitar el uso de explantes provenientes de plantas de campo (Mroginski *et al.*, 2004). Esto aplica especialmente en especies leñosas perennes como los cítricos (Samarina *et al.*, 2010). Árboles cultivados en huertos de traspatio están propensos a la invasión de microorganismos contaminantes, lo que complica la desinfección (Bhojwami y Dantu, 2013).

#### 6.4. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales

Se observó el desarrollo de brotes generados a partir de las yemas axilares de los segmentos nodales después de cuatro semanas en la cámara de incubación (Fig. 6). Los brotes regenerados mostraron una apariencia saludable y una coloración verde similar a las plantas en condiciones ambientales convencionales. Por lo anterior se estimó que se encontraban en una condición ideal para su utilización en la siguiente etapa del cultivo de tejidos vegetales.



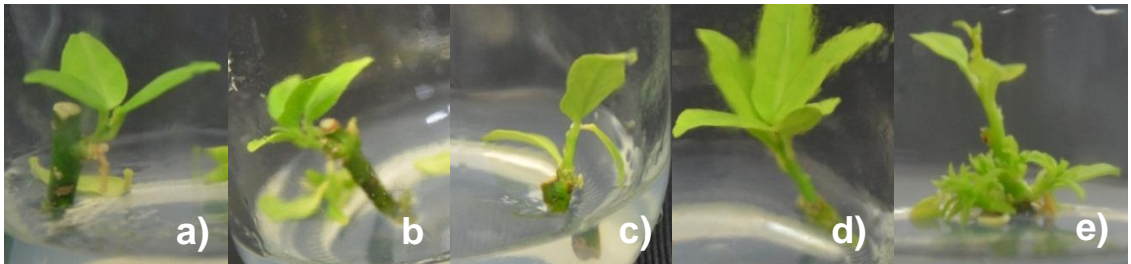
**Figura 6.** Explantes de limón mexicano cultivados *in vitro*: a) segmento nodal durante la primera semana de la etapa de establecimiento; b) desarrollo de brote a partir de la yema axilar del segmento nodal durante la cuarta semana de la etapa de establecimiento.

Después de 10-30 días en incubación, en los segmentos nodales se hizo evidente la regeneración vegetativa de los brotes, resultado que se asemeja al tiempo de respuesta morfogénica de otras variedades de limones (Samarina *et al.*, 2010).

El medio MS utilizado proporcionó las condiciones nutricionales necesarias para la supervivencia de los tejidos de limón mexicano y para el desarrollo óptimo de brotes a partir de segmentos nodales, resultados similares a lo informado previamente (Al-Bahrany, 2002; Al-Khayri, 2001; Hernández *et al.*, 2013).

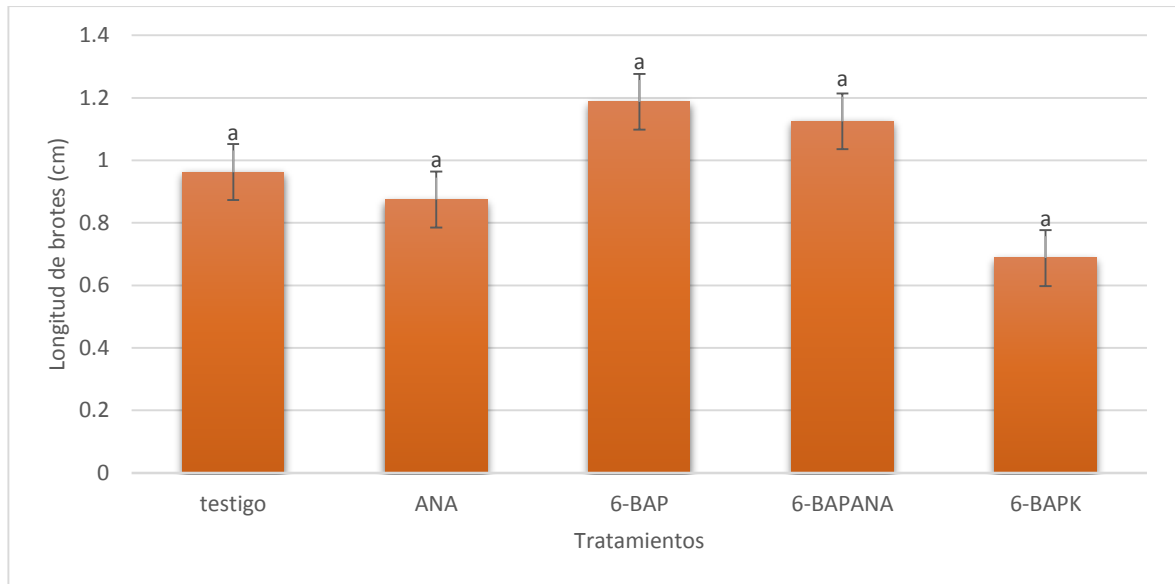
### 6.5. Multiplicación de brotes *in vitro*

Después de 20-30 días en el medio de multiplicación, se observó el desarrollo de nuevos brotes en los explantes (Fig. 7). La respuesta morfogénica fue evaluada registrando parámetros biométricos como la cantidad de brotes por explante, la longitud de los brotes y el número de hojas en los mismos.



**Figura 7.** Explantes de limón mexicano con brotes desarrollados *in vitro* a partir de segmentos nodales: a) brote axilar desarrollado en medio MS (control); b) brote axilar desarrollado en medio MS con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  6-BAP; c) brote axilar desarrollado en medio MS con  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA; d) brote axilar desarrollado en medio MS con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  6-BAP y  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  ANA; e) brotes (axilar y adventicios) desarrollado en medio MS con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  6-BAP y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  Kinetina.

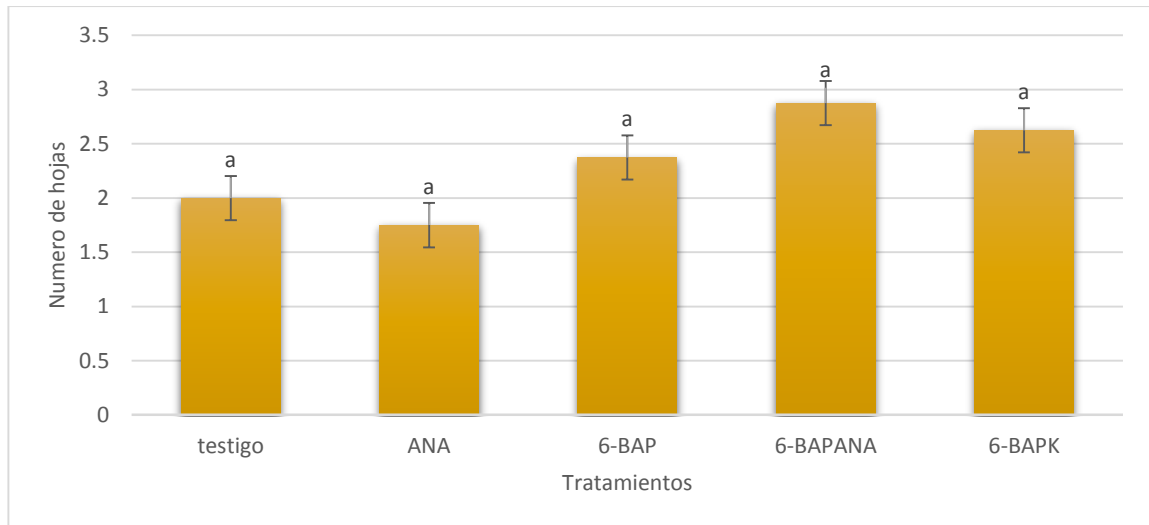
La longitud promedio de los brotes durante la evaluación final osciló de 0.6 cm a 1.2 cm, sin diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 8).



**Figura 8.** Longitud promedio de los brotes regenerados, por efecto de los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetales, en el medio de cultivo en explantes de limón mexicano. <sup>a</sup> Medias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05 \pm$  error estándar de la media ( $n=5$ ).

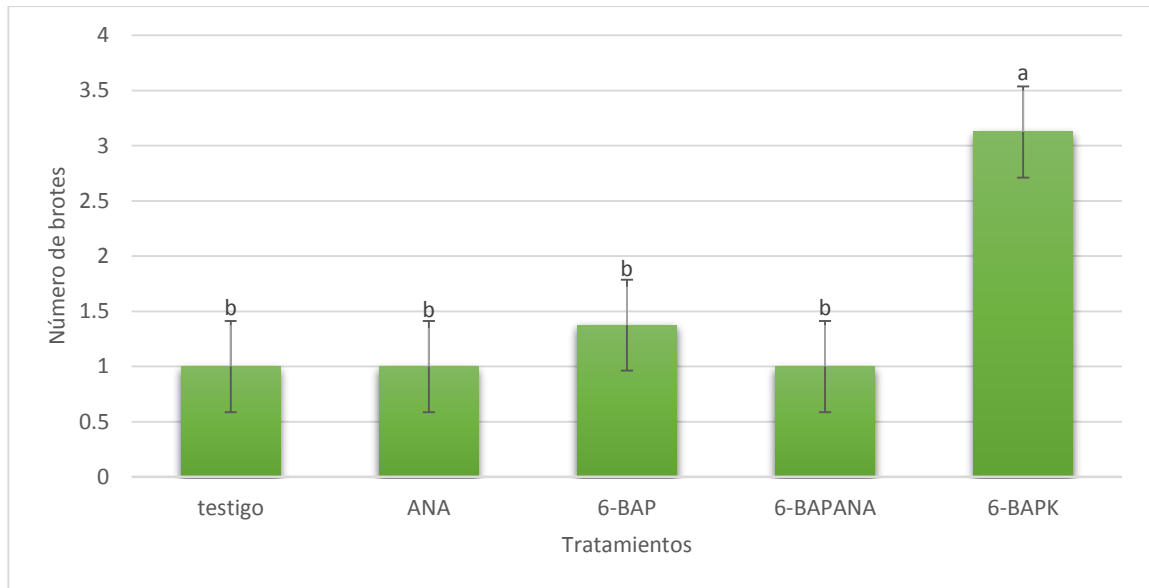
Los brotes generados a través de la organogénesis directa, a partir de segmentos nodales de limón, desarrollaron longitudes de 0.5 a 2 cm, coincidiendo con lo informado en otras especies del género *Citrus* (Duran *et al.*, 1989); fue también similar a lo informado para *C. acida* Roxb. (Chakravarty y Goswami, 1999), al igual que para *C. limon* (Goswami *et al.*, 2013). La adición de ANA o K a 6-BAP no mostró efecto sobre la elongación de los brotes, a diferencia del desarrollo mostrado por la combinación de ANA y 6-BAP en *C. limon* (Rathore *et al.*, 2004), *C. jambhiri* Lush. (Virk y Nagpal, 2010), así como en *C. sinensis* y *C. limonia* (Peixoto, 2010).

El promedio del número de hojas por brote osciló entre 1.5 y 3.0 en todos los tratamientos, sin diferencias significativas (Fig. 9). La combinación de 6-BAP con ANA o K no mostró ningún efecto sobre el número de las hojas desarrolladas.



**Figura 9.** Número de hojas (promedio) en los brotes regenerados, por efecto de los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetales, en el medio de cultivo en explantes de limón mexicano. <sup>a</sup> Medias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05 \pm$  error estándar de la media ( $n=5$ ).

El número de brotes en el tratamiento con 6-BAP y Kinetina osciló entre 0 y 6, en el tratamiento con 6-BAP de mantuvo en un rango entre 0 y 3; mientras que, en los demás tratamientos, el máximo número de brotes por explante fue 2. Aunque la mayoría de los explantes desarrollaron brotes, el número de éstos por explante varió considerablemente de acuerdo a la presencia de los reguladores de crecimiento en el medio. De acuerdo a la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ) el mejor tratamiento fue  $1 \text{ mg L}^{-1}$  6-BAP y  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  Kinetina, este presentó diferencias significativas, en cuanto al coeficiente de multiplicación, con respecto al testigo (Fig. 10). Los explantes en el medio MS sin reguladores de crecimiento, sólo desarrollaron un brote a partir de las yemas axilares.



**Figura 10.** Coeficiente de multiplicación, por efecto de los tratamientos con reguladores de crecimiento vegetales, en el medio de cultivo en explantes de limón mexicano. <sup>a</sup> Medias con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey a una  $P \leq 0.05 \pm$  error estándar de la media ( $n=5$ ).

Se ha demostrado que el uso de reguladores de crecimiento vegetales es necesario dentro del cultivo de tejidos. Muchos estudios se han desarrollado para identificar la composición óptima del medio de cultivo, destinado a cultivar brotes diferenciados en la regeneración de plantas del género *Citrus* (Al-Bahrany, 2002; Peixoto, 2010; Pérez-Tornero, 2012; Samarina, 2010; Virk y Nagpal, 2010:), pero la respuesta morfogénica de los explantes varía incluso entre variedades de la misma especie (Pérez y Ochoa, 1997).

Se reportó que la utilización de combinaciones de 6-BAP, K y ANA son eficientes para inducir la formación directa de brotes en segmentos nodales de *C. aurantifolia* (Al-Bahrany, 2002; Pérez y Ochoa, 1997). Informes previos indican la generación de un gran número de brotes a partir de segmentos nodales en un medio con 6-BAP y ANA (Al-Bahrany, 2002; Rathore *et al.*, 2004), pero en

nuestros experimentos con 6-BAP y ANA sólo un explante desarrolló dos brotes adventicios, resultado comparable al informado por Peixoto (2010) al evaluar combinaciones de diferentes concentraciones de 6-BAP y ANA en *C. sinensis* y *C. limonia*. El coeficiente de multiplicación se incrementa en concentraciones de 0.5 a 1 mg L<sup>-1</sup> de citoquininas, concentraciones más altas inhiben la brotación (Al-Khayri, 2001). Dentro de las citoquininas evaluadas, 6-BAP muestra mayor coeficiente de multiplicación que K en *C. acida* (Chakravarty y Goswami, 1999). El número de brotes desarrollados disminuyó en los tratamientos sin 6-BAP. El tratamiento con ANA (0.1 mg L<sup>-1</sup>) en ausencia de 6-BAP no tuvo influencia en el desarrollo de brotes adventicios, esto coincide con lo informado por Al-Bahrany (2002) y Rathore (2004). En el tratamiento con 6-BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) el mayor número de brotes por explante fue de 3, similar a los resultados obtenidos por Rathore y colaboradores (2004), en segmentos de *C. limon*.

El presente estudio demostró que la combinación de 6-BAP (1 mg L<sup>-1</sup>) y Kinetina (0.5 mg L<sup>-1</sup>), como suplemento en el medio de cultivo MS induce la generación de brotes adventicios (Fig. 7). El máximo número de brotes por explante fue seis en presencia de la combinación de 6-BAP y K, este resultado es comparable al obtenido por AL-Khayri (2001) quien informó el desarrollo de un máximo de 8 brotes en presencia del mismo tratamiento en segmentos nodales de *C. aurantifolia*, sin embargo menor a lo informado por Al-Bahrany (2002) quien obtuvo un máximo de 9 brotes por explante, en la misma especie. El número de brotes obtenido durante la etapa de multiplicación se consideró satisfactorio, el promedio de brotes por explante entra dentro del rango de 2.0 a 9.0 previamente informado en varias especies de cítricos (Al-Bahrany, 2002; Al-Khayri, 2001;

Kotsias y Roussos, 2001; Pérez y colaboradores, 2012). Se observó que el cultivo de tejidos permite desarrollar brotes a partir de segmentos nodales de plantas maduras de limón mexicano (Al-Bahrany, 2002; Al-Khayri, 2001; Pérez y Ochoa, 1997). Es preferible propagar plantas maduras seleccionadas para conservar características deseables. El número y tamaño de brotes desarrollados a partir de segmentos nodales de limón mexicano fueron útiles para la realización de los análisis de identificación molecular de CLas para determinar la persistencia de la bacteria en los explantes *in vitro*.

#### 6.6. Extracción de ADN de tejidos cultivados *in vitro*

Se colectaron muestras de tejido de los explantes sobrevivientes a los ensayos antes mencionados, para realizar la extracción de ADN. Los valores de concentración de las seis muestras oscilaron entre los 104.9 y 486.6 ng/μl, una relación 260/280 entre 1.81 y 1.93 para el ADN extraído. La concentración del ADN en todas las muestras se ajustó a 20 ng/μL almacenados -20°C para su posterior uso. En su conjunto todos estos valores fueron útiles para la realización de los análisis de identificación molecular (Cuadro 15).

**Cuadro 15.** Valores de la concentración y rango de pureza del extracto de ADN, obtenidos mediante CTAB 3%, a partir de material vegetal tomado de explantes de limón mexicano cultivados *in vitro*.

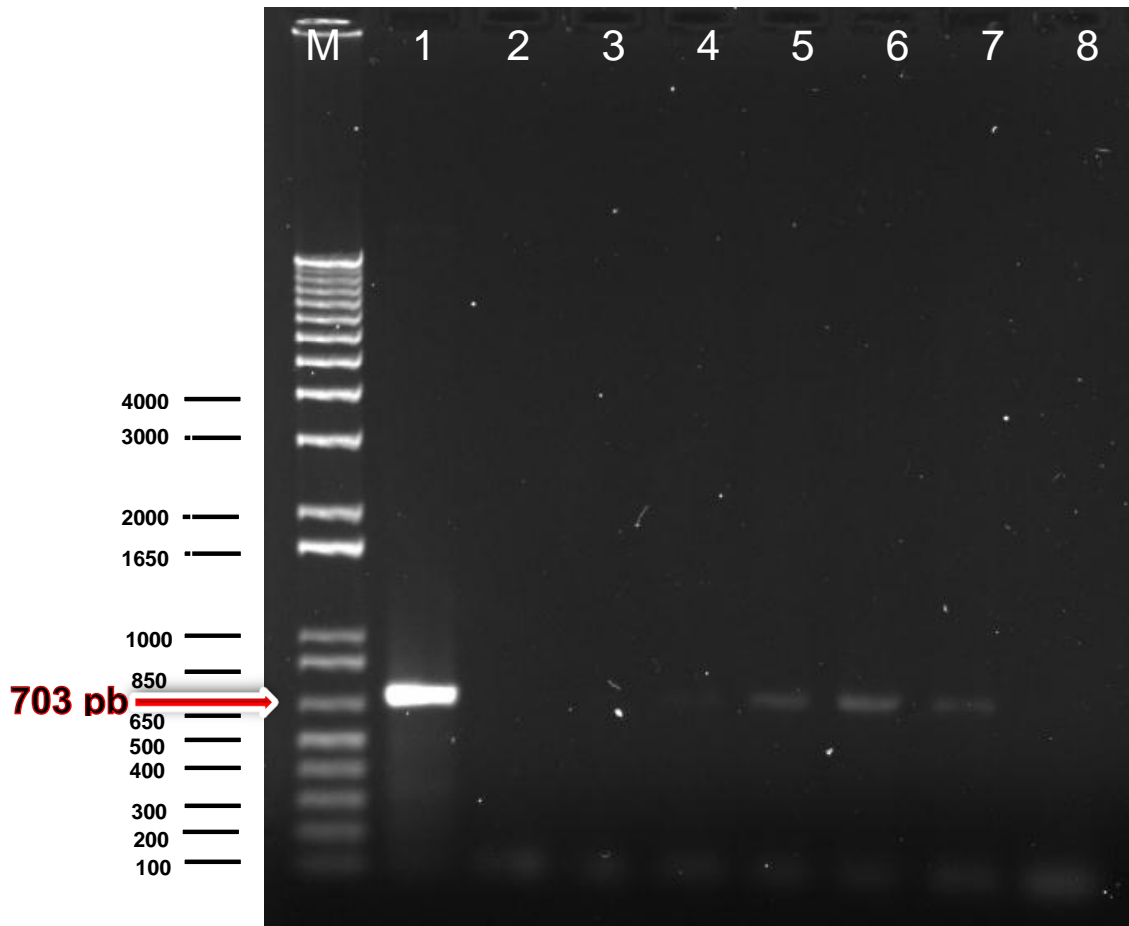
Muestra	Concentración de ADN ng μL <sup>-1</sup>	Rango de Pureza 260/280
1	157.6	1.81
2	239.3	1.82
3	486.6	1.87

4	486.2	1.83
5	409.7	1.93
6	104.9	1.93

Muestras.- 1: explante 4 (25/11/15 – 08/05/16) ; 2: explante 23 (25/11/15 – 08/05/16); 3: explante 4 (25/11/15 – 08/06/16); 4: explante 23 (25/11/15 – 08/06/16); 5: explante 25 (22/03/16 – 08/06/16); 6: explante 15 (22/03/16 – 08/06/16). (Fecha de establecimiento *in vitro* – fecha de muestreo).

### 6.7. Detección de CLas por PCR en explantes *in vitro*

A los explantes se les realizó el análisis molecular para identificar a CLas a los cinco y seis meses después del establecimiento *in vitro*. En las muestras provenientes de material *in vitro* “4” y “15” (cinco meses después del establecimiento *in vitro*) no se observaron bandas en el gel. En las muestras “4” (seis meses después del establecimiento *in vitro*); “23” (cinco y seis meses después del establecimiento *in vitro*); y “25” (cinco meses después del establecimiento *in vitro*), se observaron bandas en el gel. Mediante la técnica de PCR convencional, se identificó la presencia de CLas en los explantes de limón mexicano cultivados *in vitro* (Fig. 13). En los carriles correspondientes a las mencionadas muestras se observaron bandas con un peso molecular de 703 pb coincidiendo con lo reportado previamente por Hocquellet y colaboradores (1999).



**Figura 11.** Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en muestras de tejidos de limón mexicano, cultivados *in vitro*, mediante PCR convencional: M: marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen Life Technologies); carril 1: control positivo (CLas); carril 2: control negativo (agua); carril 3: explante 4 (cinco meses); carril 4: explante 23 (cinco meses); carril 5: explante 4 (seis meses); carril 6: explante 23 (seis meses); carril 7: explante 25 (cinco meses); carril 8: explante 15 (cinco meses).

Las bandas con un peso molecular de 703 pb observadas en el gel de agarosa (0.8%) corresponden a la amplificación de fragmentos de ADN ribosomal de la bacteria, esto permite la identificación directa de la especie *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Hocquellet *et al.*, 1999; Ruangwong y Akarapisan, 2006). El resultado de esta técnica confirmó la presencia de CLas en explantes *in vitro* de limón mexicano.

La obtención de material vegetal *in vitro* infectado con *Candidatus Liberibacter asiaticus*, permitirá profundizar en el estudio de la bacteria y de su interacción con su hospedero, evaluar estrategias de control biológico e implementar bioensayos de productos químicos sintéticos y biorracionales.

## VII. CONCLUSIONES

1. Se identificó a *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón mexicano, donantes de segmentos nodales, desarrollados en condiciones de invernadero y en huertos de traspatio.
2. El medio Murashige y Skoog (vitaminas MS), fue eficiente para la fase de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas maduras de limón mexicano infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.
3. El medio Murashige y Skoog (vitaminas MS) suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> 6-BAP y 0.5 mg L<sup>-1</sup> K, fue adecuado como medio de multiplicación para explantes de limón mexicano infectados con *Candidatus Liberibacter asiaticus*.
4. Se confirmó la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en explantes de limón mexicano propagados mediante cultivo de tejidos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Al\_Bahrany, A.M. 2002. Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. Saudi Arabia. *Scientia Horticulturae* 95:285-295.
2. Al Khayri, J.M., and Al Bahrany, A.M. 2001. *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). *Current Science* 81:1242-1246.
3. Arce, A.P. 2014. Evaluación de la efectividad de formulaciones biotecnológicas para el manejo de la enfermedad del Huanglongbing (HLB) en plantas de limón mexicano bajo condiciones controladas. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.
4. Arratia, A.A. 2013. Identificación, caracterización y cuantificación de *Candidatus Liberibacter* spp. y *Candidatus Phytoplasma* spp. asociados a Huanglongbing en limón mexicano. Tesis de maestría. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa.
5. Bernard, L., Duran, N., and Elena, S.F. 2009. Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology* 90:2040-2049.
6. Bhat, S.R., Chitralkha, P. and Chandel, K.P.S. 1992. Regeneration of plants from long-term root culture of lime, *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 29: 19-25.
7. Bhojwani, S. and Dantu, P. 2013. *Plant tissue culture: An introductory text.* 11-36 p.
8. Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.
9. Carimi, F. and Da Paquale, F. 2003. Micro propagation of woody trees and fruits. 589-619 p.
10. Chakravarty, B., and Goswami, B.C. 1999. Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrus acida* Roxb. and the uniformity of regenerated plants. *Scientia Horticulturae* 82:159-169.
11. Cortez, E., López, J.I., Rodríguez, L., Partida, M.P., and Pérez, J. 2016. Especies de Chrysopidae asociadas a *Diaphorina citri* Kuwayama en

cítricos y capacidad de depredación en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 7:363-374.

12. Da Graça, J. V. 2008. Biology, history and world status of huanglongbing. memorias del taller internacional sobre el huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Hermosillo, Son.
13. Da Graca, J. V. 2010. Etiology, history and world situation of citrus huanglongbing. 2º Taller Internacional sobre el huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. Mérida Yucatán, México.
14. Davies, F.S. and Albrigo, L.G. 1994. Citrus. CAB International, Wallingford, U.K. 254 p.
15. Davis, M.J., Mondal, S.N., Chen, H., Rogers, M.E. and Brlansky, R.H. 2008. Co-cultivation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' with Actinobacteria from Citrus with Huanglongbing. Plant Disease 92: 1547-1550.
16. Hoffman, M.T., Doud, M.S., Williams, L., Zhang, M., Ding, F., Stover, E., Hall, D., Zhang, S., Jones, L., Gooch, M., Fleites, L., Dixon, W., Gabriel, D. and Duan, Y. 2013. Heat Treatment Eliminates 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from Infected Citrus Trees Under Controlled Conditions. The American Phytopathological Society 103:15-22.
17. Duan, Y., Zhou, L., Hall, D. G., Li, W., Doddapaneni, H., Lin, H., Liu, L., Vahling, C.M., Gabriel, D. W., Williams, K. P., Dickerman, A., Sun, Y., and Gottwald, T. 2009. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus* obtained through metagenomics. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 22:1011-1020.
18. Duran, N., Cambra, M., Medina, V., Ortega, C., and Navarro, L. 1988. Growth and morphogenesis of *Citrus* tissue cultures infected with *Citrus* Tristeza virus and *Citrus* infectious variegation virus. Phytopathology 79:820-826.
19. Duran, N., Ortega, V. and Navarro, L. 1989. Morphogenesis and tissue cultures of three *Citrus* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 16:123-133.
20. Garbus, I., Gómez, M. y Echenique, V. 2004. Herramientas básicas de la ingeniería genética. Biotecnología y mejora vegetal. Parte II, capítulo 4:47-69.

21. Esquivel, F., Valdovinos, G., Mora, G., Gomez, R., Velázquez, J., Manzanillas, M.A., Flores, J.L. y López, J.I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46:769-782.
22. Fierro, Francisco. 2014. Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 27-52 p.
23. Goswami, K., Sharma, R., Singh, P.K., and Singh, G. 2013. Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micro propagated plants using RAPD markers. *Physiology Molecular Biology Plants* 19:137–145.
24. Gottwald, T.R., Graham, J.H., Irey, M.S., McCollum, T.G., and Wood, B.W. 2012. Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection* 36:73–82.
25. Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., and Achor, D. S. 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* 5:1-15.
26. Hernández, Y., Silva, J.J., and Borges, M. 2013. Establecimiento y multiplicación in vitro de *Citrus aurantifolia* Christm. Swing. var. 'mexicana' a partir de semillas. *Biotecnología Vegetal* 13:181-187.
27. Herrera, L., Ochoa, J.C., Rivera, R., and Martínez, J.P. 2009. Sequence diversity on four ORFs of citrus tristeza virus correlates with pathogenicity. *Virology Journal* 6:116.
28. Hocquellet, A., Toorawa, P., Bové, J.M. and Garnier, M. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the  $\beta$  operon. *Molecular and Cellular Probes* 13:373-379.
29. Hopkins, D.L., and Purcell, A.H. 2002. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease* 86:1056-1066.
30. Juárez, J., Aleza, P. y Navarro, L. 2015. Application of Citrus shot-tip grafting *in vitro*. *Acta horticulturae* 1065:635-642.
31. Kotsias, D., and Roussos, P.A. 2001. An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in in vitro shoot tip and node culture of lemon seedlings. *Scientia Horticulturae* 89:115-128.

32. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., and Mroginski, L. 2004. Establecimiento de cultivo de tejidos. Biotecnología y mejora vegetal. Parte II, 15-33 p.
33. Li, W., Levy, L., John, S., and Hartung, J.S. 2008. Quantitative distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in *Citrus* plants with *Citrus* huanglongbing. *Phytopathology* 99:39-144.
34. Loyola-Vargas, V. M., De-la-Peña, C., Galaz-Avalos, R. M., and Quiroz-Figueroa, F. R. 2008. Plant tissue culture. *Molecular Biotechnology Handbook*, 875–904 p.
35. Magos-García, K., Leyva-Mir, S.G. y Mariscal-Amaro, L. A. 2010. Etiología de la pudrición de bulbo y tallo de la azucena híbrida (*Lilium spp.*) y su control en el Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:162-164.
36. Maschio, F. 2011. Ações adotadas pelo citricultor para o manejo do huanglongbing (HLB, greening) no parque citrícola. [Acciones adoptadas por el citricultor para el manejo del huanglongbing (HLB, greening) en el parque citrícola (portugués)]: Tesis de maestría. Fundo de defensa da citricultura, Sao Paulo, Brasil.
37. Mroginski, L.A. y Roca, W. M. 1993. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* 19-40 p.
38. Mroginski, L.A., Sansberro, P. y Flaschland, E. 2004. Establecimiento de cultivo de tejidos. *Biotecnología y mejora vegetal. Parte II, capítulo 1*:17-25.
39. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
40. Neumann, K.H., Kumar, A. and Imani, J. 2009. Phytohormones and growth regulators. *Plant cell and tissue culture - A tool in biotechnology, principles and practice* 227-233 p.
41. Paudyal, K.P. y Haq, N. 2000. In vitro propagation of pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck). *In vitro cellular & developmental biology-plant* 36:511-516.
42. Peixoto, M.L., Cardoso, M.G., Viana, C., and Campos, W. 2010. Growth regulators, culture media and antibiotics in the in vitro shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:654-660.

43. Pelz, K.S., Brlansky, R.H., Ebert, T.A. and Rogers, M.E. 2010. Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by asian citrus psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of economic entomology* 103:1531-1541.
44. Pérez, A.I. 2013. Efecto de precursores y reguladores de crecimiento en la formación de brotes adventicios a partir de explantes de limón persa (*Citrus latifolia*). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados.
45. Pérez, E., and Ochoa, N. 1997. *In vitro* plant regeneration of mexican lime and mandarin by direct organogenesis. *Hort Science* 32:931-934.
46. Pérez, O., Tallón, C.I., and Porras, I. 2010. An efficient protocol for micro propagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments, *Plant Cell Tissue and Organs Culture* 100:263–271.
47. Pérez, O., Tallón, C.I., and Porras, I. 2012. Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators, *Plant Cell Tissue and Organs Culture* 48:488–499.
48. Picoz, P.A., García, R.S., León, J., Sañudo, A. y Allende, R. 2014. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:54-74.
49. Roca, W. M. y Mroginski, L.A. 1993. Establecimiento de un laboratorio para cultivos de tejidos vegetales. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* 1-18 p.
50. Rathore, J.S., Rathore, M.S., and Singh, M. 2007. Micro propagation of mature tree of *Citrus limon*, *Indian Journal of Biotechnology* 6:239–244.
51. Rogers, M.E., Stansly, P.A., and Stelinski, L.L. 2006. Asian citrus psyllid and citrus leafminer. *Entomology and Nematology Department, 2016 Florida citrus pest management guide* 33-38.
52. Ruangwong, O., and Akarapisan, A. 2006. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing citrus huanglongbing disease. *Journal of Agricultural Technology* 2:111-120.
53. Samarina, L.S., Kolomiets, T.M., Baranova, E.N. and Arutyunova, E.S. 2010. Regeneration and Micropropagation of Lemon Cultivars *in vitro* from Nodal Explants. *Russian Agricultural Sciences* 36:417-420.

54. Sechler, A., Schuenzel, E.L., Cooke, P., Donnua, S., Thaveechai, N., Postnikova, E., Stone, A.L., Schneider, W.L., Damsteegt, V.D. and Schaad, N. W. 2008. Cultivation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* and *Ca. L. americanus* Associated with Huanglongbing. *Phytopathology* 99:480-486.
55. Serrato, A., Flores, L., Aportela, J. y Sierra, E. 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 53-74 p.
56. Stamatiu, K., Alarcón, A., Ferrera, R., Nava, C., Sánchez, J., Cruz, J.S. y Castillo, M. 2015. Tolerancia de hongos filamentosos a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones *in vitro*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 31:23-37.
57. Tatineni, S., Sagaram, U.S., Gowda, S., Robertson, C.J., and Dawson, W.O. 2008. In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and Real-Time PCR. *Phytopathology* 98:592-599.
58. Tiwari, S., Mann, R.S., Rogers, M.E., and Stelinski, L.L. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Society of Chemical Industry, Pest Management* 67:1258-1268.
59. Velázquez, K., Renovell, A., Comellas, M., Serra, P., García, M.L., Piña, J.A., Navarro, L., Moreno, P., and Guerri, J. 2010. Effect of temperature on RNA silencing of a negative stranded RNA plant virus: Citrus psorosis virus. *Plant Pathology* 59:982-990.
60. Virk, G.S., and Nagpal, A. 2010. Effect of explant type and different plant growth regulators on callus Induction and plantlet regeneration in citrus jambhiri Lush. *Researchgate* 5:97-110.
61. Zamora, V., Luis, M., Peña, I., Ferriol, X. y Hernández, L. 2015. Uso del micro injerto in vitro de ápices caulinares para eliminar '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' en cultivares de cítricos en Cuba. *Protección Vegetal* 30:123-132.
62. Zavala, M.J., Tun, J.M., Cristóbal, J., Ruiz, E., Gutiérrez, O., Vázquez, M. y Méndez, R. 2005. Control postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11:251-255.
63. Zhang, M., Powell, C.A., Guo, Y., Doud, M.S. and Duan, Y. 2012. A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and

rescuing huanglongbing - affected citrus plants. *Phytopathology* 102:567-574.

64. Zhao, H., Vidalakis, G., da Graça, J.V., Douhan, G.W., Halbert, S.E., Keremane, M.L., and Lee, R.F. 2015. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *Journal of Integrative Plant Biology* 40:1-15.
65. [http://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016](http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016).
66. <http://sinavef.senasica.gob.mx/SIRVEF/HLB.aspx>
67. <https://www.cabi.org/search/?q=citrus>
68. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
69. [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/index.jsp).
70. [http://www.infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/ientidad/index.jsp](http://www.infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/ientidad/index.jsp)
71. <http://www.inifap.gob.mx/SitePages/Inicio.aspx>
72. <http://www.irac-online.org/pests/diaphorina-citri/>
73. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/147556/Ficha\\_T\\_cnica\\_Diaphorina\\_citri.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/147556/Ficha_T_cnica_Diaphorina_citri.pdf)
74. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/147557/Ficha\\_T\\_cnica\\_Candidatus\\_Liberibacter\\_spp..pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/147557/Ficha_T_cnica_Candidatus_Liberibacter_spp..pdf)
75. <http://www.nappo.org/spanish/programa-de-trabajo/simposios-y-talleres/3er-taller-international-sobre-plagas-cuarentenarias-de-los-citricos/>