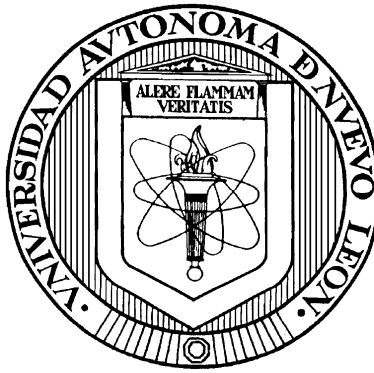


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**DETECCIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA ENFERMEDAD
HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS, “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”
Y “*Ca. L. americanus*” EN PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO**

Por

JOSÉ GARCÍA REYES

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

Escobedo, N.L. enero, 2012

**DETECCIÓN DE LOS AGENTES CAUSALES DE LA ENFERMEDAD
HUANGLONGBING DE LOS CÍTRICOS, "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" Y
"Ca. L. americanus" EN PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO**

Aprobación

Comité Particular de Tesis

Dr. Omar G. Alvarado Gómez
DIRECTOR DE TESIS

O. G. Alvarado

Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón
ASESOR

H. Gutiérrez

Dr. José Elías Treviño Ramírez
ASESOR

J. E. Treviño

Dra. Lydia Norma González Solís
ASESOR EXTERNO

L. N. González Solís

M.C. Jorge Alberto Alejandro Rosas
ASESOR EXTERNO

J. A. Rosas

Dr. Francisco Zavala García
SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

F. Zavala

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
SUMMARY.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Objetivos.....	3
1.2. Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Importancia de los cítricos en México.....	4
2.2. Enfermedades de los cítricos.....	4
2.3. Huanglongbing.....	6
2.3.1. Historia y distribución.....	6
2.3.2. Síntomas y daños.....	8
2.3.3. Organismo causal.....	9
2.3.4. Vectores.....	10
2.3.5. Diagnóstico.....	11
2.3.6. Métodos de control.....	12
2.3.7. Hospederos.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Material de laboratorio.....	14
3.2. Material de campo.....	15

Capítulo	Página
3.3. Evaluación de primers y condiciones de reacción para la amplificación de “ <i>Ca. L. asiaticus</i> ” y “ <i>Ca. L. americanus</i> ”.....	15
3.4. Ocurrencia de HLB en árboles de los estados de Nuevo León y Tamaulipas.....	18
3.4.1. Muestreo.....	18
3.4.2. Extracción de ADN.....	20
3.4.3. Amplificación por PCR.....	21
3.4.3.1. Control interno.....	21
3.4.3.2. “ <i>Ca. Liberibacter sp.</i> ”.....	22
3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Comparación de primers para PCR.....	23
4.2. Ocurrencia de HLB en árboles de cítricos de los estados de Nuevo León y Tamaulipas.....	25
4.2.1. Extracción de ADN.....	25
4.2.2. PCR de control interno.....	26
4.2.3. Detección de “ <i>Ca. L. asiaticus</i> ”.....	27
4.2.4. Detección de “ <i>Ca. L. americanus</i> ”.....	28
5. DISCUSIÓN.....	30
6. CONCLUSIONES.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33
8. APÉNDICE.....	38

DEDICATORIA

A mi familia por brindarme el apoyo moral y ánimos en los momentos difíciles. Mi madre Sofía Reyes Herrera, mi esposa María Catalina Rodríguez Chávez, mis hijas Karla Sofía García Rodríguez y Maritza Iveth García Rodríguez, mis hermanos Ma. Ignacia García Reyes y Enrique García Reyes. A mi suegro José Elías Rodríguez Arjona y hermanos de mi esposa.

A la memoria de mi padre Juan García Castro, mis abuelitas Salustia Herrera de León y Juana Castro, que Dios los tenga en su santa gloria.

A mis compañeros de posgrado Ernesto Contreras, José Alonso Yerbes, Ma. del Carmen, Ángel Audberto Pardo, Uriel Hernández, Rodolfo Alejandro García, Noe Cardona Martínez, Jesús Alberto Olvera, Jessica Rivera, Ariana Torres y César E. Guerrero, por su amistad y estar conmigo en las buenas y en las malas.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por proporcionarme la beca para mis estudios de posgrado.

Al Área de Estudios de Posgrado de la Facultad de Agronomía y al Dr. Francisco Zavala García, por brindarme sus atenciones.

A mi comité particular, por su ayuda en la realización de este proyecto, Dr. Omar G. Alvarado Gómez por sus enseñanzas, creer en mí y guiarme en todo momento, Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón por sus finas atenciones, Dr. José Elías Treviño Ramírez, Dra. Lydia Norma González Solís y M. C. Jorge Alberto Alejandro Rosas gracias por su ayuda y cooperación.

Al laboratorio Biociencia S. A. de C. V., especialmente a su Director General el Dr. Ramiro González Garza, por su asesoría y las facilidades otorgadas para la realización de la tesis.

Al los Licenciados Juan Manuel Cavazos Uribe y Oscar Valdez Almaguer, que con su apoyo y ayuda desinteresada pude realizar mis estudios de Maestría.

Al Biólogo Jesús Héctor Lozano Garza, que amablemente nos facilitó el acceso al laboratorio de Ciencias Naturales de la Facultad de Agronomía.

A la Ing. María Imelda Guadalupe Rivas, por su apoyo y atenciones durante mi estancia en el laboratorio.

Al plantel de maestros del posgrado, por sus enseñanzas y consejos en el salón de clases así como también en campo, y por el interés mostrado en mi proyecto de investigación alentándome a seguir adelante.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1.	Secuencias de primers usados para la amplificación de los agentes causales del HLB y el control interno de ADN.....	16
2.	Programas de temperaturas usados en la evaluación de los primers para la amplificación del ADN de los agentes causales del HLB.....	17
1A.	Formato de georeferenciación de muestras.....	38
2A.	Croquis de la huerta FAUANL, Marín, N.L.....	39
3A.	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta de la Facultad de Agronomía de la UANL.....	41
4A	Síntomas de los árboles muestreados en el área metropolitana de Monterrey.....	42
5A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “El Nogal” localizada en Cadereyta Jiménez, N. L.....	43
6A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “Puente Azul” localizada en Hidalgo, Tamaulipas.....	44
7A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “Las Jaras” localizada en Apodaca, N. L.....	45
8A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “La Unión”, localizada en General Terán, N. L.....	46
9A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “El Sabinito” localizada en General Terán, N. L.....	47
10A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “Noria de las Segobias” localizada en Montemorelos, N. L.....	48
11A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “El Cerro” localizada en Hidalgo, Tamaulipas.....	49
12A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “Hidalgo” localizada en Hidalgo, Tamaulipas.....	50
13A	Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “El Desengaño” localizada en Hidalgo, Tamaulipas.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1.	Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR del control positivo HLB utilizando diferentes primers.....	23
2.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de la amplificación por PCR del control positivo “ <i>Ca. L. americanus</i> ”, utilizando diferentes primers y diluciones del control positivo.....	24
3.	ADN obtenido de 10 muestras de cítricos por el método del CTAB.....	25
4.	Productos de PCR de un fragmento del gen 16S del cloroplasto obtenido por la amplificación de ADN de muestras de cítricos.....	26
5.	Amplificación de ADN de muestras de cítricos con primers específicos para “ <i>Ca. L. asiaticus</i> ”.....	28
6.	Amplificación de ADN de muestras de cítricos con primers específicos para “ <i>Ca. L. americanus</i> ”.....	28

RESUMEN

Los cítricos son plantas de gran importancia económica en México, pero su producción está en riesgo ya que en julio del año 2009 se reportó por primera vez en nuestro país la enfermedad llamada “enverdecimiento de los cítricos” o “huanglongbing” (HLB), la cual ha causado graves estragos en los países en donde se ha presentado. *Diaphorina citri* (Kuwayamaa) es el insecto vector del patógeno causal del HLB, “*Candidatus Liberibacter sp.*”, este insecto está establecido en México desde 1996.

Por mucho tiempo el diagnóstico del HLB se hizo mediante indexado biológico en plántulas de naranjo dulce, y a través de la observación al microscopio electrónico (Duran y Moreno, 2000; Timmer, 2002), sin embargo actualmente se utiliza la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por su mayor sensibilidad y especificidad (Colleta-Filho *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se implementó un protocolo para la detección de las bacterias “*Ca. Liberibacter asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*” en tejido vegetal y en ADN plásmido, y se establecieron las condiciones de reacción adecuadas para la amplificación por PCR de fragmentos específicos de ADN de las bacterias causantes del HLB utilizando 7 pares de oligonucleótidos.

La extracción de ADN en plantas de cítricos por el Método del CTAB modificado fue satisfactoria obteniéndose una concentración promedio de 25 ng de ADN μL^{-1} 50 mg^{-1} de tejido vegetal.

Con los controles positivos utilizados se logró la amplificación del ADN genómico de las bacterias “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*”. En el caso de “*Ca. L. asiaticus*”, se logró la amplificación del ADN genómico con los 6 pares de oligonucleótidos utilizados obteniéndose los productos esperados: 1160 pb con Oi1/Oi2c, 703 con A2/J5, 563 con OL1/OL2, 226 con Hung-F/Hung-R, 1100 con HLB-65/HLB-66 y 807 pb con Omp1218f/Omp2025r. En el caso de “*Ca. L. americanus*”, la técnica evaluada fue efectiva con los oligonucleótidos GB1/GB3 obteniéndose un producto de 1030 pb.

Se analizaron un total de 107 muestras de árboles de cítricos sintomáticas al HLB representativas de diferentes localidades de los municipios de Marín, Cadereyta Jiménez, Apodaca y el área metropolitana de Monterrey, en el Estado de Nuevo León, así como cuatro huertas del municipio de Hidalgo, Tamaulipas. Se obtuvo buena cantidad y calidad de ADN en las 107 muestras procesadas, y todas las muestras dieron reacción negativa a la amplificación por PCR con los primers específicos a las 2 especies causantes del HLB.

Palabras clave: HLB, “*Candidatus Liberibacter sp.*”, psíldos, PCR

SUMMARY

Citrus fruits are of great economic importance in Mexico, but they are threatened because on July 2009 it was reported by first time in the country the “huanglongbing” disease (HLB), which has caused serious havocs where it has been presented. *Diaphorina citri* (Kuwayamaa) is the vector of the pathogen, *Candidatus Liberibacter* sp., this insect was established in Mexico since 1996.

For a long time, HLB diagnosis was made through biological indexing on plantlets of sweet orange and by observation with the electronic microscope, but actually it uses PCR technique because great sensibility and specificity.

In the present work, we implemented a protocol for the detection of the bacterias “*Ca. L. asiaticus*” and “*Ca. L. americanus*” in plant tissue and plasmidic DNA, and we established the reaction conditions for the amplification by PCR of specific fragments of DNA of the bacterias causing HLB utilizing 7 primers pairs.

DNA extraction in citrus plants by modified CTAB method was successful obtaining a concentration of 25 ng of DNA μL^{-1} 50 mg^{-1} of plant tissue.

With positive controls we achieved the amplification of the genomic DNA of the bacterias “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*”. In the case of “*Ca. L. asiaticus*” we achieved the amplification of the genomic DNA with 6 pairs of primers obtaining the

size of the waiting products: 1160 bp with Oi1/Oi2c, 703 with A2/J5, 563 with OL1/OL2, 226 with Hung-F/Hung-R, 1100 with HLB-65/HLB-66, and 807 with Omp1218f/Omp2025r. In the case of “*Ca. L. americanus*”, the technique was successful with GB1/BG3 primers obtaining a product of 1030 bp.

In this work we analyzed 107 symptomatic representative samples of citric trees from different localities of the municipalities Marín, Cadereyta Jiménez, Apodaca and Monterrey, in the state of Nuevo Leon, and also from 4 groves of the municipality of Hidalgo, Tamaulipas. It was obtained good quality and quantity of DNA in the 107 processed samples, but none of the samples gave positive reaction to the amplification for PCR with specific primers for the 2 species of HLB.

Keywords: HLB, *Candidatus Liberibacter* spp, psílido, PCR.

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son uno de los cultivos de mayor importancia económica en México, con una producción de 4, 297, 238 tons de naranja en 344, 686 has. En el estado de Nuevo León se cultivan 25, 445 has que aportan una producción de 352, 068 tons de naranja (SIAP, 2008).

El huanglongbing (HLB) o enverdecimiento de los cítricos, es una de las enfermedades más severas en Asia, África, la Península de Arabia, y las islas de Mauricio, Reunión, y Madagascar (Bastianel *et al.*, 2005). A causa de esta enfermedad en Asia se tenían 50 millones de árboles de cítricos infectados; en la década de los 60 murieron unos 3 millones de árboles en Indonesia, unos 10 millones en África del Sur, y en Arabia Saudita todos los naranjos y mandarinos murieron como consecuencia del HLB (Duran y Moreno, 2000).

El primer reporte de la presencia del HLB en el Continente Americano se hizo en marzo de 2004 en Araraquara, Brasil (Bové and Ayres, 2007). En México se tuvo la primera muestra positiva al HLB en julio de 2009 en el estado de Yucatán, diseminándose posteriormente a Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche y Colima (NAPPO, 2009).

El agente causal del HLB es una alfa-proteobacteria no cultivada (Bastianel *et al.*, 2005), Gram negativa restringida al floema de la planta, y que prácticamente

todas las especies de cítricos son sensibles a esta enfermedad. La bacteria del HLB pertenece al género *Candidatus Liberibacter* del cual se conocen tres especies, “*Ca. L. asiaticus*” reportada por primera vez en los países Asiáticos y presente también en Brasil y Estados Unidos (Florida), “*Ca. L. africanus*” presente en los países Africanos, y “*Ca. L. americanus*” presente en Brasil (Bové, 2006).

Las bacterias responsables del HLB son transmitidas de un árbol a otro por los insectos psílidos vectores *Diaphorina citri* (Kuwayamaa) en Asia y América, y *Trioza erytreae* en África, y prácticamente no se conoce cura excepto el uso de material libre de la enfermedad (Bové and Ayres, 2007).

Como no se ha tenido éxito en el cultivo de la bacteria, una prueba biológica que detecta el HLB es la inoculación por injerto de plantas obtenidas de semilla de naranjo dulce, pero para que el resultado sea fiable se debe hacer en un número suficiente de plantas. La observación al microscopio electrónico por mucho tiempo fue el único método de diagnóstico de la enfermedad (Duran y Moreno, 2000). Las técnicas moleculares estuvieron disponibles en los años noventas con las cuales se pudo caracterizar a los organismos en los niveles filogenéticos y taxonómicos (Bové y Ayres, 2007). En 1996 fue desarrollado un método de detección, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basado en la amplificación del operón 16S ribosomal, el cual ha sido eficiente y extensivamente usado para la detección de las especies de *Liberibacter* en los diferentes países donde la enfermedad está presente (Hocquellet *et al.*, 2000).

1.1. Objetivos

Objetivo general:

Implementación de la técnica de PCR para la detección e identificación de los agentes microbianos del género “*Ca. Liberibacter* sp. asociados con la sintomatología de la enfermedad enverdecimiento de los cítricos y su aplicación en plantas del noreste de México.

Objetivos particulares:

1. Determinar los oligonucleótidos y las condiciones de amplificación más adecuadas para la detección de fragmentos específicos de ADN de los agentes causales de la enfermedad enverdecimiento de los cítricos, “*Ca. Liberibacter asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*”.
2. Determinar la presencia de la enfermedad HLB en árboles de cítricos en los estados de Nuevo León y Tamaulipas.

1.2. Hipótesis

Los agentes causales del HLB, “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*” se encuentran presentes en las plantaciones de cítricos del noreste de México, y es posible detectarlos mediante la amplificación de ADN por PCR con primers específicos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de los cítricos en México

Los cítricos son uno de los cultivos de mayor importancia económica en México, importancia que se refleja en la estadística de producción agrícola del 2008, en donde se reportaron 1,922,592 tons de limón cosechadas en 151,267 has; y 4,297,238 tons de naranja en 344,686 has (SIAP; 2008). La superficie total de cítricos en México es de 523,505 has, predominantemente de naranja y limón, especies que ocupan 61.7% y 26% de la superficie respectivamente. En el estado Nuevo León se cultivan alrededor de 25,445 has plantadas principalmente con naranja tardía (*Citrus sinensis* L. Osb.) y en menor porcentaje naranjas tempranas. Además se tiene toronja (*Citrus paradisi* Macfad) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) (Almeyda-León y López, s/f).

2.2. Enfermedades de los cítricos

El adecuado crecimiento de los cultivos de interés comercial, así como también su rendimiento, es de vital importancia para los productores (Agrios, 1995), sin embargo, las enfermedades en los cultivos son un obstáculo con el que tienen que enfrentarse los productores día con día. Se estima que las pérdidas provocadas en los cultivos a nivel mundial solamente por las enfermedades es del 14.1 %,

umentando el porcentaje a 36 % al tomar en cuenta, además, las pérdidas por insectos y malezas (Agrios, 2005).

Las enfermedades pueden ser causadas por organismos vivos tales como bacterias, fitoplasmas, hongos, nematodos, virus y viroides (Timmer, 2002). Algunas enfermedades son de gran importancia por su alcance destructivo como el virus de la tristeza de los cítricos, que causó epifitias en Brasil con el resultado de diez millones de árboles muertos, en Venezuela seis millones, Argentina 18 millones y España 35 millones; con brotes recurrentes en la Florida desde 1957 y grandes pérdidas también en Israel (Peña *et al.*, 2007).

El huanglongbing (HLB), enfermedad causada por las bacterias del género "*Candidatus Liberibacter sp.*", es probablemente la enfermedad más destructiva de los cítricos, mucho más seria que la tristeza y representa una amenaza para las regiones libres de esta enfermedad, ya que prácticamente todas las especies de cítricos comerciales son susceptibles al HLB. Como todavía no se conoce cura para esta enfermedad, se tienen que destruir los árboles infectados y reemplazarlos por otros libres de la misma (Bové, 2006).

El chancro es una enfermedad provocada por la bacteria *Xantomonas campestris* pv. *citri*, que a pesar de regulaciones cuarentenarias se ha diseminado a varios países, provoca la caída de frutos, y por los síntomas que produce en el fruto se deprecia el valor comercial como fruta fresca. Otra enfermedad importante es la mancha bacteriana causada por varias cepas distintas de *Xantomonas campestris*

pv. *citrumelo*, que a pesar de los esfuerzos por erradicarla, provocó la muerte de varios millones de árboles de vivero desde mediados de los años 80's a mediados de los 90's en Estados Unidos (Timmer, 2002).

Entre las enfermedades provocadas por hongos se encuentran la pudrición negra de la raíz causada por *Thielaviopsis basicola* (Berk. y Broome), y el marchitamiento por *Fusarium* (Timmer, 2002).

A nivel mundial, se relacionan más de 40 especies de nematodos con el cultivo de los cítricos, sin embargo no todas reducen su productividad. El más extendido es *Tylenchulus semipenetrans* el cual causa decaimiento gradual al árbol causando el mayor problema en la replantación (Timmer, 2002).

2.3. Huanglongbing

2.3.1. Historia y distribución

El HLB, a la cual se le llamó en un principio enfermedad del enverdecimiento de los cítricos, ha demostrado ser una de las enfermedades más severas de los cítricos en Asia, África, la península de Arabia, y las islas de Mauricio, Reunión y Madagascar (Bastianel *et al.*, 2005).

Esta enfermedad ha sido estudiada desde el año 1929, en las zonas más frías sudafricanas que producen cítricos; en donde se encuentran los reportes de los

primeros síntomas y que en un principio pensaron que el HLB era causado por un virus nombrándole Yellow Branch Disease (Miguel y Stefanova, 1999).

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

El primer reporte en el continente Americano de HLB fue en marzo de 2004, en donde los síntomas de esta enfermedad fueron reconocidos en árboles de naranja dulce, cerca de la ciudad de Araraquara en el Estado de San Paulo, Brasil en donde se comprobó la presencia de una nueva especie del agente de HLB, al cual se le ha propuesto el nombre "*Candidatus Liberibacter americanus*" (Texeira *et al.*, 2005).

La enfermedad enverdecimiento de los cítricos (HLB), se ha estado diseminando a varias partes del mundo a partir del continente asiático en donde provocó las primeras grandes pérdidas económicas a los productores de cítricos locales de aquella entidad. Por razones aún no definidas, ésta enfermedad tuvo una propagación explosiva desde el año 2000, por lo que actualmente ha sido detectada en el continente americano, en los países de Brasil, E. U., Cuba; y en México a partir de julio del año 2009 con el primer reporte en una muestra en el Estado de Yucatán. Posteriormente se reportó el HLB en Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche y Colima (NAPPO, 2010).

2.3.2. Síntomas y daños

El primer síntoma de HLB en los cítricos es la presencia de manchas moteadas de color amarillo (razón del nombre dragón amarillo) generalmente en las hojas de una rama y que contrastan con el color normal de las hojas que no han sido afectadas, después el amarillamiento se disemina a otras partes del árbol seguido de un deterioro del mismo hasta provocarle la muerte.

La enfermedad también provoca hojas pequeñas y de posición vertical, floraciones fuertes y fuera de temporada; los frutos tienen poco amarre, se deforman, de sabor muy amargo y salado, las semillas se dañan, en algunos casos se observa el engrosamiento de las nervaduras de las hojas las cuales quedan con un aspecto corchoso. Los síntomas se pueden confundir con la falta de elementos como hierro, zinc, manganeso, calcio o nitrógeno (Almeyda-León y López, s/f; Tsai, 2006).

El floema de plantas infectadas con HLB presenta lesiones necróticas, acumulación de almidón, en el fruto pueden aparecer manchas verdes claras que contrastan con el verde normal del fruto (llamado también coloración irregular). Los síntomas de los frutos se ven en las partes donde tienen síntomas las hojas, y pueden tener diferencia de maduración en su interior, desviación de su eje y amarillamiento de sus venas. Se distingue en algunos casos, en la parte blanca de la cascara (albedo) un espesor mayor de lo normal. Si se corta el fruto longitudinalmente se detecta una coloración amarilla anaranjada en los filamentos de

la columnela, además los frutos tienen baja proporción de jugo y poco contenido de azúcar, por lo que ya no son aptos para el consumo (Alemán *et al.*, 2007).

Cuando los árboles son infectados con HLB en edad temprana degeneran al entrar en producción, y si se infectan en edad adulta, rápidamente se vuelven improductivos (Timmer, 2002).

2.3.3. Organismo causal

El agente causal del HLB es una alfa-proteobacteria no cultivada restringida a los tubos cribosos del floema, “*Ca. L. africanus*” en África, “*Ca. L. asiaticus*” en Asia (Jagoueix *et al.*, 1996) y “*Ca. L. americanus*” en América (Teixeira *et al.*, 2005a).

La bacteria “*Ca. L. asiaticus*” se detectó a un nivel muy bajo en muestras asintomáticas, pero en muestras sintomáticas se encontró por arriba de 200 veces más abundante que en plantas asintomáticas (Shankar *et al.*, 2009).

Teixeira *et al.* (2005b) y Colleta-Filho *et al.* (2005) en una investigación realizada en una región de el Estado de San Paulo, en Brasil encontraron que “*Ca. L. americanus*” asociado con la enfermedad del HLB, infecta a variedades de mandarina, tangelo y naranjo dulce; además encontraron que “*Ca. L. americanus*” predomina sobre “*Ca. L. asiaticus*”, pero también se encontraron ambas especies, “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*” en la misma planta.

2.3.4. Vectores

El agente causal del HLB se transmite desde una planta enferma a una sana por dos medios, el primero es por material vegetal infectado al extraer yemas de una planta afectada e injertarla sobre una planta sana, y el segundo medio es a través de insectos, existen dos insectos vectores para este agente, *Trioza eritreae* para “*Ca. L. africanus*”, y *Diaphorina citri* para “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*” (Ramírez, s/f; Texeira *et al.*, 2005a).

Los vectores *Diaphorina citri* (Kuwayamaa) y *Trioza eritreae* (del Guerdo) pertenecen al orden *Homóptera*, suborden *Sternorrhyncha*, familia *Psyllidae*. Son insectos de cuerpo corto y robusto (3-4 mm de longitud) de color carmelita moteado, antenas largas con puntas negras y dos manchas carmelitosas, las alas son transparentes con pocas venas y la cabeza es ligeramente carmelita para el asiático y negra para el africano (Miguel y Stefanova, 1999). Una característica que identifica a este psílido en los huertos de cítricos, es que permanece posado en un ángulo de inclinación de 45° sobre ramas y hojas de los árboles.

El psílido está establecido en el Continente Americano en Sur y Centro América, para 1994 su dispersión llegaba hasta Honduras y posiblemente llegó a México antes de 1996; fue encontrado en la citricultura de Florida en 1998, en la citricultura del Valle de Río Grande, Texas en 2001, y en México durante 2002 en los cítricos de Campeche.

En el 2003 *Diaphorina citri* fue registrada simultáneamente en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, para el 2004 la plaga se había extendido hasta los estados de Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán; durante 2006 el insecto también fue encontrado en los estados de Michoacán, Oaxaca, Sinaloa y Sonora (Almeyda-León y López, s/f). El 23 de junio de 2008 se confirmó la presencia de especímenes de *Diaphorina citri* en Tijuana, Baja California en plantas de naranja dulce y limón en una zona residencial de esa ciudad (Trujillo, 2008).

2.3.5. Diagnóstico

Como los síntomas del HLB no son únicos, la presencia del agente causal en plantas sintomáticas tiene que ser confirmada. Por mucho tiempo la única forma de detectar esta bacteria fue mediante indexado biológico en plántulas de naranjo dulce y la observación del mismo en los vasos del floema en las nervaduras centrales de las hojas, mediante el microscopio electrónico (Duran y Moreno, 2000; Timmer, 2002). También se han probado anticuerpos monoclonales dirigidos contra “*Ca. Liberibacter*” dando como resultado que varios aislados reaccionaron y otros no, lo que sugiere que existe variabilidad entre los aislados del género referido (Garnier *et al.*, 1991; Gao *et al.*, 1993).

Desde hace pocos años se han desarrollado varias técnicas precisas de diagnóstico. En la actualidad lo más común es el uso de pruebas de ADN específico y PCR para detectar los agentes causales del HLB tanto en los vectores psílidos como en las plantas con dicha enfermedad (Tsai, 2006). La prueba más usada es la

amplificación del ADN por PCR, con la cual se ha logrado la comparación de las secuencias de los ADN ribosomales 16S de microorganismos, incrementando el conocimiento acerca de la biología, diagnóstico y epidemiología de bacterias desconocidas o incultivables (Colleta-Filho *et al.*, 2005).

Para detectar las bacterias causantes del HLB se han utilizado una variedad de primers, Jagoueix *et al.* (1996) utilizaron Oi2c/Oi1 los cuales amplifican la región 16S ribosomal del ADN de “*Ca. L. asiaticus*” con los cuales obtuvieron un fragmento de 1160 pb para dos especies de bacterias asociadas con el HLB y mediante el uso de una digestión con la enzima *Xba* 1 permitió diferenciar a dos especies “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. africanus*”.

Hung *et al.* (1999) utilizaron otros primers que amplifican un fragmento de 226 pb y Liefting *et al.* (2009) mediante PCR secuencial con los primers Lib16S01F/Lib16S01R lograron un fragmento de 580 pb para “*Ca. L. sp*” en tejido de papa. En otro reporte, Hocquellet *et al.* (2000) utilizando el método de PCR-RAPD identificó genes asociados con “*Ca. Liberibacter sp.*” y diseñaron los primers A2/J5 los cuales amplifican fragmentos de dos genes, *rplA* y *rplJ*, con las tallas de 703 pb y 669 pb para “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. africanus*” respectivamente.

2.3.6. Métodos de control

Porque los métodos curativos del HLB todavía no están disponibles, el control todavía es preventivo y en gran medida está basado en la eliminación de la

presencia del inóculo quitando árboles infectados (Teixeira *et al.*, 2005a) y tratamientos químicos contra los vectores e implementar la medida de cuarentena estricta para que ya no se distribuya más el patógeno del HLB y sus vectores (Bové, 2006).

2.3.7. Hospederos

Halbert *et al.* (2003) reportaron que la enfermedad del HLB afecta a naranja dulce, mandarina, limón, toronja y otras especies de cítricos importantes.

Hung *et al.* (2000) realizó un estudio donde inoculó a “*Ca Liberibacter spp*” en cuatro hospederos probables utilizando la técnica de injerto para ver si se podía multiplicar en alguno de ellos, los resultados demostraron que la bacteria puede replicarse en *Severinia buxifolia* y *Limonia acidissima* pero no en *Murraya paniculata* var. *paniculata* ni *M. euchrestifolia*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó mediante muestreos en huertos de cítricos en diferentes localidades de los municipios de Marín, Cadereyta Jiménez, Gral. Terán, Montemorelos, Apodaca y el área metropolitana de Monterrey del Estado de Nuevo León; además en cuatro huertas del municipio de Hidalgo, Tamaulipas. Los análisis de las muestras se realizaron en el laboratorio de Ciencias Naturales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el municipio de Escobedo, Nuevo León en el periodo de enero de 2009 a julio de 2010.

3.1. Material de Laboratorio

Se utilizó el material de uso común en la mayoría de los laboratorios con algunos equipos especializados entre los que se mencionan a continuación: termociclador, microcentrífuga, cámara de electroforesis, fuente de poder, transiluminador de luz UV, cámara digital, horno de microondas, congelador, micropipetas, puntillas para micropipeta, contenedor de hielo seco, termómetro, sanitas estériles, tubos de centrifuga de 0.2 ml, 0.5 ml y 1.5 ml, agarosa, buffer TBE 0.5 X (trisma base, ácido bórico y EDTA pH 8), agua destilada, buffer de carga (0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xilencianol y 30 % glicerol en agua), bromuro de etidio 10 mg/ml, buffer de PCR 5 X, $MgCl_2$ 25 mM (Promega), desoxinucleótidos trifosfatados 2.5 mM (Promega), primers (MWG), Go *Taq* DNA polimerasa 5u/μl (Promega, U. S. A.) y agua grado Mili-Q (Sigma Aldrich).

3.2. Material de Campo

El material que se utilizó para el muestreo es similar al que usan los técnicos de la SAGARPA en la campaña nacional de detección de HLB: bolsas de plástico, bolsas de papel, bolígrafo, lápiz y marcadores permanentes, cámara fotográfica digital, cloralex^{MR} al 2 %, guía ilustrada de síntomas del HLB, hojas de papel, hielera, lupa, tabla de apoyo, tijeras de poda, toallas de papel y formatos para toma de datos (SAGARPA, 2008).

3.3. Evaluación de Primers y Condiciones de Reacción para la Amplificación de “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*”

Se adecuó la técnica PCR para la identificación del agente causal de HLB con ADN positivo utilizando primers específicos reportados en la literatura con los cuales se amplifican diferentes regiones de ADN de las bacterias (Cuadro 1).

Como controles positivos de las bacterias “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*” se utilizó ADN precipitado en etanol, el cual se obtuvo de muestras de cítricos enfermas procedentes de E.U., también se utilizaron clonas de *E. coli* con el gen 16S del ADN ribosomal y con el gen rplAJ del operón β , de cada una de las bacterias. Adicionalmente se utilizó tejido de Kumquat (*Fortunella sp*) infectado con “*Ca. L. asiaticus*” mantenido en invernadero de Valencia, España, además de tejido

de cítricos positivo a “*Ca. L. asiaticus*” de los estados de Yucatán y Jalisco, México, proporcionado por la Dirección General de Sanidad Vegetal de la SAGARPA.

Cuadro 1. Secuencias de primers usados para la amplificación de los agentes causales del HLB y el control interno de ADN.

Primer	Secuencia	Especificidad	Tm (°C)	Talla esperada (pb)	Referencia
OL1	5'-tct gtt ttc ttc gag gtt ggt gag-3'	<i>L. asiaticus</i>	70	563	
OL2	5'-acc gca aga ctc ctt acc agg aag-3'	<i>L. asiaticus</i>	74		
GB1	5'-aag tcg agc gag tac gca agt act-3'	<i>L. americanus</i>	63	1027	Teixeira <i>et al.</i> (2005)
GB3	5'-cca act taa tga tgg caa ata tag-3'	<i>L. americanus</i>	56		
Oi1	5'-gcg cgt atg caa tac gag cgg ca-3'	<i>L. asiaticus</i> <i>L. africanus</i>	66	1160	Jagoueix <i>et al.</i> (1994)
Oi2c	5'-gcc tcg cga ctt cgc aac cca t-	<i>L. asiaticus</i> <i>L. africanus</i>	66		
HungF	5'-cac cga aga tat gga caa ca-3'	<i>L. asiaticus</i>	58	226	Hung <i>et al.</i> (2004)
HungR	5'-gag gtt ctt gtg gtt ttt ctg-3'	<i>L. asiaticus</i>	59		
HLB-65	5'-tcc tga gaa tta cac aca aac-3'	<i>L. asiaticus</i>	57	1100	Tatineni <i>et al.</i> (2008)
HLB-66	5'-tct aag tct atc ctg taa ccc-3'	<i>L. asiaticus</i>	59		
A2	5'-tat aaa ggt tga cct ttc gag ttt-3'	<i>L. asiaticus</i> <i>L. africanus</i>	58	703 Las 669Lam	Hocquellet <i>et al.</i> (2000)
J5	5'-aca aaa gca gaa ata gca cga aca a-3'	<i>L. asiaticus</i> <i>L. africanus</i>	60		
Omp1218f	5'-tat cat ggc cac ggg tta tt-3'	<i>L. asiaticus</i>	58	807	Bastianely <i>et al.</i> (2005)
Omp2025r	5'-cac gcg gac cta tac cct ta-3'	<i>L. asiaticus</i>	62		
Lib16S01F	5'-ttctacgggataacgcacgg-3'	16S bacterias	62	580	Liefiting <i>et al.</i> (2009)
Lib16S01R	5'-cgtcagtatcaggccagtg-ag-3'	16S bacterias	65		
16S sent	5'-tga gaa tgg ata aga ggc tc-3'	16S cloroplast	58	315	
16S anti	5'-tgt tgt tcc cct ccc aag gg3'	16S cloroplast	64		

Todos los primers fueron sintetizados en la compañía Eurofins mwg/Operon. Los primers se evaluaron con programas de temperaturas específicos para cada par (cuadro 2) y las amplificaciones con los mismos se realizaron a partir de una mezcla con los siguientes reactivos: buffer de PCR 1 X, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 0.2 mM, primer antisentido 20 pmoles, primer sentido 20 pmoles, Go Taq^{MR} DNA polimerasa 1 unidad (Promega, Madison, Wi, U. S. A.) y ADN (aproximadamente 50 ng) de cada uno de los controles positivos. Se completó el volumen a 25 µL con agua grado Mili-Q. Los tubos se colocaron en un termociclador (Thermo) y se corrieron los programas referidos en el cuadro 2.

Cuadro 2. Programas de temperaturas usados en la evaluación de los primers para la amplificación del ADN de los agentes causales del HLB.

Primers	Paso	Temperaturas	Ciclos
Oi1/Oi2c	Primer paso	94 °C por 2 min	1
	Segundo paso	94-64-72 °C por 40"-40"-1min	40
HungF/HungR	Primer paso	94 °C por 3 min	1
	Segundo paso	94-60-72 °C por 1 min-1min-2 min	34
Lib-F/Lib-R HLB65/HLB66 OL1/OL2 Ompf/Ompr	Primer paso	94 °C por 2min	1
	Segundo paso	94-55-72 °C por 40", 40", 40"	40
A2/J5	Primer paso	94 °C por 5min	1
	Segundo paso	94-62-72 °C por 30", 30", 60"	36
GB1/GB3	Primer paso	94 °C por 2 min	1
	Segundo paso	94-54-72 °C por 40", 40", 60"	36

3.4. Ocurrencia de HLB en Árboles de los Estados de Nuevo León y Tamaulipas

3.4.1. Muestreo

Se recolectaron 107 muestras de árboles de diferentes especies de cítricos en 9 huertas en los municipios de Marín, Cadereyta Jiménez, General Terán, Montemorelos, y en lotes de traspatio del área metropolitana de Monterrey (municipios Apodaca y Monterrey) en el estado de Nuevo León; además de cuatro huertas en el municipio de Hidalgo, Tamaulipas.

En todas las localidades muestreadas se siguieron los mismos criterios de colecta que consisten en seleccionar huertas de cítricos o árboles de traspatio, siempre en número de 10, seleccionados en función de dos criterios: presencia de síntomas semejantes a los producidos por HLB y ocurrencia del vector de la bacteria, el psílido *Diaphorina citri*. siguiendo los lineamientos de la SAGARPA (2008) mediante un recorrido de una persona por un lado del árbol y otra persona por el otro lado, dando preferencia a las hileras de árboles de la periferia en el caso de huertas. Se cortaron un par de ramas del año anterior con 2-5 hojas, de preferencia de nuevo crecimiento. Se elaboró un croquis indicando la ubicación de las muestras seleccionadas en el caso de huertas (Cuadros 1A al 3A).

Una de las huertas seleccionadas se muestreó el 15 de mayo del 2009 y tenía aproximadamente 800 árboles adultos entre naranjos, pomelos, mandarinos y limones en una superficie de 6 has localizadas en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la U. A.N. L. en el municipio de Marín, N.L.

En Cadereyta Jiménez se realizó un muestreo en el huerto “El Nogal” con una plantación aproximada de 3,600 árboles de naranjo de 26 años de edad en promedio, en donde se muestrearon 10 árboles.

En el municipio de General Terán, N. L. se realizaron muestreos en dos huertas, las cuales contienen alrededor de 465 árboles en tres hectáreas y 2,150 árboles en ocho has respectivamente. Las edades referidas son de hasta 50 años con algunos de reciente reposición para la primera huerta, y de once años la segunda huerta.

En el municipio de Montemorelos, N. L. se colectaron 10 muestras de naranjo de una huerta con 2,450 árboles en 25 has aproximadamente. Las edades aproximadas de los árboles eran de 30 años.

También se realizó un muestreo de 8 árboles en el área metropolitana de Monterrey de entre los cuales se encontraban variedades de naranja y limón. En la localidad de Apodaca se colectaron once muestras de traspatio, con árboles de entre 12 y 15 años de edad, en un predio llamado las Jaras, colonia Santa Rosa.

En el Estado de Tamaulipas se muestrearon cuatro huertas de naranjo entre los cuatro y 15 años de edad, en el municipio de Hidalgo de donde se colectaron 40 muestras de 10 árboles cada huerta.

3.4.2. Extracción de ADN

A todas las muestras vegetales colectadas en las diferentes localidades y al control positivo de kumquat, se les extrajo el ADN siguiendo el método del CTAB modificado (Doyle y Doyle, 1990) el cual consiste en lo siguiente: 40 mg de nervadura central de la hoja se cortaron en pedazos pequeños colocándose en un tubo de centrifuga de 1.5 ml, después se le agregaron 400 μ L de solución amortiguadora (CTAB 2%, NaCl 1.4 mM, 2-mercaptoetanol 0.2 %, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH8). Se incubó el tubo a 60°C durante 15 minutos y se agregaron 400 μ L de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 12,000 x g durante 4 minutos, se recuperó el sobrenadante y se agregó un volumen de isopropanol frío. Después de centrifugar, se decantó y se lavó la pastilla con 400 μ L de etanol al 75%. Después de centrifugar y decantar nuevamente, se secó el tubo por inversión y se resuspendió el ADN en 25 μ L de solución TE (Tris 10 mM-EDTA 0.1 mM).

En el caso del control positivo de Yucatán, la extracción de ADN se realizó por el método de la compañía Qiagen.

Con la finalidad de estimar la calidad y cantidad del ADN extraído en las muestras de cítricos, se cargaron geles de agarosa al 1% teñido con 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio y se hizo un corrimiento del ADN por electroforesis. Se realizó una comparación de las bandas visualizadas en el gel con un perfil de ADN cuantitativo (DNA mass ladder, Promega), adicionalmente se realizó una cuantificación del ADN con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo).

3.4.3. Amplificación por PCR

Todas las muestras colectadas, fueron analizadas con diferentes pruebas basadas en PCR para detectar e identificar a los posibles agentes biológicos asociados con la sintomatología encontrada en las muestras.

Las pruebas de PCR realizadas fueron amplificaciones de fragmentos específicos a "*Ca. L. asiaticus*", "*Ca. L. americanus*", así como un fragmento del ADN del cloroplasto de las plantas.

Todas las pruebas de PCR se hicieron a partir de una mezcla de soluciones químicas con las concentraciones finales siguientes: buffer de PCR 1X, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP's 0.2. mM, primer antisentido 20 pmoles, primer sentido 20 pmoles, Go Taq^{MR} DNA polimerasa 1 unidad (Promega Madison, Wi, U. S. A.), ADN (aproximadamente 50 ng) de cada una de las muestras problema. Se completó el volumen a 25 μ L con agua grado Mili-Q.

3.4.3.1 Control interno. Para evaluar la calidad del ADN así como la ausencia de sustancias inhibitoras de la reacción, se realizó la amplificación por PCR a todas las 107 muestras problema. El fragmento blanco corresponde al gen 16S del cloroplasto de las plantas. Los primers utilizados como control interno fueron los 16S-sentido/16S-antisentido que amplifican un fragmento de 315 pb, y cuyas secuencias de bases nucleotídicas del producto se muestran en el Cuadro 1. Las muestras

fueron colocadas en un termociclador con el programa térmico también referido en el Cuadro 2.

3.4.3.2. “*Ca. Liberibacter sp.*”. El análisis de muestras para detectar el ADN de las bacterias “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*” agentes causales del HLB se hizo siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito para el control interno con la diferencia del uso de primers específicos para el gen 16S ribosomal de cada una de las especies; para “*Ca. L. asiaticus*” son Oi1/Oi2c, para “*Ca. L. americanus*” GB1/GB3, además de un PCR anidado con los primers Oi1/Oi2c seguidos de los primers Lib1601F/Lib1601R, y utilizando el programa de temperaturas descrito en el Cuadro 2.

3.4.4. Electroforesis en geles de agarosa

El producto de la amplificación de todas las reacciones realizadas por PCR fue separado por electroforesis en buffer TBE 0.5X (tris, ácido bórico y EDTA) a 64 volts por 5 minutos y 100 volts por 30 minutos aproximadamente y se observó en un gel de agarosa al 1% teñido con 0.5 µg/mL de una solución de bromuro de etidio para lo cual fue colocado en un transiluminador. Para conocer la talla de los fragmentos obtenidos en cada una de las amplificaciones, se colocó un marcador de peso molecular conocido, ladder-100 (Promega) y se comparó con los valores esperados (Cuadro1). Los resultados obtenidos fueron documentados en fotografías.

4. RESULTADOS

4.1 Comparación de Primers para PCR

Se logró la amplificación del ADN del control positivo de “*Ca. L. asiaticus*” con los primers A2/J5, Oi1/Oi2c, OL1/OL2, HungF/HungR, HLB-65/HLB-66, y Omp obteniéndose los fragmentos esperados (Fig. 1). Como se puede observar en la figura 1, los primers que amplificaron con mayor intensidad el fragmento esperado de ADN son los Oi1/Oi2c lo cual podría estar indicando que son los más sensibles de los seis pares para detectar al agente causal del HLB.

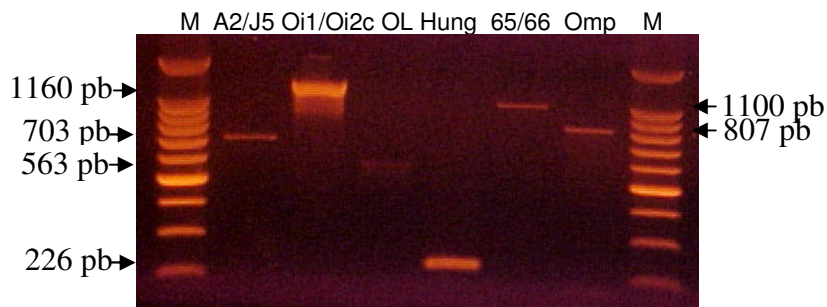


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR del control positivo HLB utilizando diferentes primers. M, Marcador de peso molecular ladder-100. Los nombres de los primers se indican en la parte superior de cada carril. Las flechas señalan los productos obtenidos con la amplificación.

Con respecto a la especie de “*Ca. L. americanus*”, se logró la amplificación del ADN de 2 controles positivos utilizados, uno de ellos es ADN de un árbol infectado y el otro es ADN plásmido con diluciones 1:1000, 1:5000 y 1:10,000. Con los primers GB1/GB3 y Lib16SF/Lib16SR se obtuvieron fragmentos definidos de 1027 y 580 pb respectivamente (Fig 2). Aquí se obtuvo una amplificación bastante clara y de buena

calidad con los dos pares de primers y con los 2 controles positivos. La muestra de ADN total muestra menor intensidad que el ADN plásmido lo cual es normal por la concentración de cada uno de ellos, sin embargo, no hubo diferencia entre las diluciones y podría ser usada cualquiera de estas. De acuerdo con una consulta electrónica realizada en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/), los primers Lib16S01F/Lib16S01R, pueden amplificar a las dos especies causantes del HLB, lo cual fue constatado con los resultados de este experimento y el anterior.

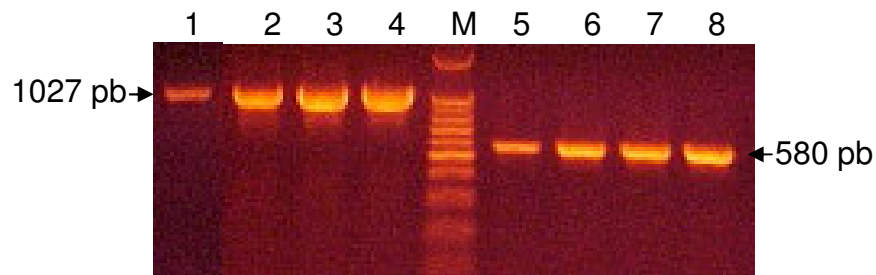


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con productos de la amplificación por PCR del control positivo “*Ca. L. americanus*”, utilizando diferentes primers y diluciones del control positivo. M, Marcador de peso molecular ladder 100; carriles 1-4, primers GB1/GB3 con los controles de ADN total (carril 1) y ADN plásmido en diluciones 1:1000, 1:5000 y 1:10,000 (carriles 2-4), y carriles 5-8 primers Lib16S01F/Lib16S01R con las mismas muestras. Las flechas señalan los productos obtenidos con la amplificación.

4.2. Ocurrencia de HLB en Árboles de Cítricos de los Estados de Nuevo León y Tamaulipas

4.2.1. Extracción de ADN

De acuerdo con la extracción de ADN por el Método del CTAB, la figura 3 muestra la fotografía de un gel de agarosa al 1% con el ADN obtenido de 10 muestras procesadas de la localidad de Marín, N. L. En general, se puede observar que en las 10 muestras el ADN obtenido es relativamente uniforme en cuanto a que se obtuvo una buena cantidad de ADN (concentración) aunque presenta algo de contaminación con ARN y ADN degradado. Sobresale la muestra 9 por su elevada concentración de ADN y la muestra 7 por su baja concentración. Al comparar la intensidad de las bandas con un marcador conocido (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen^{MR}), se estimó una concentración promedio de 25 ng de ADN/ μ L, mientras que con el espectrofotómetro Nanodrop se obtuvo un promedio de 14 ng de ADN/ μ L/40 mg de tejido fresco.

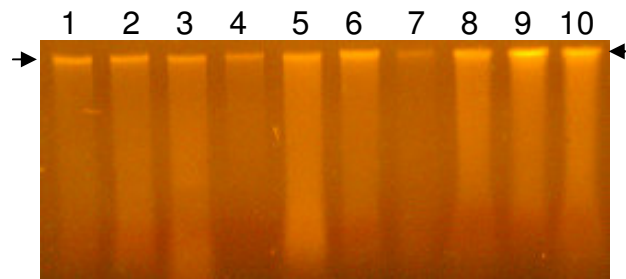


Figura 3. ADN obtenido de 10 muestras de cítricos por el método del CTAB. Las muestras fueron colectadas en la localidad de Marín, N. L. La flecha señala el ADN de cada una de las muestras.

El ADN de las 97 muestras adicionales que comprende el presente trabajo, también fue observado en geles de agarosa con resultados similares (imágenes no mostradas).

4.2.2. PCR de Control Interno

Con respecto al PCR de control interno, se logró la amplificación de un fragmento del gen 16S del cloroplasto del ADN extraído en 101 de las 107 (94.4%) muestras de hojas obtenidas de los árboles de cítricos de las localidades consideradas en el presente trabajo. En la figura 4 se pueden observar diez amplificaciones, de la huerta el Nogal de la localidad de Cadereyta, N. L., del fragmento de la talla esperada de 315 pb, para lo cual se utilizaron los primers 16S-sentido/16S-antisentido. Las amplificaciones obtenidas de las muestras son en general homogéneas y de buena calidad, lo cual se puede constatar en la figura 4 por su intensidad y nitidez en las bandas. Las imágenes del resto de las 107 muestras no se muestran en el presente trabajo.

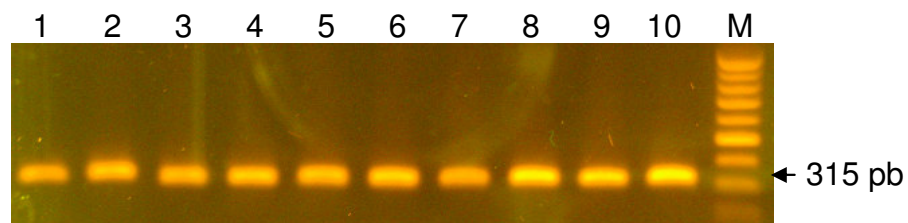


Figura 4. Productos de PCR de un fragmento del gen 16S del cloroplasto, obtenidos por la amplificación de ADN de muestras de cítricos con los primers 16S antisentido/16S sentido (carriles 1-10) y M, Marcador de peso molecular ladder 100. La flecha indica el fragmento obtenido.

En el caso de las muestras que salieron negativas estamos seguros que no se debe a falta de ADN porque de acuerdo con los resultados de la figura 1, en general se obtuvo buena cantidad. Tampoco creemos que la falta de amplificación pueda atribuirse a la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción porque las 107 muestras proceden de árboles parecidos, aunque en algunos casos son especies diferentes; más bien atribuimos la falta de amplificación a errores humanos.

4.2.3. Detección de “*Ca. L. asiaticus*”

En la figura 5 se observa la amplificación de un fragmento, con primers específicos Oi1/Oi2c, del gen 16S del ADN de la bacteria “*Ca. L. asiaticus*”. Puede observarse que solo el control positivo dio reacción, lo cual valida la prueba. Ninguna de las 10 muestras problema analizadas del predio “Las Jaras” de Santa Rosa municipio de Apodaca, N. L., dio reacción positiva por lo que se dictaminan libres de HLB. Es importante señalar, que hasta la fecha no existe ningún reporte de la ocurrencia de HLB en el noreste de México. Las 97 muestras restantes analizadas para esta bacteria en el presente trabajo tampoco dieron reacción con los primers señalados (imágenes no mostradas).

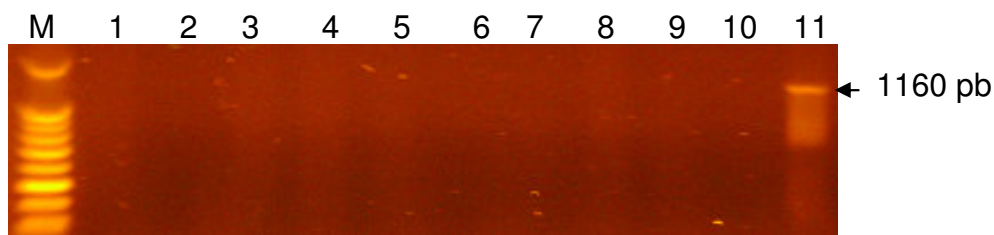


Figura 5. Amplificación de ADN de muestras de cítricos con primers específicos para “*Ca. L. asiaticus*” (Oi1/Oi2c), del predio “Las Jaras” en Santa Rosa municipio de Apodaca, N. L. M, marcador de peso molecular ladder-100, carriles 1 al 9 muestras problema, carril 10 control negativo y carril 11 control positivo. La flecha indica la posición del fragmento obtenido de 1160 pb.

4.2.4. Detección de “*Ca. L. americanus*”

Para esta especie se logró la amplificación con primers específicos (GB1/GB3) de un fragmento esperado, de 1027 pb, del gen 16S del ADN de un control positivo. En la figura 6 se observa el resultado negativo de 10 muestras de la huerta “Segobias” del municipio de Montemorelos, N. L., analizadas por PCR. En las pruebas realizadas al con las 97 muestras restantes (imágenes no mostradas) tampoco ninguna dio positivo a la amplificación por PCR para el HLB, por lo tanto también se consideran sanas para dicha enfermedad.

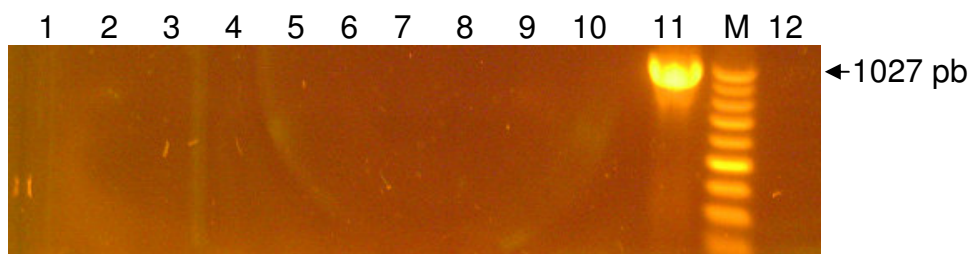


Figura 6. Amplificación de ADN de muestras de cítricos con primers específicos para “*Ca. L. americanus*”, GB1/GB3. M, marcador de peso molecular ladder 100pb, carriles 1 al carril 10 muestras problema, carril 11 control positivo y carril 12 control negativo.

Como ya se mencionó, nuestros resultados nos indican que el HLB todavía no se encuentra en el área considerada en el presente trabajo. Texeira *et al.* (2005a) señalan que en el estado de San Paulo, Brasil detectaron el HLB en una región, y que poco tiempo después se encontró en otras regiones, lo que representa una rápida diseminación de la enfermedad; algo parecido podría esperarse que ocurra en nuestro país por lo que hay que tomar las medidas pertinentes.

5. DISCUSIÓN

Los seis pares de primers evaluados en el presente trabajo fueron adecuados para la amplificación de los controles positivos de la bacteria “*Ca. L. asiaticus*” y dos pares de primers para la amplificación de ADN de la bacteria “*Ca. L. americanus*”.

De acuerdo con nuestros resultados generales, no detectamos las bacterias “*Ca. L. asiaticus*” y “*Ca. L. americanus*” en los muestreos realizados en las áreas rurales y urbanas de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, sin embargo, se recomienda implementar un programa de muestreo para tener una vigilancia constante en las áreas muestreadas en éste trabajo, así como también en aquellas dónde no se tuvo la oportunidad de realizarlo. Nuestro muestreo fue limitado en superficie y en número de muestras. También se podría considerar que el hecho de que no se detectó a éstas dos bacterias no quiere decir que no estén presentes en la región, porque “*Ca. L. sp.*” es difícil de detectar por su baja concentración y distribución irregular en los tejidos de su hospedero (Ahmad *et al.*, 2008), y al muestrear cabe la posibilidad que se haya realizado en la parte de la planta donde no se encontraba la bacteria. Tomando en cuenta el estudio que realizaron Teixeira *et al.* (2005a), en el cual se menciona que la enfermedad del HLB está presente en Brasil desde marzo de 2004 en la región de Araraquara, y cinco meses después se distribuyó ampliamente por diferentes áreas del país, se podría pensar que en nuestro país ocurriera un comportamiento similar de la enfermedad, ya que el vector *D. citri* está ampliamente distribuido. En el territorio mexicano el primer reporte de

HLB se hizo recientemente en julio de 2009 en el Estado de Yucatán, y en los 2 años posteriores se confirmó su presencia en Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche y Colima (NAPPO, 2009, 2010), por lo anterior existe la posibilidad de que la enfermedad se presente en un futuro cercano en otros estados de la República, o de que ya exista en algunas otras regiones.

6. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se llevó a cabo la presente investigación, se logró implementar un protocolo para amplificar ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de cítricos con las bacterias "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" y "*Ca. L. americanus*", asociadas con la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos o huanglongbing (HLB).

La extracción de ADN en plantas de cítricos por el Método del CTAB modificado fue satisfactoria obteniéndose una concentración promedio de 25 ng de ADN μL^{-1} 50 mg^{-1} de tejido vegetal.

Los oligonucleótidos que se seleccionaron para esta investigación fueron efectivos para la amplificación del ADN de los controles positivos, por lo tanto se determinó que son adecuados para utilizarse en la detección por PCR de las bacterias "*Ca. L. asiaticus*" y "*Ca. L. americanus*".

Después de analizar 107 muestras de cítricos sintomáticas de 10 localidades de los municipios de Marín, Cadereyta Jiménez, Apodaca y el área metropolitana de Monterrey, en el Estado de Nuevo León; así como 4 huertas del municipio de Hidalgo, Tamaulipas, no se detectaron las bacterias "*Ca. L. asiaticus*" ni "*Ca. L. americanus*".

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1996. Fitopatología. 2a Edición. Editorial LIMUSA. 838p.
- Ahmad, K., K. Sijam, H. Habibuddin, J. Kadir, and S. O. Syed, 2008. Occurrence and Spread of *Candidatus Liberibacter Asiaticus*, the Causal Agent of Huanglongbing Disease of Citrus in Malaysia. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 4: 103-111.
- Alemán, J., H. Baños, y J. Ravelo. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad hunglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Protección Vegetal* 22: 154-165.
- Almeyda-León, I. y J. López. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental General Terán. <http://seder.col.gob.mx/Direcciones/dsanidad/difucion/DiagnosticoMoleculVTC.pdf>
- Bastianel, C., M. Garnier-Semancik, J. Renaudin, J. M. Bové, and S. Eveillard, 2005. Diversity of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*," based on the *omp* Gene Sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6473-6478.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newsly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathology* 88:7-37.
- Bové, J. M. and A. Ayres. 2007. Etiology of three recent diseases of citrus in Sao Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life*. 59: 346-354.
- Colleta-Filho, H., M. Takita, M. Targon, and M. Machado. 2005. Analysis of 16S rDNA sequences from citrus huanglongbing bacteria reveal a different "*Ca*.

- Liberibacter*" strain associated with citrus disease in São Paulo. *Plant Dis.* 89:848-852.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Duran, N. y P. Moreno. 2000. Huanglongbing (ex-Greening). *Enfermedades de los cítricos*. Editorial Mundi-Prensa. México. 52 p.
- Gao, S. J., M. Garnier, and J. M. Bove´. 1993. Production of monoclonal antibodies recognizing most Asian strains of the greening BLO by in vitro immunization with antigenic protein purified from the BLO, p. 244–249. *In* P. Moreno, J. V. da Graca, and L. W. Timmer (ed.), *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization for Citrus Virology*. International Organization of Citrus Virologists, Riverside, Calif.
- Garnier, M., S. J. Gao, Y. L. He, S. Villechanoux, J. Gandar, and J. M. Bove´. 1991. Study of the greening organism (GO) with monoclonal antibodies: serological identification, morphology, serotypes and purification of the GO, p. 428–435. *In* R. H. Brlansky, R. F. Lee, and L. W. Timmer (ed.), *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization for Citrus Virology*. International Organization of Citrus Virologists, Riverside, Calif.
- Halbert, S. E., C. L. Niblett, K. L. Manjunath, R. E. Lee, and L. G. Brown. 2003. Establishment of two new vectors of citrus pathogens in Florida. *Proc. Int. Soc. Citricult.* Orlando, Fl. 1016, 1017 p.

- Hocquellet, A., J.M. Bové and M. Garnier. 2000. Isolation of “*Candidatus Liberibacter*” genes by RAPD and new PCR detection technique. Fourteenth IOCV Conference.
- Hung, T. H., M. L. Wu, and H. J. Su. 2000. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. *J. Phytopathol.* 148:321-326
- Hung, T. H., M. L. Wu, and H. J. Su. 1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. *J. Phytopatol.* 147: 599-604.
- Hung, T. H., S.-C. Hung, C.-N. Chen, M.-H. Hsu and H.-J. Su. 2004. Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathology* 53: 96-102.
- Jagoueix, S., J. M. Bové, and M. Garnier. 1996. PCR detection of the two “*Candidatus*” liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Mol. Cell. Probes.* 10:43-50.
- Liefting, L.W., S. Veeracone, L.I. Ward, and G.R.G. Clover. 2009. First report of ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ in potato. *Plant Dis.* 93:208.
- NAPPO. 2009. Sistema de Alerta Fitosanitaria. <http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=401>, 2009 (Publicado el 15 de octubre del 2009. Consulta: 20-mayo-2010).
- Ramírez, A. Huanglongbing (HLB o enfermedad del brote amarillo). http://www.bellavista.gov.ar/bellavista/p_local/articulos/enfermedad_del_brote_amarillo.asp

- SAGARPA. 2008. Manual Técnico para la Detección y Manejo del Huanglongbing de los cítricos. 39p.
- Shankar, U., K. M. De Angelis, P. Trivedi, G. L. Andersen, S. En Lu, and N. Wang. 2009. Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected Citrus, Using PhyloChip Arrays and 16S rRNA Gene Clone Library Sequencing. *Appl. and Environ. Microbiol.* 75: 1566-1574.
- SIAP. 2008. <http://www.naranja.gob.mx/index.php?portal=naranja>. (Consulta: 26-julio-2009).
- Tatineni, S., U.S. Sagarán, S. Gowda, C.J. Robertson, W.O. Dawson, T. Iwanami, and N. Wang. 2008. In planta distribution of "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" revealed by polymerase chain reaction and real-time PCR. *Phytopathology* 98:592-599.
- Teixeira, D. C., J. Ayres. E. W. Kitajima, L. Danet. 2005. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo State, Brazil and association of a new Liberibacter Species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. *Biology Journals.* 89: p 107.
- Teixeira, D. C., J. L. Danet, S. Eveillard, E. C. Martins, W.C. De Jesus, P. T. Yamamoto, S. A. Lopes, R. B. Bassanezi, A. J. Ayres, C. Saillard, and J. M. Bové. 2005. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus*' Liberibacter species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes.* 19: 173-179.

- Teixeira, D. C., C. Saillard, S. Eveillard, J. Luc, P. Da Costa, A. Ayres, and J. M. Bové. 2005. "Candidatus *Liberibacter americanus*", associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International J. of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1857-1862.
- Timmer, L. W. 2002. *Enfermedades Causadas por Procariotas. Plagas y enfermedades de los cítricos*. Editorial Mundi-Prensa. México. 2ª edición. 49 p.
- Tsai, J. H. 2006. *Enverdecimiento de los cítricos y su vector psílido*. El texto mundial de MIP. Universidad de Minnesota.
- Trujillo, J. 2008. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=330 publicado el 31 de julio del 2008.

8. APÉNDICE

Cuadro 1A. Formato de georeferenciación de muestras

Número de muestra: _____

Primitiva de representación: _____

Longitud: _____

Latitud: _____

Error en metros: _____

Estado: _____

Municipio: _____

Localidad o población: _____

Nombre del productor: _____

Nombre de la huerta: _____

Edad de la plantación: _____

Variedad: _____

Portainjerto utilizado: _____

Fenología: _____

Superficie (ha): _____

Síntomas observados: _____

Presencia de *Diaphorina citri*: _____

Observaciones: _____

■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	12	
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	11
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	10
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	9
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	8
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	7
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	6
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	5
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	4
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1

Cuadro 3A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

Fecha:

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico						X		X		X
Presencia de psílido			X				X			
Daño por psílido	X			X		X	X			X
Caída de hojas						X				
Caída de frutos										
Inversión de color de fruto		X								
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn										
Encorchado de venas										
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas							X			
Epinastia										
Observaciones	La segunda muestra fue de fruto, el resto nervadura de hojas.									

Cuadro 4A. Síntomas de los árboles muestreados en el área metropolitana de Monterrey.

Fecha: 15-septiembre-2009

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Mosaico asimétrico								
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de frutos			X		X	X	X	
Inversión de color de fruto								
Clorosis de hierro			X					
Deficiencia Mg								
Deficiencia Mn								
Deficiencia Zn								
Encorchado de venas								
Venas amarillentas								
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X			
Epinastia	X	X	X					
Observaciones	<p>La muestra 7 se tomó de un árbol de limón y el resto de naranja. En las muestras 3, 7 y 8 se detectó clorosis asimétrica sin llegar a formar islas. Las muestras 1 y 8 fueron de Monterrey, las muestras 2 al 6 de Cadereyta Jiménez y la muestra 7 de Apodaca.</p>							

Cuadro 5A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “El Nogal” localizada en Cadereyta Jiménez, N. L.

Fecha: 17-diciembre-2009

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas										
Caída de frutos										
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn										
Encorchado de venas	X				X		X	X	X	
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X			X	X	
Epinastia	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Observaciones	<p>Poca infestación de <i>Diaphorina citri</i>, pero con demasiado daño por el vector.</p> <p>Etapas de la huerta en llenado del fruto.</p>									

Cuadro 6A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “Puente Azul” localizada en Hidalgo, Tamaulipas.

Fecha: 24-diciembre-2009

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico										
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas										
Caída de frutos										
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Encorchado de venas										
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Epinastia										
Observaciones	Poca infestación por <i>Diaphorina citri</i> pero con bastante daño por el vector en las hojas.									

Cuadro 7A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “Las Jaras” localizada en Apodaca, N. L.

Fecha: 19-enero-2010

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico										
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de frutos										
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Encorchado de venas										
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Epinastia										
Observaciones	Poca infestación de <i>Diaphorina citri</i> .									

Cuadro 8A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “La Unión”, localizada en General Terán, N. L.

Fecha: 02-marzo-2010

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico										
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas										
Caída de frutos				X						
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Encorchado de venas			X	X	X	X	X	X	X	X
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Epinastia										
Observaciones	Poca presencia de <i>Diaphorina citri</i> , pero con daño considerable en hojas adultas y brotes nuevos.									

Cuadro 9A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “El Sabinito” localizada en General Terán, N. L.

Fecha: 02-marzo-2010

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico										
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas										
Caída de frutos		X								
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Encorchado de venas										X
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Epinastia										
Observaciones	<p>Poca presencia de <i>Diaphorina citri</i>, pero con mucho daño por el mismo en las hojas.</p> <p>Fruto dañado por helada, pero en el follaje no se apreció daño por helada.</p> <p>La helada se presentó días antes del muestreo.</p>									

Cuadro 10A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “Noria de las Segobias” localizada en Montemorelos, N. L.

Fecha: 23-marzo-2010

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico										
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas										
Caída de frutos										
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn										
Encorchado de venas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Venas amarillentas					X					X
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Epinastia										
Observaciones	Ninguna									

Cuadro 11A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “El Cerro” localizada en Hidalgo, Tamaulipas.

Fecha: 30-marzo-2010

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico										
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas										
Caída de frutos										
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn										
Encorchado de venas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Epinastia										
Observaciones	Poca presencia de <i>Diaphorina citri</i> , pero con mucho daño por el vector en las hojas.									

Cuadro 12A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “Hidalgo” localizada en Hidalgo, Tamaulipas.

Fecha: 31-marzo-2010

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico										
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas										
Caída de frutos										
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn										
Encorchado de venas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Epinastia										
Observaciones	Poca presencia de <i>Diaphorina citri</i> . Daño considerable en las hojas por el vector.									

Cuadro 13A. Síntomas de los árboles muestreados en la huerta “El Desengaño” localizada en Hidalgo, Tamaulipas.

Fecha: 01-abril-2010

No. Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mosaico asimétrico										
Presencia de psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Daño por psílido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Caída de hojas										
Caída de frutos										
Inversión de color de fruto										
Clorosis de hierro										
Deficiencia Mg										
Deficiencia Mn										
Deficiencia Zn										
Encorchado de venas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Venas amarillentas										
Clorosis de hojas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Epinastia										
Observaciones	Poca presencia de <i>Diaphorina citri</i> . Daño considerable en las hojas por el vector.									