

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE INÓCULO REGIONAL DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri* EN TRES ESCENARIOS CÍTRICOLAS DE MÉXICO

ALEJANDRA DE LA ROSA ANAYA

T E S I S

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada: **Distribución de la carga de inóculo regional de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri* en tres escenarios citrícolas de México**, realizada por la alumna: **Alejandra De la Rosa Anaya**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESOR



DR. EMILIANO LOEZA KUK

ASESOR



DR. DANIEL L. OCHOA MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2016

RESUMEN
DISTRIBUCIÓN DE LA CARGA DE INÓCULO REGIONAL DE *Candidatus*
***Liberibacter asiaticus* EN *Diaphorina citri* EN TRES ESCENARIOS**
CÍTRICOLAS DE MÉXICO

Alejandra De la Rosa Anaya, Mc.

Colegio de Postgraduados, 2016

A siete años de la detección del Huanglongbing (HLB) de los cítricos en México, enfermedad causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), se han definido tres escenarios epidémicos regionales con diferente intensidad. El presente trabajo analizó la disponibilidad de inóculo en planta y su relación con la carga bacteriana en el vector, *Diaphorina citri* (Dc) (Hemiptera: Liviidae), con el fin estudiar el efecto de carga de inóculo en los procesos epidémicos regionales. En esta investigación se colectaron 665 muestras compuestas de Dc para un total de 6650 especímenes procesados, 4433 muestras compuestas de tejido vegetal obtenidas del mismo número de árboles distribuidas en 215 huertas de tres regiones cítricas: Pacífico (Colima y Michoacán), Centro-Golfo (Puebla y Veracruz) y Península de Yucatán (Campeche, Quintana Roo y Yucatán). La presencia y cuantificación de CLas se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) mediante los iniciadores HLBp (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBp (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), y la sonda (5'-AGA CGG GTG AGT AAC GCG-3').

En Colima y Michoacán, entidades con alta intensidad epidémica y con predominio de huertas comerciales de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), la concentración de CLas en vector fue muy alta con cargas máximas estimadas de 2.5×10^7 copias promedio por huerta. En Yucatán, tipificado por presencia de HLB en naranja (*C. sinensis*) y limón persa (*C. latifolia*) de traspatios urbanos y rurales, además de huertos comerciales, la carga máxima promedio fue de 5×10^6 copias. En Veracruz y Puebla, con predominancia de huertas de naranja y limón persa, la concentración fue más baja con 4×10^2 copias y 1×10^2 , respectivamente. La concentración bacteriana de muestras colectadas en los

estados con mayor intensidad epidémica se ajustaron a una versión modificada del modelo Weibull mediante el procedimiento PROC NLIN de SAS v.9.0 ®. La carga de inóculo de CLas en Dc en función de la concentración bacteriana en planta mostró una curva sigmoïdal con una tasa promedio de carga de inóculo estadísticamente similar ($p=0.05$) entre Colima y Michoacán, con $b^{-1}= 13, 599,314$ ($r^2=0.72$) y $b^{-1}= 14, 883,248$ ($r^2=0.87$), respectivamente. En el resto de los estados, debido al bajo porcentaje de muestras positivas en Dc, no se observó una clara tendencia entre la relación inóculo vector:planta por lo que el modelo no se ajustó. A nivel parcelario, el patrón espacial de la concentración bacteriana en planta y vector fue analizado con mapas interpolativos geoestadísticos con Surfer ver.10®. En siete parcelas, el patrón asociado al vector mostró un comportamiento relacionado con el patrón espacial de la concentración de CLas en planta y con el nivel tecnológico de manejo. En Colima existió una mayor carga de inóculo en la periferia (4×10^6 copias) y menor en el interior (2×10^6 copias) en una huerta con manejo tecnológico bajo. Por el contrario, se registró menor carga de inóculo en la periferia (9×10^4 copias) y mayor en el centro (1×10^5 copias) en una huerta con manejo tecnológico alto, aunque en general la carga bacteriana fue menor respecto a la de baja tecnología. En Michoacán y Veracruz, donde CLas se encuentra bajo un proceso activo de dispersión, el patrón se caracterizó por exhibir un avance del borde hacia el interior de las huertas con concentraciones en Dc de 3×10^5 y 2×10^2 copias, y 1×10^5 y 1×10^2 copias en las periferias y en el centro (resultados promedio de dos huertas), respectivamente. En Puebla las muestras de Dc fueron negativas por lo que no se conformó un patrón espacial.

Este es el primer trabajo que estudia la relación de carga de inóculo de CLas en planta y vector a nivel regional, asimismo, se hace la propuesta de un umbral de adquisición de CLas por Dc en el rango de 2,694 y 13,900 copias del gen 16S ADNr en plantas de limón mexicano.

Palabras claves: Huanglongbing, CLas, Weibull, carga de inóculo, *D.citri*.

ABSTRACT

DISTRIBUTION OF THE BURDEN INOCULUM REGIONAL OF *Candidatus Liberibacter asiaticus* INOCULUM *Diaphorina citri* IN THREE SCENARIOS OF CITRUS MEXICO.

Alejandra De la Rosa Anaya, Mc.

Colegio de Postgraduados, 2016

Seven years after the detection of Huanglongbing (HLB) of citrus in Mexico, a disease caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAS), three regional epidemic scenarios had been defined with different intensity. This study analyzed the availability of inoculum in relation to the plant and bacterial load in the vector, *Diaphorina citri* (Dc) (Hemiptera: Liviidae), in order to study the effect of inoculum burden in regional epidemic processes. In this research, 665 composite samples of Dc were collected for a total of 6,650 processed specimens, 4,433 composite samples of plant tissue obtained from the same number of trees distributed in 215 citrus orchards from three regions: Pacific (Colima and Michoacan), Central Gulf (Puebla and Veracruz) and Peninsula of Yucatan (Campeche, Quintana Roo and Yucatan). The presence and quantification of CLAS was performed by polymerase chain reaction in real time (qPCR) using the primers HLBp HLBp (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBp (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), and probe (5'- AGA CGG GTG AGT AAC GCG-3').

In Colima and Michoacan, entities with high epidemic intensity and predominance of commercial orchards of Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*), the concentration of CLAS in the vector was very high with maximum loads of 2.5×10^7 average copies per orchard. In Yucatan, typified by the presence of HLB in orange (*C. sinensis*) and Persian lemon (*C. latifolia*) in urban and rural backyards as well as commercial orchards, the average peak of load was 5×10^6 copies. In Veracruz and Puebla, with a predominance of orange orchards and Persian lime, the concentration was lower with 4×10^2 and 1×10^2 copies, respectively. The bacterial concentration of samples collected in the states with the greatest epidemic intensity were fitted to a modified version of the Weibull model using SAS PROC NLIN ® v.9.0.

The burden of inoculum of CLAS in Dc on the bacterial concentration in plant showed a sigmoidal curve, with an average statistically similar loading rate of inoculum ($p=0.05$) between Colima and Michoacan, with $b^{-1} = 13, 599.314$ ($r^2 = 0.72$) and $b^{-1} = 14, 883.248$ ($r^2 = 0.87$), respectively.

In other entities, due to the low percentage of positive samples in Dc, a clear trend between the relationships of inoculum-vector-plant was not observed so the model was not adjusted.

At plot level, the spatial pattern of concentration in plant and bacterial vector was analyzed with geostatistical interpolation maps with Surfer ver.10®. In seven plots, the pattern associated with the vector showed a behavior related to the spatial pattern of concentration of CLAS in plant and with the technological management level.

In Colima there was a greater burden of inoculum in the periphery (4×10^6 copies), and lower inside (2×10^6 copies) the orchard with low technological management. Conversely, a lower burden of inoculum in the periphery was recorded (9×10^4 copies) and higher in the center (1×10^5 copies) of orchard with high technological management, although generally lesser bacterial load was relative to low technology.

In Michoacan and Veracruz, where CLAS is under an active process of dispersion, the pattern was characterized by exhibiting an increase of edge into the orchards with concentrations in Dc 3×10^5 and 2×10^2 copies, 1×10^5 and 1×10^2 copies in the peripheries, and in the center, (average of two orchards results) respectively. In Puebla, Dc samples were negative so a spatial pattern was not formed.

This is the first work that studies the relationship between inoculum burden from CLAS in plant and vector at the regional level, likewise, a proposed is made about a threshold of acquisition of CLAS by Dc in a range of 2,694 and 13,900 copies of the gene 16S DNAr in Mexican lemon plants.

Keywords: Huanglongbing, CLAs, Weibull, burden inoculum, *D.citri*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada para la manutención durante la realización del postgrado.

Al Colegio de Postgraduados por permitirme realizar mis estudios de Maestría en sus instalaciones.

A las instancias financiadoras de la presente investigación: Proyecto FONSEC SAGARPACONACYT 2009-108591, clave 108591. Proyecto FORDECYT Clave: 2010-01-139259. Proyecto SENASICA-CESAVEP. Proyecto SENASICA-CESAVEMICH.

A la Dirección General de Sanidad Vegetal y específicamente a los Comités Estatales de Sanidad Vegetal del estado de Hidalgo, Michoacán, Puebla, Veracruz, Yucatán, Campeche y Quintana Roo por el apoyo logístico de campo.

Al Dr. Gustavo Mora Aguilera por su asesoría, planeación y dirección de esta investigación.

A mis asesores Emiliano Loeza Kuk, y Daniel L. Ochoa Martínez, por sus aportaciones y acertadas sugerencias para la conclusión de este trabajo.

A la Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa por el apoyo brindado en las instalaciones de Laboratorio de Fruticultura del Colegio de Postgraduados, Montecillos.

A todos los compañeros del grupo de investigación LANREF y CIVEFIT por su invaluable apoyo en campo y laboratorio.

A Fabiola Chávez Esquivel y Eridani García Vázquez, por su apoyo y amistad invaluable, a Mónica Rivadeneira por su gran apoyo en esta última etapa, así como a otros amigos y compañeros que estuvieron conmigo en mi estancia en esta institución.

DEDICATORIA

A Dios, por todas las bendiciones recibidas.

A mis papas, Miguel De la Rosa Sánchez y Josefina Anaya Hernández, por su amor y apoyo incondicional, quienes me han alentado a seguir siempre adelante.

A mi esposo, Rodolfo Rojas Rangel, por tu apoyo y espera, mi compañero de viaje en este andar por la vida.

A mi hijo Rodolfo Alejandro Rojas De la Rosa, mi muñeco, mi motivo para ser una mejor persona y profesionista.

A mis hermanos, Miguel y Víctor Hugo De la Rosa Anaya, con los que tuve la fortuna de compartir un hogar y momentos inolvidables.

¿Qué es la vida? Un frenesí.

¿Qué es la vida? Una ilusión, una sombra, una ficción;
y el mayor bien es pequeño;

Que toda la vida es sueño, y los sueños, sueños son.

Pedro Calderón de la Barca

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Importancia de la citricultura	3
2.2. Plagas y enfermedades de los cítricos.....	4
2.3. Antecedentes del Huanglongbing de los cítricos.....	4
2.3.1 El Huanglongbing y los escenarios cítricos en México.....	5
2.3.2. Agente causal.....	7
2.3.3. Síntomas.....	7
2.3.4. Dispersión de HLB.....	8
2.4. Vectores	9
2.4.1. Importancia de <i>Diaphorina citri</i>	9
2.4.2. Posición taxonómica	9
2.4.3. Ciclo de vida y morfología de <i>Diaphorina citri</i>	10
2.4.4. Hospederos	12
2.4.5. Dinámica poblacional.....	12
2.4.6. Hábitos	13
2.4.7. Distribución geográfica de <i>Diaphorina citri</i>	13
2.5. Factores que influyen en la adquisición y dispersión de CLas.....	14
2.5.1. Factores ambientales.....	15
2.5.2. Factores biológicos	16
2.6. Diagnóstico	17
2.6.1. Detección por PCR.....	17
2.7. Cuantificación del número de copias del fragmento objetivo.....	20
2.8. Epidemiología de la enfermedad.....	20
2.8.1. Distribución espacial	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1 Sitios de estudio	24
3.2. Muestreo regional e intraparcilario de insectos	25

3.3. Colecta regional e intraparcelaria de material vegetal.....	27
3.4. Evaluación de variables	27
3.4.1. Variables del hospedante.....	27
3.4.2. Variables de manejo	27
3.4.3. Variables de severidad	27
3.5. Manejo de muestras.....	28
3.6. Análisis molecular.....	28
3.7. Análisis de datos.....	32
3.8. Análisis espacial.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Distribución regional.....	33
4.1.1. Relación de la carga de inóculo CLas en vector:planta.	37
4.1.2. Relación de la carga de inóculo de CLas en <i>D. citri</i> con respecto a la severidad de la enfermedad.....	45
4.1.3. Relación de la carga de inóculo de CLas en <i>D. citri</i> con respecto a la brotación	47
4.1.4. Efecto del manejo tecnológico sobre la carga de inóculo de CLas en <i>D. citri</i>	48
4.2. Distribución de la carga de inóculo intraparcelario.....	49
4.2.1. Dirección de la carga de inóculo intraparcelaria.....	54
4.2.2. Estimación de un umbral de adquisición de CLas en <i>D. citri</i>	58
5. CONCLUSIÓN.....	63
6. RECOMENDACIONES	65
8. APÉNDICES	78
Apéndice 1. Número de huertos muestreados por región	78
Apéndice 2. Materiales para la colecta de insectos y material vegetal en árboles de cítricos. 79	
Apéndice 3. Método de extracción de ADN de insectos para la detección de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> empleando el Kit Axygen® (Protocolo modificado por el Área de Diagnóstico de la Dirección General de Sanidad Vegetal, 2013).....	80
Apéndice 4. Método de extracción de ADN de Dc para la detección de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> empleando Kit Wizard® SV Genomic ADN Purification System (Protocolo modificado por el Área de Diagnóstico de la Dirección General de Sanidad Vegetal).....	81
Apéndice 5. Protocolo CTAB 2% para extracción de ADN total de tejido vegetal (Doyle y Doyle, 1987. Modificado por Hernández G. LANREF., 2013. (Paso 2)).....	82
Apéndice 6. Protocolo de PCR Tiempo Real tipo Cuantitativo (Manual OIRSA- FAO, 2013.)	83

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 2.1. Distribución actual del HLB en las zonas productoras de cítricos de México (indicadas en rojo) (SENASICA, 2016).	5
Figura 2.2. Representación gráfica de la fluorescencia emitida por las sondas específicas (Taqman®).	18
Figura 3.1. A. Esquema de colecta en “T” para el muestreo regional. B. Esquema de colecta en “H” del muestreo intraparcilario. Los árboles muestreados se indican en color rojo (orientación Norte-Sur) y amarillo (orientación Este-Oeste). (*): Inicio del recorrido de muestreos.	26
Figura 3.2. A. Colecta de Dc mediante aspirador manual. B. Colecta de hojas con aclaramiento de venas. C. Apariencia general de los árboles muestreados. D. Brotes con alta infestación de Dc. E. Hojas sin síntomas de HLB. F. Emergencia de brotes en una misma rama. G. Apariencia de un árbol con síntomas. H. Ramas florales. I. Ramas con hojas mostrando aclaramiento de venas.	30
Figura 3.3. A. Secado de insectos. B. Picado de material vegetal. C, D, F, G y H. Etapas para la extracción de ADN de insectos y material vegetal.	31
Figura 4.1. Ubicación de las huertas de cítricos donde se colectaron especímenes de Dc para estimar la carga de inóculo de CLas.	33
Figura 4.2. Porcentaje relativo de muestras de Dc positivas a CLas.	37
Figura 4.3. Correlación del promedio estimado de la concentración de CLas en tejido vegetal con el estimado de la carga de inóculo de CLas en <i>D. citri</i> por huerta en los Estados de Michoacán y Colima. Datos ajustados a una concentración promedio por un insecto y una hoja a partir de las muestras compuestas respectivas.	39
Figura 4.4. Correlación de la concentración estimada de CLas en tejido vegetal y la concentración estimada de CLas en <i>D. citri</i> por huerta parcela en los municipios de Tecomán y Armería, Colima. Datos ajustados a una concentración promedio por un insecto y una hoja a partir de las muestras compuestas respectivas.	41
Figura 4.5. Correlación de la concentración estimada de CLas en tejido vegetal y la concentración estimada de CLas en <i>D. citri</i> por huerta parcela en los municipios de Michoacán. Datos	42

ajustados a una concentración promedio por un insecto y una hoja a partir de las muestras compuestas respectivas.

- Figura 4.6.** Mapas espaciales interpolados geoestadísticamente de la concentración estimada de CLas en muestras provenientes de ocho Municipios de Michoacán. A) Concentración de CLas en brotes vegetativos de cítricos. B) Carga de inóculo de CLas en Dc. **44**
- Figura 4.7.** Correlación de la severidad de HLB con la carga de inóculo de CLas (número de copias del gen ADNr 16S) estimada mediante PCR en tiempo real, A) en muestras de Dc colectadas de siete estados; B) en muestras de Dc colectadas en Colima (B.1) y Michoacán (B.2). **46**
- Figura 4.8.** Número total de brotes registrados por huerta en las cuales se realizó colectas de Dc y tejido para la estructuración de carga bacteriana. **47**
- Figura 4.9.** Frecuencias por clases de la carga de inóculo de CLas en Dc (número estimado de copias del gen 16S ADNr de CLas) colectados de huertas categorizados con manejo alto, moderado y bajo. **48**
- Figura 4.10.** Mapas geoestadísticos interpolados de la distribución de la carga de inóculo de CLas estimado con el número de copias de bacterias/ μ l en plantas y Dc en la huerta A) T19 y B) Gómez, del estado de Colima. **52**
- Figura 4.11.** Mapas geoestadísticos interpolados de la distribución de la carga de inóculo de CLas estimado con el número de copias de bacterias/ μ l en plantas y Dc de dos huertas de Michoacán (M8 y M11) y una de Veracruz (M7). **53**
- Figura 4.12.** Dirección espacial de la carga de inóculo en Dc y material vegetal de dos huertas de Colima: A) T19 y B) Gómez. Dirección espacial de la carga de inóculo en Dc y severidad en dos huerta de Michoacán: C) M8 y D) M11. **56**
- Figura 4.13.** Dirección de la carga de inóculo de CLas (número de copias del gen ADNr 16S) estimada mediante PCR en tiempo real y con respecto a los brotes observados en las huertas T19 y Gómez en el Estado de Colima y M8 y M11 en el Estado de Michoacán. **57**
- Figura 4.14.** Carga de inóculo de CLas en Dc y concentración bacteriana en material vegetal, colectadas en Colima en una huerta con manejo tecnológico bajo (T19) y manejo tecnológico alto (Gómez). **59**
- Figura 4.15.** Correlación de la concentración de bacteria en plantas y carga de inóculo en Dc, en una huerta con manejo A) bajo **60**

(T19) y B) alto (Gómez) en Colima. Graficas A y B Son proyecciones parciales de T19 y Gómez para magnificar los primeros valores positivos de CLas en planta y vector.

Figura 4.16. Frecuencia de muestras de Dc y tejido vegetal categorizada en clases de concentración a CLas detectado en la huerta T19 con bajo manejo tecnológico (A) y Gómez con alto manejo tecnológico (B).

62

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 2.1.	Superficie sembrada de cítricos del 2009 al 2014 (SIAP, 2016).	3
Cuadro 2.2.	Pérdidas productivas por región asociadas al HLB de los cítricos.	7
Cuadro 3.1.	Características de las huertas que se evaluaron intraparcelariamente.	24
Cuadro 4.1.	Valores promedios de cuantificación de CLas mediante qPCR de muestras compuestas de 10 especímenes de <i>Dc</i> por entidad federativa en tres regiones citrícolas de México. Primavera 2015.	35
Cuadro 4.2.	Carga de inóculo mínima y máxima estimada de CLas en material vegetal y <i>D. citri</i> promediadas por entidad federativa de muestras positivas. Primavera 2015.	35
Cuadro 4.3.	Muestras positivas y negativas de CLas en <i>Dc</i> por entidad federativa.	36
Cuadro 4.4.	Parámetros ajustados del modelo de Weibull e intervalos de confianza a $p=0.05$ asociados a las curvas de la relación de la carga de inóculo de CLas en <i>D. citri</i> con respecto a la concentración en planta. Datos promediados por entidad federativa.	40
Cuadro 4.5.	Parámetros ajustados del modelo de Weibull e intervalos de confianza a $p=0.05$ asociados a las curvas de la relación de la carga de inóculo de CLas en <i>D. citri</i> con respecto a la concentración en planta. Datos promediados por municipio de Colima y Michoacán.	43
Cuadro 4.6.	Relación mínima entre el número de copias de CLas entre planta y vector para la ocurrencia de una adquisición exitosa por <i>Dc</i> obtenidos de una huerta con bajo manejo tecnológico (T19) y alto manejo tecnológico (Gómez) en Colima.	61

1. INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing (HLB) es una enfermedad de los cítricos causada por las bacterias *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) y *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf), las cuales colonizan los tubos cribosos del floema lo que provoca su obstrucción y finalmente un fuerte deterioro fisiológico de los árboles. Estos patógenos se transmiten por *Diaphorina citri* (Hemíptera: Liviidae) y *Trioza erytreae* (Hemíptera: Triozidae) (Bové, 2006). En México la bacteria se detectó por primera vez en julio del 2009 en la localidad del Cuyo, Yucatán y en diciembre del mismo año en Nayarit y Jalisco. A partir de esas fechas se ha detectado en 22 estados del país (SENASICA, 2016). Hasta el presente únicamente se tiene la presencia de CLas y *D. citri* en México.

Yang *et al.* (2006) sugieren que *D. citri* se dispersó del continente asiático hacia otras regiones, principalmente a países tropicales y subtropicales. En América, se detectó en los 1940's en Brasil, posteriormente en EUA, México, Belice, Costa Rica, el Caribe y América del Sur (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013). En México, el insecto se detectó en 2002. A la fecha se encuentra disperso en todo el país (López-Collado *et al.*, 2013).

En México, aunque CLas y *D. citri* se encuentran presentes en varios estados no se observan los mismos escenarios epidémicos. De acuerdo con Gottwald (2010) las tasas de aumento y progreso de HLB son influenciados por: 1) las características de los hospedantes (edad, especies predominantes y manejo agronómico), 2) factores ambientales, 3) el vector (variabilidad genética, distribución local y regional) y 4) el patógeno (diferencia en la carga de inóculo en el vector y hospedante, incremento de la fuente de inóculo y variabilidad genética). En México los escenarios epidémicos se han definido por más de 10 variables, entre las que destacan índice de generaciones potenciales de *D. citri*, índice de susceptibilidad relativa de hospedantes, abundancia cítrica, proximidad de foco, entre otros (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a, 2014b; Salcedo *et al.*, 2010). Fagen *et al.* (2012) observaron variación en la cantidad de CLas en el interior de *D. citri* e indican que dicha variación está involucrada en la transmisión y dispersión de la enfermedad. Así mismo, Mora-Aguilera *et al.* (2014b) mencionan que la cantidad del inóculo tiene implicación en el comportamiento temporal (velocidad epidémica) y

espacial (distancia de dispersión) de una epidemia e infieren que ésta influye en la intensidad de los escenarios epidémicos de HLB presentes en el Pacífico donde se observa la mayor intensidad y la Península de Yucatán, que a pesar de ser la región donde se detectó por primera vez, se mantiene con baja intensidad. Al respecto, Coy *et al.* (2015) encontraron diferencias de concentración bacteriana en el vector en el sur de Florida e indican que la tasa de CLas en *D. citri* no es homogénea en la región, a pesar de que el HLB está generalizado en todo el Estado.

Actualmente, debido a la usencia de métodos de control efectivos en la eliminación de la infección bacteriana, la opción generalizada para mantener la productividad de los árboles enfermos es la aplicación de tratamientos nutrimentales o inductores de resistencia para reducir los síntomas y el manejo intensivo del insecto (Coy *et al.*, 2015). Una de las estrategias para contener esta enfermedad es el manejo regional de poblaciones del insecto (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b); sin embargo, el control del insecto es costoso y difícil (Yang *et al.*, 2006), por esta razón, conocer el comportamiento de la carga de inóculo en *D. citri* y su distribución en las huertas es esencial para la comprensión de la epidemiología de la enfermedad, y por ende, para proporcionar herramientas que refuercen las estrategias de manejo ya existentes con el menor impacto ambiental y desarrollo de resistencia a los insecticidas empleados.

El presente trabajo tuvo como objetivo medir la cantidad de bacteria (CLas) en *D. citri* en tres regiones citrícolas de México: Pacífico, Península de Yucatán y Centro-Golfo, en los cuales se han observado escenarios epidémicos de alta, media y baja intensidad con el fin de estimar la carga de inóculo; así como, determinar la distribución espacial del inóculo en el insecto y planta dentro de las huertas con infección natural de CLas. La hipótesis propuesta fue que la carga de inóculo de CLas en *D. citri* está directamente relacionada con la intensidad regional del HLB.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia de la citricultura

China y Brasil son los principales países productores de cítricos a nivel mundial, seguidos por EUA y España. México pertenece al grupo de los países líderes, ubicándose como quinto productor en el mundo, para el conjunto de cítricos (FAO, 2012; FAO, 2014), y primer lugar en la producción de limones y limas (Ramírez-Abarca *et al.* 2008).

La superficie cultivada de cítricos en México es de 565 mil 664 hectáreas, generando una producción estimada de 7, 613,105 toneladas (2015; SIAP, 2016). El cítrico con mayor producción es naranja (*Citrus sinensis*), 4, 533,428 ton; seguida por limón persa y mexicano (*Citrus latifolia* y *Citrus aurantifolia*, respectivamente), 2, 187,257 ton; toronja (*Citrus paradisi*), 424,678 ton, y mandarina (*Citrus reticulata*), 297,326 ton. El 59% de la superficie de cítricos corresponde a naranja, 30% a limón mexicano y limón persa, y el resto a mandarinas, toronjas, tangerinas, tangelo y limas. Entre 2009 y 2014 no se ha observado una variación en la superficie sembrada de cítricos (Cuadro 2.1). En 2014, se reportó una derrama económica generada por la producción de cítricos de 17 mil 311 millones 718 mil 180 pesos (SIAP, 2016).

Estos frutales se cultivan en 29 estados de la república, aunque el 75% se concentra en Veracruz, San Luis Potosí, Michoacán, Tamaulipas, Colima y Nuevo León (Salcedo *et al.*, 2010).

Cuadro 2.1. Superficie sembrada de cítricos del 2009 al 2014 (SIAP, 2016).

Cultivo	Superficie sembrada (Ha)					
	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Naranja	339,423.51	339,389.04	335,471.72	333,073.77	334,658.68	334,849.15
Limón	146,273.92	153,442.62	166,580.41	166,515.94	169,522.02	171,608.80
Mandarina	19,156.65	19,011.82	20,103.45	22,396.63	24,418.12	21,550.42
Toronja (Pomelo)	18,466.60	18,520.22	18,575.56	18,223.60	17,807.99	18,050.96
Tangerina	15,837.50	16,165.50	13,219.75	12,733.50	12,770.50	12,692.50
Tangelo	-	-	4,680.50	4,970.50	5,037.00	5,060.00
Lima	1,428.25	1,372.25	1,512.24	1,563.56	1,610.47	1,672.16

2.2. Plagas y enfermedades de los cítricos

Mundialmente, los cítricos son afectados por enfermedades causadas por diferentes patógenos como hongos, procariotes, nematodos, virus y viroides, los cuales reducen su rendimiento, la calidad del fruto, e inclusive ocasionan su muerte (Iftikhar *et al.*, 2014). La tristeza, una de las enfermedades más importantes de los cítricos, es ocasionada por el *Citrus tristeza virus (Closteroviridae)*, considerada una de las más devastadoras. Entre las enfermedades de origen bacteriano, se encuentra el cancro de los cítricos (*Xanthomonas citri*); clorosis variegada (*Xylella fastidiosa*), transmitida por cicadélidos y cercópodos (Hemíptera); y el HLB causado por CLas, CLam y CLaf cuyos vectores son *Diaphorina citri* y *Trioza erytreae*. Stubborn (*Spiroplasma citri*) y *Candidatus Phytoplasma*, ocasionadas por un espiroplasma y un fitoplasma, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2008).

La diversidad citrícola del país se encuentra amenazada por plagas y patógenos causantes de enfermedades de importancia económica y cuarentenaria, como el Huanglongbing, cancro de los cítricos, leprosis y la tristeza de los cítricos (Sandoval-Rincón, 2011). Sin embargo, el HLB es probablemente la enfermedad más seria de los cítricos, y esto representa una seria amenaza para las regiones aún libres de la enfermedad (Bové, 2006).

2.3. Antecedentes del Huanglongbing de los cítricos

El HLB es una enfermedad destructiva que se ha convertido en una amenaza para la industria citrícola del mundo y está invadiendo lentamente nuevas zonas donde se cultivan cítricos (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; Bové, 2006; Filho *et al.*, 2016). Es transmitida por dos insectos vectores, los insectos *Trioza erytreae* y *Diaphorina citri* (Jagoueix *et al.*, 1994). A pesar de su importancia poco se sabe de las características de esta enfermedad en términos de la interacción patógeno-planta y su manejo (Filho *et al.*, 2016).

El primer registro de HLB se realizó en India en el siglo XVIII. Posteriormente en China en el siglo XIX y en Sudáfrica, en la década de los 1920's. Actualmente, se encuentra ampliamente diseminada en Asia y en el sur y oriente de África (Da Graca, 2008). En el continente Americano se detectó en dos grandes regiones productoras de cítricos, el Estado de Sao Paulo, Brasil, y en Florida, EUA, en 2004 y 2005, respectivamente (Bové, 2006). Posteriormente en Cuba, República Dominicana, Belice y México.

En México se detectó por primera vez en julio 2009 en la localidad El Cuyo, Municipio de Tizimín, Yucatán. En noviembre del mismo año, se reportó un nuevo foco en los estados de Jalisco y Nayarit (Trujillo-Arriaga, 2010). Actualmente, la enfermedad se encuentra presente en 391 municipios de 22 de los 24 estados que cultivan cítricos en el país (SENASICA, 2016).

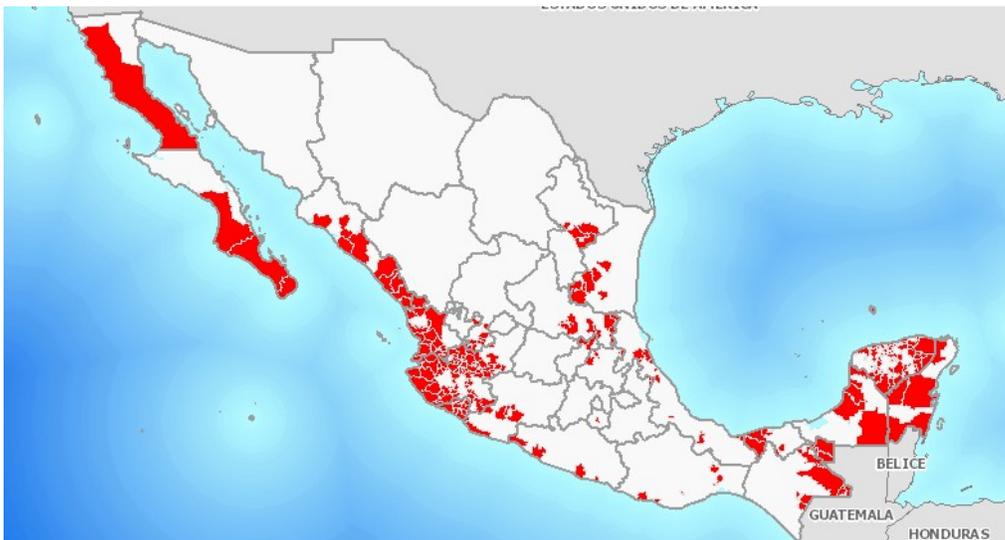


Figura 2.1. Distribución actual del HLB en las zonas productoras de cítricos de México (indicadas en rojo) (SENASICA, 2016).

2.3.1 El Huanglongbing y los escenarios citrícolas en México

Ante la llegada del HLB a México, se esperó que las especies más susceptibles fueran los cítricos dulces de acuerdo a las experiencias en Brasil, EUA y Asia, entre otros (Gottwald *et al.*, 2007; Bové, 2006). Sin embargo, los niveles de intensidad de HLB han sido variables entre regiones y especies citrícolas predominantes en éstas, siendo los cítricos agrios, hasta el momento, los principales afectados por la enfermedad (Esquivel-Chávez, 2016; Flores-Sánchez, 2016; Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Esquivel-

Chávez *et al.*, 2012). Los escenarios epidémicos de HLB en México varían en función de la inductividad diferencial regional, principalmente el clima y la estructura de hospedantes citrícolas en relación a susceptibilidad al patógeno, superficie sembrada y presencia de focos regionales de la enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b; Salcedo *et al.*, 2010).

La susceptibilidad de las especies influye en la dispersión y severidad de la enfermedad (Cuadro 2.2). En la región de la Península de Yucatán, la mayor superficie establecida corresponde a naranja y limón persa, y existe una marcada influencia de traspatios urbanos y rurales; en la región Centro-Golfo se encuentra naranja y limón persa; mientras que en la región Pacífico existe mayor diversidad de especies agrias, limón mexicano y persa (SIAP, 2016). De acuerdo a la evaluación realizada por Salcedo *et al.*, 2010, Veracruz, Colima y Michoacán son consideradas entidades de alto riesgo epidémico y de impacto comercial. Mientras que la península de Yucatán constituye una región de riesgo epidémico pero de bajo impacto económico (Salcedo *et al.*, 2010). Estudios recientes confirman la vulnerabilidad de Colima y Michoacán con pérdidas hasta del 62.7 y 36.7 %, respectivamente, en huertos con baja tecnificación (Flores-Sánchez *et al.* 2016).

La dispersión de la enfermedad en la Península de Yucatán ha sido más lenta a pesar de tener el primer reporte histórico, lo cual supondría un proceso más rápido. Sin embargo, la enfermedad en la región del Pacífico tuvo mayor rapidez de dispersión y en cuatro meses alcanzó los mismos niveles e incidencia que en Yucatán (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; SENASICA, 2016). Lo anterior, indica que la región del Pacífico es la más afectada por HLB, debido a la presencia y continuidad espacial de las especies susceptibles y a factores como la cronicidad (asociación permanente y sistémica de un agente infeccioso) de la enfermedad en planta, carga de inóculo, tanto en la planta como en el vector, y al manejo (Flores-Sánchez, 2016; Flores-Sánchez *et al.*, 2013). En Puebla y Veracruz a pesar de las detecciones de CLas, aún no se han encontrado síntomas de HLB, condición atípica, por lo que la enfermedad guarda una condición asintomática (López-Bautista *et al.*, 2016; Martínez-Bustamante *et al.*, 2016; López-Bautista *et al.*, 2015; SENASICA, 2016).

Cuadro2.2. Pérdidas productivas por región asociadas al HLB de los cítricos.

Escenario	Especie predominante	Pérdidas	Referencias
Pacífico (Colima – Michoacán)	Limón mexicano	60-80%	Robles-González <i>et al.</i> , 2013.
Península de Yucatán	Limón persa	17.3%	Flores-Sánchez <i>et al.</i> 2015
Centro-Golfo (Puebla-Veracruz)	Naranja y limón persa.	--	SENASICA,2016

2.3.2. Agente causal

La enfermedad conocida como HLB o enverdecimiento de los cítricos es originada por tres bacterias gram negativas, no cultivables, restringidas al floema, del género *Candidatus Liberibacter*, miembro de la subdivisión α -Protobacteria. *Candidatus Liberibacter asiaticus*, tolerante al calor, es la especie de mayor prevalencia en Asia, así como en el hemisferio occidental; *Candidatus Liberibacter africanus*, sensible al calor, localizada en el este y sur de África; *Candidatus Liberibacter americanus*, no es tolerante al calor y sólo se ha encontrado en el Estado de Sao Paulo, Brasil (Jagoueix *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 2004; Manjunath *et al.*, 2008; Santivañez *et al.*, 2013; Manjunath *et al.*, 2015), actualmente altamente suprimido por aparente competencia con CLas (Rui P. Leite. IAPAR, Brasil. Comunicación personal).

2.3.3. Síntomas

Los síntomas del HLB son variados y pueden asociarse a otros desórdenes; sin embargo, existen algunos aspectos característicos. El moteado en las hojas es el síntoma más distintivo, se presenta en un patrón asimétrico respecto a la nervadura central. En los árboles, en algunos casos se presenta una distribución sectorial de los síntomas, es decir, partes del árbol se mantienen asintomáticos, mientras que otras muestran brotes amarillos. También es posible encontrar deformación y enverdecimiento de fruto (Halbert y Manjunath, 2004; Gottwald *et al.*, 2007). Esquivel-Chávez (2016) y Esquivel-Chávez *et al.* (2012) observaron los siguientes síntomas foliares en limón mexicano y limón persa: inicialmente punteados cloróticos dispersos, posteriormente manchas angulares asimétricas, moteado difuso, aclaramiento, engrosamiento y acorchado de la nervadura central, y finalmente amarillamiento

generalizado del dosel del árbol. Mientras que en naranja dulce observaron moteado difuso, aclaramiento de nervaduras y amarillamiento tenue generalizado de las hojas. Los síntomas de HLB pueden variar con el ambiente y los árboles infectados pueden presentar menos síntomas cuando se presentan altas temperaturas durante el verano (Jeong-Soon y Wang, 2009). Recientemente en México se ha observado una condición asintomática verificada por presencia de la bacteria en planta y síntomas histológicos (Esquivel-Chávez, 2016 y Martínez-Bustamante *et al.*, 2016).

2.3.4. Dispersión de HLB

La dispersión del HLB ha ocurrido principalmente por la introducción de material vegetal infectado y por su transmisión por insectos. La introducción de material vegetal infectado ha permitido el establecimiento de la enfermedad en nuevas áreas o países. La transmisión natural está relacionada con altas poblaciones de vector y la extensión del reservorio de inóculo (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b; Gottwald *et al.*, 2007). Flores-Sánchez (2011) menciona que las enfermedades donde el patógeno es transmitido por un vector es común encontrar tasas de dispersión elevadas, con un confinamiento definido direccional al inicio (gradientes de dispersión), las cuales pierden este arreglo con el tiempo alcanzando una distribución multidireccional.

El clima es un factor importante en este proceso de dispersión e intensidad de la enfermedad, Lopes *et al.* 2013 mencionan que en São Paulo, Brasil, el HLB se ha dispersado y alcanzado mayor incidencia en las regiones con temperaturas de verano relativamente moderadas (más frescas). Guitiérrez y Ponti (2013) encontraron que la enfermedad es limitada por las bajas temperaturas, lo cual también limita a los cítricos y al insecto. En el estudio realizado por Flores-Sánchez (2011) en la Península de Yucatán, México, encontró que el HLB presenta gradientes de dispersión con diferente intensidad a partir de focos iniciales y que la direccionalidad más inductiva es posiblemente influenciada por el factor viento el cual juega un rol importante en la dispersión del *D. citri* y por lo tanto de CLAs. En el modelo de ARCO's la temperatura en conjunción con otras variables del hospedero se emplean para el cálculo de generaciones potenciales de *D. citri*, para estimar riesgos regionales a CLAs (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b; Salcedo *et al.*, 2010).

2.4. Vectores

Diaphorina citri (Kuwayama) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Liviidae) y *T. erytrae* (del Guercio) (Hemiptera: Sternorrhyncha: Triozidae) son los dos insectos reportados como vectores del Huanglongbing. *D. citri* es responsable de la transmisión de las especies asiática y americana, y *Trioza erytrae* de la especie africana (Bové, 2006; Halbert y Manjunath 2004).

2.4.1. Importancia de *Diaphorina citri*

Diaphorina citri, es la plaga de cítricos más importante en todo el mundo por su condición de vector de especies de “*Candidatus Liberibacter*” causantes del Huanglongbing de los cítricos (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013). Asimismo, provoca directamente pérdidas económicas como plaga en plantas de la familia Rutaceae, debido a los daños que ocasiona por los hábitos alimenticios de las ninfas y adultos (Alemán *et al.*, 2007). Los insectos inyectan una toxina que produce malformación en los brotes y las hojas. También afectan la fotosíntesis de los árboles debido a la excreción de mielecilla producida por las ninfas, que promueve la formación de fumagina (Chien y Chu, 1996; Tsai *et al.*, 2002). Sus efectos, sin embargo, son de menor impacto al causado por la enfermedad.

2.4.2. Posición taxonómica

De acuerdo con la clasificación propuesta por White y Hodkinson (1985) solo se consideraban seis familias en la superfamilia Psylloidea: Aphalaridae, Carsidaridae, Calophyidae, Homotomidae, Phacopteronidae y Triozidae. Posteriormente se añadieron las familias Liviidae y Psyllidae (Burckhardt y Ouvrard, 2012; Campbell *et al.*, 1994). La familia Liviidae fue reclasificada, y en ésta se incluyó a *D. citri*. Actualmente esta familia comprende 29 géneros, 317 especies y dos subespecies distribuidas en 344 hospederos; de éstos, once especies poseen preferencia por las rutáceas (García-Pérez *et al.*, 2013).

2.4.3. Ciclo de vida y morfología de *Diaphorina citri*

El ciclo de vida y características morfológicas del insecto se presentan en el siguiente recuadro. En México se ha encontrado variabilidad morfología de *D. citri*, lo que sugiere que el clima o tipo alimenticio pueden inducir cambios morfométricos. Su efecto en la condición de vector no se ha determinado (García-Pérez, 2013)

Ciclo de vida de <i>D. citri</i> (15-47 días) 10-12 generaciones por año			Cita				
			Wenninger y Hall, 2007; Grafton-Cardwell <i>et al.</i> , 2013.				
Huevos (2-4 días)	Estadios ninfales (11 a 15 días)	Adulto (4-44 días)	Hall <i>et al.</i> , 2012.				
500-800, hasta 1,900	5 instares ninfales	----	Tsai y Liu, 2000; Nava <i>et al.</i> , 2007.				
Morfología							
							Mead and Fasulo, 2011.
Características							
0.29 mm	Longitud de 0.30 a 1.60 mm		2.7 a 3.3 mm	Fonseca <i>et al.</i> , 2007; Tsai y Liu, 2000; Wenninger <i>et al.</i> , 2008.			
Ovoides con los extremos puntiagudos	Aplanadas dorsoventralmente		Quando posan el cuerpo forma un ángulo de 45°	Fonseca <i>et al.</i> , 2007; Tsai y Liu, 2000.			
Color amarillo-naranja	Color amarillo-naranja Ojos compuestos color rojo		Color marrón-gris. Abdomen gris, azul y amarillo. Ojos color rojos				

2.4.4. Hospederos

D. citri tiene preferencia por especies de la familia Rutaceae, principalmente a cítricos de importancia económica como *Citrus aurantifolia*, *C. reticulata*, *C. limón*, *C. latifolia*, *C. máxima*, *C. medica*, y *C. taiwanica* entre otros (Halbert and Manjunath, 2004). También se menciona a *Murraya paniculata* y *M. koenigii* como hospederos alternos, donde se ha observado que la oviposición, desarrollo e incremento poblacional de los insectos es similar que en cítricos (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013; Manjunath *et al.*, 2008).

2.4.5. Dinámica poblacional

Existen varios factores, bióticos y abióticos que favorecen o afectan el crecimiento y tasa de desarrollo de las poblaciones del insecto, estos factores determinan su abundancia en la naturaleza (Hernández-Fuentes, 2014). De acuerdo con Skelley y Hoy (2004), la oviposición ocurre cuando la humedad relativa está por debajo del 40%. Mientras que Tsai y Liu (2000) encontraron que las plantas hospederas tienen algunos efectos sobre el desarrollo, longevidad y reproducción. Hall (2008) menciona que las fluctuaciones de poblaciones estacionales del insecto se correlacionan estrechamente con el crecimiento de brotes jóvenes de árboles de cítricos y los incrementos de las poblaciones ocurren a finales de primavera, pero pueden presentarse en cualquier época del año, si las condiciones ambientales son favorables.

En México, Ortega-Arenas *et al.* (2013) observaron picos poblacionales de *D. citri* en febrero, marzo, abril y julio en las plantaciones de cítricos en Cazones, Veracruz, y se relacionaron los incrementos en las infestaciones del insecto con la abundancia de brotes, y éstos a su vez, con la temperatura y precipitación. En Colima, Velázquez-Monreal *et al.* (2011) mencionan que el periodo en el cual se presentó la más alta presencia de adultos de *D. citri* fue de diciembre a mayo, durante la época seca. Las mayores poblaciones de adultos y ninfas ocurrieron en una huerta joven (dos años de edad) y con poco o ningún control de plagas. En cítricos agrios su constante brotación durante el año incrementa la probabilidad de acceso-transmisión de CLAs por *D. citri*, lo que podría explicar la mayor vulnerabilidad de este cítrico en México.

2.4.6. Hábitos

Las ninfas presentan un comportamiento sedentario y forman colonias de número variable sobre tejidos tiernos y pecíolos (Fonseca *et al.*, 2007). Mientras que los adultos, tienen un comportamiento más activo, se alimentan de hojas y brotes nuevos, regularmente se le encuentra posados sobre el haz de las hojas o brotes con sus cuerpos suspendidos en un ángulo de 45° sobre la superficie de la hoja (Fonseca *et al.*, 2007; Hall *et al.*, 2012). Generalmente el insecto evade la exposición a altas temperaturas y luz solar directa.

De acuerdo con Wenninger *et al.* (2009), los machos localizan a las hembras mediante el uso de sonidos y vibraciones transmitidos a través de las hojas. Existe evidencia, que indica que las hembras emiten una feromona sexual, para atraer al macho, sin embargo, ésta aún no ha sido identificada (Wenninger *et al.*, 2008).

El apareamiento dura alrededor de 20 a 100 minutos tanto en brotes nuevos como en hojas maduras (Halbert y Manjunath, 2004; Wenninger y Hall, 2007; Grafton-Cardwell *et al.*, 2013). Las hembras son muy prolíficas y pueden ovipositar durante toda su vida, regularmente en las yemas axilares de árboles de cítricos. Además, requieren de múltiples apareamientos a lo largo de su vida con la finalidad de alcanzar un máximo rendimiento reproductivo; sin embargo esta actividad puede estar limitado por la presencia de machos (Wenninger y Hall, 2007).

2.4.7. Distribución geográfica de *Diaphorina citri*

2.4.7.1. Mundial

De acuerdo con Halbert y Manjunath (2004) se especula que la dispersión de *D. citri* inició en el suroeste asiático. Según Beattie *et al.* (2009), el origen de este insecto se ubica en India, de donde pasó a China y otros países de medio oriente. En Sudamérica se detectó en 1940 por primera vez en Brasil y después en Argentina y Venezuela. Posteriormente invadió las Antillas (isla de Guadalupe) y para 1990 se encontró por primera vez en Florida (Tsai y Liu, 2000; Halbert y Núñez, 2004).

2.4.7.2. Nacional

En México el primer reporte de *D. citri* fue en el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo. Desde entonces se ha dispersado en las principales áreas citrícolas el país. En 2003 se detectó en los estados de Nuevo León y Tamaulipas y en 2004 ya se encontraba en Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán (López-Arroyo *et al.*, 2005). En 2005 fue registrado en Sinaloa y para inicios del 2006 el insecto se localizó en Sonora y Baja California Sur. En junio del 2008 se reportó en zonas urbanas de Tijuana. En julio de ese mismo año se observó al insecto alimentándose de distintos árboles en jardines de áreas rurales del estado de Coahuila (Martínez-Carrillo, 2008). Estos datos muestran que en un periodo de seis años (2002-2008), el insecto se dispersó por todo el territorio nacional.

2.4.7.3. Parcelaria

Los patrones de movimiento y capacidades de dispersión de *D. citri* requieren estudios para comprender mejor la propagación del HLB y mejorar las estrategias de control del vector.

Dharajothi *et al.* (1989) observaron que las ninfas presentan una distribución agregada, mientras que la distribución de los adultos no tiene un patrón definido. En estudios realizados para cuantificar la dispersión de *D. citri*, se observó que las poblaciones son mayores en los árboles ubicados en las periferias de las huertas y que su densidad disminuye gradualmente hacia el centro de la misma, lo cual sugiere un efecto de borde (Boina *et al.*, 2009; Sétamou y Bartels, 2015). En México, previo al ingreso de CLas, el SENASICA realizó estudios espaciales y de muestreo en huertos de alta, mediana y bajo nivel de infestación. El efecto de borde y dispersión interna fue demostrado, posiblemente indicando que este depende de la dimensión del huerto (Hernández-Juárez *et al.*, 2008).

2.5. Factores que influyen en la adquisición y dispersión de CLas

Comprender los factores que influyen en la eficiente adquisición-transmisión de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *D. citri*, es importante para determinar las condiciones favorables para la dispersión de CLas en cítricos, así como, para

seleccionar estrategias que interfieran en estos procesos (Bonani *et al.*, 2008). La capacidad de un vector para transmitir un patógeno está determinada por su variación genética y la del patógeno, la temperatura durante el desarrollo del patógeno dentro del insecto, la cantidad disponible del patógeno, la edad del insecto y su tamaño (Shapiro *et al.*, 2014; Tabachnick, 2015).

2.5.1. Factores ambientales

De acuerdo con Cen *et al.* (2012) la adquisición de CLas por parte de *D. citri* es variable, y puede deberse a la aptitud de las plantas hospedantes y sus tejidos para la multiplicación de la bacteria y el tiempo de alimentación. Félix-Portillo *et al.* (2011) mencionan que la presencia diferencial de la bacteria en *D. citri* se pueden deber a diferentes condiciones climatológicas y geográficas; así como también a las especies hospederas de las que se colectaron los insectos.

Hill y Purcell (1995) indican que el clima puede afectar a las enfermedades transmitidas por vectores, al afectar la abundancia de estos, el restablecimiento del hospedante a la infección y a la eficiencia de transmisión del patógeno.

La dispersión de la bacteria está relacionada y fuertemente influenciada por la abundancia estacional de *D. citri*, la cual a su vez está asociada a períodos de brotación (Ortega-Arenas *et al.*, 2013). De acuerdo con Gutiérrez y Ponti (2013) las poblaciones del insecto disminuyen a medida que el follaje madura y se vuelve menos adecuado para su reproducción. Asimismo, Wu *et al.* (2015) reportan que la presencia o ausencia de brotes jóvenes tiene una influencia significativa en la selección de adultos entre hospederos infectados con HLB y los sanos. Cuando las plantas de cítricos tienen brotes jóvenes, plantas infectadas son más atractivas que plantas sanas, además los insectos permanecen más tiempo alimentándose en plantas infectadas que en sanas en condiciones similares de brotación.

Se ha observado que los adultos de *D. citri* son mayormente atraídos hacia árboles infectados con CLas y una vez que adquieren la bacteria prefieren árboles no infectados, lo cual promueve la propagación de la enfermedad (Mann *et al.*, 2012). Lo anterior debido a que el insecto es más atraído por el color amarillento de hojas con

síntomas, pero luego se traslada a los cítricos sanos, debido a una mala condición nutricional o una barrera de alimentación en los primeros (Wu *et al.*, 2015).

Bonani *et al.* (2008) reportaron que en insectos alimentados en hojas maduras no se encontró CLas, mientras que el 50% de insectos alimentados de hojas asintomáticas jóvenes fueron positivos al patógeno. Lo anterior debido a que los insectos en hojas jóvenes comenzaron una ingestión prolongada en el floema, mientras que en las hojas maduras, por tener una capa más gruesa de células fibrosas los insectos pasaron la mayor parte del tiempo con los estiletes en el parénquima.

Félix-Portillo *et al.* (2011) observaron un incremento de CLas en el vector durante los meses de diciembre a marzo y un escenario opuesto en los meses de julio, agosto y septiembre. Por lo cual sugieren que la reproducción bacteriana se ve favorecida durante los periodos de menor temperatura y menor humedad relativa.

2.5.2. Factores biológicos

Hall *et al.* (2012) encontraron que insectos portadores de CLas tienen un tiempo de generación más corto y ovipositan más huevos, lo cual favorece el incremento de grandes poblaciones de los insectos portadores. Sin embargo, Shapiro *et al.* (2014) mencionan que el patógeno puede afectar la salud y el comportamiento del vector y consecuentemente influir en la transmisión de la bacteria las plantas hospedantes.

Amar *et al.* (2011) citados por Hall *et al.* (2012) mencionan que una barrera dentro del cuerpo de *D. citri* podría reducir las tasas de transmisión de CLas ya que impiden su movimiento hacia y desde las glándulas salivales. Este factor en combinación con otros relacionados con las defensas de la plantas, condiciones ambientales y diferencias genéticas de CLas y *D. citri* podrían influir en las tasas de adquisición y transmisión del patógeno.

Pelz-Stelinski *et al.* (2010) sugieren que un adulto de *D. citri* que adquiere el patógeno es un vector limitado comparado con adultos que adquirieron el patógeno como ninfas.

Cen *et al.* (2012) señalan que la variación observada en los periodos de adquisición de la bacteria por parte del insecto puede deberse a diferencias en los protocolos

experimentales. O bien, a diversidad de las poblaciones regionales de *D. citri* o plantas hospederas.

2.6. Diagnóstico

El diagnóstico de CLas, basado en síntomas es difícil y poco fiable debido a la gran variedad de alteraciones asociadas a la enfermedad. Si bien algunos síntomas son bastante característicos, otros podrían ser confundidos con deficiencias de nutrientes (Esquivel-Chávez, 2016; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Hasta hace algunos años las investigaciones sobre HLB eran obstaculizadas por la naturaleza incultivable en medios artificiales del agente causal (Li *et al.*, 2006). Aunque éste aún no ha sido cultivado con éxito *in vitro*, se ha caracterizado filogenética y taxonómicamente mediante técnicas moleculares y tentativamente se asignó al género *Candidatus Liberibacter* (Jagoueix *et al.*, 1994; Bové, 2006). Con el desarrollo de la PCR ha sido posible la realización de un diagnóstico rápido, sensible y específico para CLas, basado en la amplificación de la región 16S del ADN ribosomal de la bacteria con diversos primers (Coletta-Filho *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

2.6.1. Detección por PCR

Se han desarrollado métodos de detección de CLas como: microscopía electrónica, ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), indexación y pruebas de PCR convencionales y cuantitativas. En los últimos años, la detección de la bacteria por PCR ha ganado popularidad debido a su sensibilidad y confiabilidad (Manjunath *et al.*, 2015). PCR es una técnica utilizada para la detección de microorganismos en poblaciones bajas en su hospedante o difíciles de cultivar o identificar una vez cultivados. Su sensibilidad, velocidad y versatilidad son factores primarios en su amplia aceptación en fitopatología, pues proporciona un método simple y confiable para amplificar exponencialmente secuencias específicas de ADN (Henson *et al.*, 1993).

PCR consta de tres pasos esenciales, desnaturalización de la doble cadena de ADN, unión por complementariedad del primer (alineamiento) al ADN de una cadena y replicación (extensión) del ADN a partir del primer, catalizada por una polimerasa

dependiente del ADN (Levitus *et al.*, 2010). Esta técnica es ahora la prueba confirmatoria principal y se utiliza rutinariamente en muchas áreas y ha aumentado el conocimiento sobre la biología, diagnóstico y epidemiología de bacterias no cultivables o desconocidas (Coletta-Filho *et al.*, 2005; Gottwald *et al.*, 2007).

La qPCR es una técnica precisa, sensible y fiable, que permite la detección de secuencias genómicas de interés en tiempo real a través de una señal fluorescente específica que mide la cantidad de ADN sintetizado debido a que la emisión de fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN formado (Levitus *et al.*, 2010). Los procesos de amplificación y detección se realizan de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior, eliminando así las etapas de procesamiento necesarias en post-amplificación del PCR convencional (Schena *et al.*, 2013).

Los fluoróforos utilizados para la amplificación del ADN son de dos tipos: a) fluoróforos con afinidad por el ADN y b) sondas específicas para fragmentos del ADN, es decir, que sólo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés (blanco) (Aguilera *et al.* 2014).

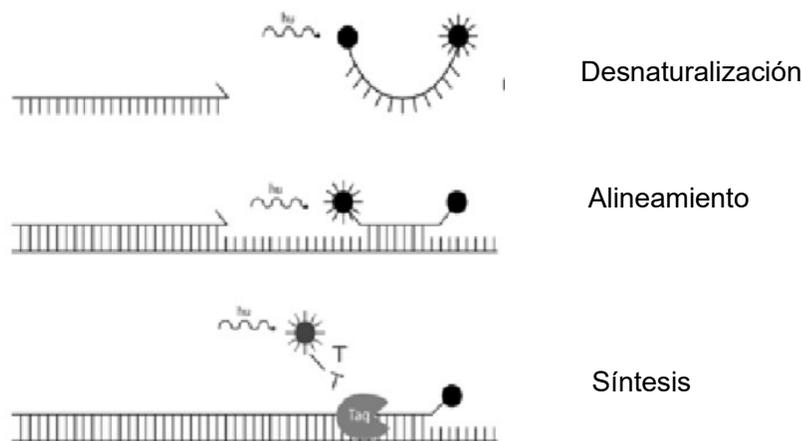


Figura 2.2. Representación gráfica de la fluorescencia emitida por las sondas específicas (Taqman®).

Cuando el reportero en el extremo 5' y su apagador se encuentran en vecindad (10 nucleótidos entre ambos) el equipo no detecta la señal emitida por el reportero. Sin

embargo, cuando la ADN polimerasa progresa sobre la cadena, ésta desplaza e hidroliza la sonda vía su actividad 5'→ 3' exonucleasa. Al separarse el apagador y el reportero se emite la señal de fluorescencia (Aguilera *et al.* 2014).

El resultado de PCR en tiempo real se visualiza en un gráfico de amplificación, en el cual se establece un valor de fluorescencia umbral que señala la zona de aumento exponencial. El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral de detección se denomina Ct (Threshold Cycle). Este punto indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral. Cuanto más ADN inicial homólogo a la sonda tenga la muestra, más rápido se alcanza este valor, pues será menor el número de ciclos necesarios (Ct) para ello (Microbial, 2009).

PCR en tiempo real aumenta la sensibilidad para la detección de CLas 10 veces en relación con PCR anidada y de 100 a 1000 veces con respecto a la PCR convencional (Texeira *et al.*, 2008; Morgan *et al.*, 2012).

2.6.1.1. qPCR para la detección de CLas

Debido a la baja concentración y distribución heterogénea de la bacteria en los tejidos de la planta y en el insecto vector, el patógeno no se detecta consistentemente hasta que se observan los síntomas en las plantas (Li *et al.*, 2006; Manjunath *et al.*, 2008). Por tal motivo, Li *et al.* (2006) desarrollaron una metodología de qPCR sensible y específica para la detección, identificación y cuantificación de *Candidatus Liberibacter*, la cual utiliza una sonda TaqMan diseñada para detectar una porción del 16S rADN de las diferentes especies de *Ca. Liberibacter*. Adicionalmente, con este protocolo se utiliza una sonda específica a un segmento del gen citocromo oxidasa de la planta (COX), como control interno. Por su parte, Manjunath *et al.* (2008) desarrollaron una metodología basada en sondas tipo TaqMan para la detección de CLas en *D. citri*, que permite detectar a CLas en la región o huerta antes del desarrollo de síntomas en las plantas.

2.7. Cuantificación del número de copias del fragmento objetivo

La cuantificación de fitopatógenos en plantas enfermas es deseable, especialmente con aquellos que están presentes en las plantas sanas o en suelos no infestados donde la enfermedad depende del incremento o decremento del inóculo (Henson *et al.*, 1993).

Mediante qPCR se puede cuantificar la concentración de ADN de CLas en una muestra a través de la construcción de una curva de calibrado estándar (Levitus *et al.*, 2010), basada en número copias conocidas de plásmido que contiene ADN de la misma, obtenida mediante una serie de diluciones. La curva se utiliza para determinar la concentración desconocida del ADN de CLas. Esto supone que el ADN del plásmido y el ADN del patógeno se comportan igual en la reacción de qPCR (Tabachnick, 2015; Microbial, 2009).

Al finalizar la PCR se representa el valor de Ct obtenido respecto a la concentración del ADN del banco de diluciones en escala logarítmica, generalmente en forma de número de copias. El valor de Ct es inversamente proporcional a la concentración de ADN (Microbial, 2009).

2.8. Epidemiología de la enfermedad

La dispersión global del CLas está asociada con el movimiento de material de propagación de cítricos, y la diseminación regional y local de *D. citri*. (Filho *et al.*, 2016). La dispersión natural de las enfermedades transmitidas por insectos parece estar relacionada con la movilidad y altas poblaciones del vector, así como con la abundancia del inóculo (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a; Gottwald *et al.*, 2006; Mukhopadhyay, 2011). Otros factores que influyen en la dispersión de este tipo de enfermedades son las condiciones climatológicas y la región geográfica donde se presentan (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b; Mukhopadhyay, 2011).

De acuerdo con Daugherty *et al.* (2009), el clima, particularmente la temperatura ambiental, frecuentemente juega un rol importante en la epidemiología de la enfermedad. Para el caso de *Xyllela fastidiosa*, se observó que la eficiencia de transmisión depende de la cantidad de la bacteria dentro de las plantas hospedantes y

ésta a su vez depende de la temperatura. Gutiérrez y Ponti (2013) indican que la epidemiología de la enfermedad también depende de la temperatura y la densidad de vectores, especialmente de los adultos que se mueven entre los hospederos. En realidad la epidemiología del HLB depende de la compleja interrelación de variables del hospedero, vector, clima y manejo agronómico, mismos que pueden integrarse para el cálculo de riesgos regionales mediante métodos multivariados o integrativos (Flores-Sánchez, 2016; Mora *et al.*, 2014b).

2.8.1. Distribución espacial

Una enfermedad se va diseminando espacialmente conforme progresa en el tiempo, dando origen a diferentes patrones de distribución en campo. La distribución al azar y agregada son los patrones más comunes en la naturaleza (Arauz-Cavallini, 1998). La distribución espacial de un patógeno está influenciada por la dirección y velocidad del viento, en particular cuando los vectores son transportados por el viento (Flores-Sánchez, 2016; Mukhopadhyay, 2011; Flores-Sánchez, 2011).

En estudios espaciales de epidemias se pueden integrar patrones espaciales y gradientes de diseminación y dispersión con el objetivo de diseñar estrategias de manejo (Mora *et al.*, 2014a). De acuerdo con Gottwald *et al.* (2006) los análisis de patrones espaciales se utilizan para comprender mejor las relaciones entre los árboles infectados y la propagación del CLas a través del vector. Sin embargo, a la fecha la transmisión de CLas por vectores a escala regional no se ha investigado exhaustivamente.

La mayoría de los estudios realizados para entender el aumento y dispersión de esta enfermedad a nivel local y regional se han realizado con base en el registro de síntomas, los cuales se han empleado para el análisis de la enfermedad a través de mapas generados de registros visuales analizados en varias escalas para determinar su patrón espacial, el aumento temporal, las relaciones entre árboles infectados a corta y a larga distancia, así como para conocer la propagación de CLas a través del vector (Gottwald, 2010). Actualmente, estudios regionales basados en cronicidad de infección y concentración bacteriana en planta y vector son más informativos que estudios parcelarios (Flores-Sánchez, 2016; Mora *et al.*, 2014b).

Mora-Aguilera (2008) menciona que una de las primeras formas de abordar la distribución espacial de las enfermedades fue a través de mapas geofitopatológicos, hasta llegar a las herramientas analíticas actuales como la geoestadística y los sistemas de información geográfica.

La dinámica espacial y temporal de HLB se ha investigado en diversos países, para establecer tasas preliminares de aumento de la enfermedad bajo condiciones endémicas con la presencia de poblaciones de vectores pero con un fuerte enfoque parcelario. En áreas donde la enfermedad es endémica y existe un gran número de fuentes de inóculo, se observan epidemias de HLB más rápidas en plantaciones jóvenes, incluso con manejo del vector (Gottwald *et al.*, 2006; Gottwald *et al.*, 2007). Mora-Aguilera *et al.* (2014b) mencionan que la disponibilidad del inóculo tiene implicación en el comportamiento temporal (velocidad epidémica) y espacial (distancia de dispersión) de la epidemia a nivel regional.

El análisis de la dispersión de CLas través del vector indica dos mecanismos de dispersión: a) dentro de áreas locales y b) a largas distancias. Dentro de las áreas locales, se producen agregaciones de árboles infectados que pueden llegar a ser grandes, formando un foco de infección principal. En este caso, los vectores diseminan al patógeno a los árboles adyacentes o cercanos. Los grupos o áreas de agregación discontinua al foco principal, indican la presencia de focos secundarios, los cuales son frecuentes y están a una distancia de aproximadamente 25 a 50 m del foco principal. Este patrón de focos espaciados puede estar asociado con el movimiento del vector en busca de nuevos sitios de alimentación o cuando son perturbados (Gottwald *et al.*, 2006; Gottwald *et al.*, 2007). Sin embargo, estudios formales de gradientes de dispersión solo se han realizado para las condiciones de México por Flores *et al.* 2016 (en prensa) demostrando el efecto de la larga distancia en función del viento.

Bassanezi (2010) señala que la tasa de progreso de la enfermedad en condiciones parcelarias depende de (i) la cantidad de inóculo disponible, y de las poblaciones de vectores, que a su vez están condicionadas con la intensidad de las medidas de control, (ii) la proximidad de fuentes de inóculo y (iii) la edad de la plantación en la primera infección. En otro estudio se encontró que la presencia de insectos portadores de la

bacteria es fundamental en las epidemias de HLB y que la reducción del inóculo en áreas grandes y el manejo del insecto influyen en gran medida en el control de esta enfermedad (Bassanezi et al., 2013). En México, el esfuerzo oficial para el manejo del HLB se ha centrado en la aplicación de estudios epidemiológicos de ARCO's o Áreas Regionales de Control del Vector (Mora-Aguilera et al. 2014b). Sin embargo, es necesario el uso de indicadores de efectividad en el control regional para optimizar esta estrategia. El conocimiento de la dinámica del vector en relación a la carga de inóculo podría coadyuvar a mejorar el modelo ARCO's.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitios de estudio

La selección de los sitios de muestreo consideró los antecedentes históricos de huertas con al menos una detección de CLas confirmadas mediante PCR, la presencia de *Diaphorina citri* (Dc) y la especie cítrica predominante en cada región: limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), limón persa (*Citrus latifolia*), naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronjo (*Citrus paradisi*) (Apéndice 1).

La colecta de Dc se realizó considerando el periodo de brotación vegetativa de los cítricos del 28 de enero al 30 de abril del 2015, en los estados de Campeche, Colima, Michoacán, Puebla, Quintana Roo, Yucatán y Veracruz. Se realizó un muestreo regional en los siete estado antes mencionados, así como un muestreo intraparculario en siete huertas ubicadas en los estados de Colima (2), Michoacán (2), Puebla (1) y Veracruz (2). En los estados de la Península de Yucatán no se realizó el muestreo mediante esta metodología, debido a la poca disponibilidad de insectos en las huertas (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Características de las huertas que se evaluaron intraparcularmente.

Estado	Huerta	Latitud	Longitud	Tipo de cítrico	Manejo tecnológico	Riego	Fertilización
Colima	T19	18.7885	-103.7851	Limón mexicano	Bajo	No	No
	Gómez	18.9130	-103.9072	Limón mexicano	Alto	Si	Si
Michoacán	M8	19.1280	-102.5110	Limón mexicano	Bajo	No	No
	M11	19.0398	-102.4423	Limón mexicano	Medio	No	No
Puebla	M1	20.1300	-97.2405	Toronjo	Medio	No	No
Veracruz	M6	20.2645	-97.3054	Limón persa	Medio	No	No
	M7	20.2661	-97.3415	Limón persa	Bajo	No	No

3.2. Muestreo regional e intraparculario de insectos

La colecta de insectos se realizó con dos metodologías. Para medir la carga bacteriana en la región, la colecta siguió un esquema en “T” (Figura 1. A) que considera el efecto bordo de las huertas, por ser la zona de mayor probabilidad de llegada de insectos, y el efecto aleatorio al interior de las mismas. En cada parcela se tomó una muestra compuesta con un mínimo de 10 Dc adultos. Los insectos fueron colectados de 20 árboles: 10 árboles ubicados en una de las orillas y de 10 árboles ubicados en el interior de la parcela. El intervalo de muestreo sistemático fue de 2 ó 3 árboles, en función del tamaño de la huerta y para abarcar la mayor superficie.

Para medir la distribución intraparcularia de la carga de inóculo se utilizó un esquema de muestreo en “H”, uno con orientación Norte-Sur y el otro en dirección Este-Oeste (Figura 1. B). Se tomó una muestra individual de 10 insectos cada 2 o 3 árboles: de 10 árboles de cada uno de los lados, así como de otros ubicados en el interior de la huerta, cuyo número varió en función del tamaño de la parcela. Al igual que en el esquema en “T”, el tamaño mínimo de muestra compuesta fue de 10 insectos adultos colectados de cada árbol. En todos los casos los insectos se colocaron en frascos de plástico con alcohol etílico al 90% (Apéndice 2).

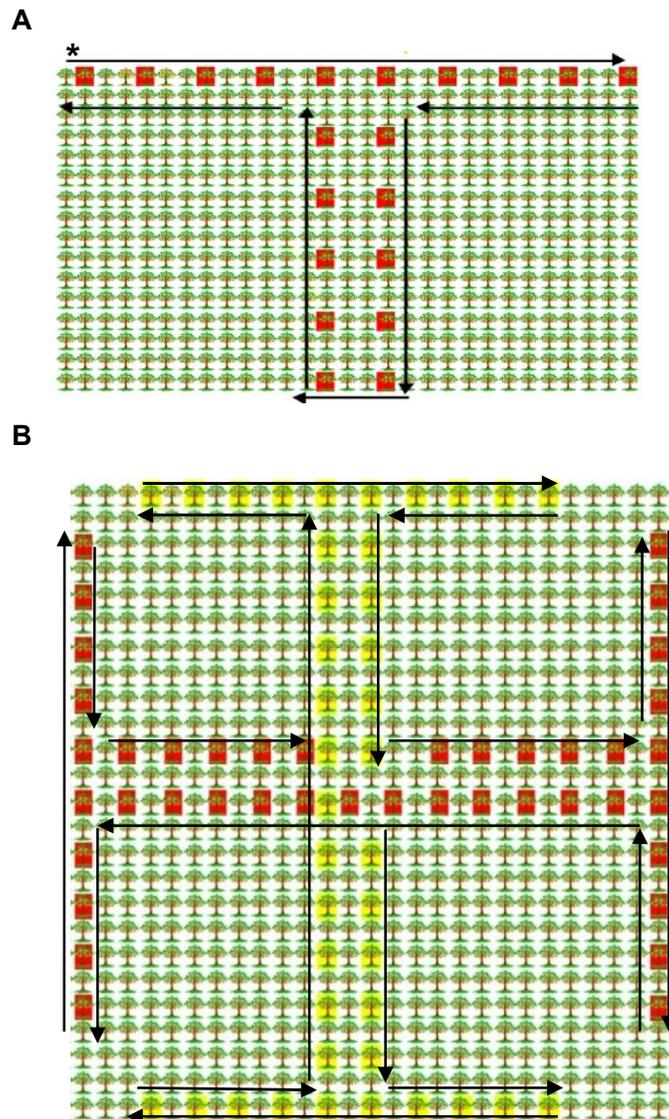


Figura 3.1. A. Esquema de colecta en “T” para el muestreo regional. **B.** Esquema de colecta en “H” del muestreo intraparcilario. Los árboles muestreados se indican en color rojo (orientación Norte-Sur) y amarillo (orientación Este-Oeste). (*): Inicio del recorrido de muestreos.

3.3. Colecta regional e intraparcularia de material vegetal

Para el estudio regional se obtuvo una muestra de tejido vegetal compuesta por huerta para detectar la presencia de CLAs. Siguiendo el esquema en “T” se colectaron ocho hojas con síntomas (dos por cada punto cardinal) de los mismos 20 árboles donde se colectaron los insectos por huerta.

En el estado de Colima, los muestreos se realizaron siguiendo el esquema en “H”. Se obtuvo una muestra compuesta de 8 hojas (dos hojas por punto cardinal) de los árboles muestreados para insectos. Las hojas se colocaron en bolsas de polipapel, se etiquetaron y colocaron en una hielera portátil para su traslado al laboratorio (Apéndice 2).

3.4. Evaluación de variables

3.4.1. Variables del hospedante

Se contó el número de brotes vegetativos con la delimitación visual de un cuadrado de 50cm x 50cm a la altura de los ojos del colector en los cuatro puntos cardinales del dosel del árbol.

3.4.2. Variables de manejo

El manejo se evaluó de manera indirecta, tomando en cuenta las prácticas agronómicas de nutrición, riego, manejo de plagas y enfermedades y la evaluación visual de del vigor y aspectos de los árboles de las parcelas muestreadas, mediante la siguiente escala:

1= baja tecnología; 2= moderada tecnología; y 3= alta tecnología.

3.4.3. Variables de severidad

Se integró el dosel de cada árbol y se asignó un valor de acuerdo a la severidad observada, mediante la siguiente escala: 0= árbol sano; 1= 25% de dosel con síntomas; 2= 50%; 3=75% y 4=100% (Flores-Sánchez *et al.*, 2015)

3.5. Manejo de muestras

Los insectos fueron conservados en frascos de plástico con alcohol al 90%, mientras que en el caso de las hojas se procedió a separar la vena principal y picarla en pequeños trozos; posteriormente se pesaron 0.1g, se colocaron en tubos eppendorf y se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento.

3.6. Análisis molecular

Extracción y dilución de ADN. Se realizó a partir de 10 adultos de *D. citri* con los kits de extracción para sangre y tejido Axygen® y Wizard® (Apéndices 3 y 4), tomando en cuenta las modificaciones realizadas a los protocolos por el Área de Diagnóstico de la Dirección General de Sanidad Vegetal. Los insectos se extendieron sobre toallas de papel para eliminar el alcohol e iniciar el protocolo de extracción.

La extracción de ADN del material vegetal se realizó con CTAB 2% y buffer salino, a partir de 100 mg de nervadura central (Apéndice 5).

La concentración y calidad del ADN extraído se determinó por espectrometría en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) y se estandarizó a 20 ng/μl.

Detección y cuantificación mediante PCR tiempo real. La reacción se efectuó en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems ®), con los primers HLBp (5'-TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG-3'), HLBbr (5'-GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG-3'), y sonda (5'- AGA CGG GTG AGT AAC GCG-3') (Li et al., 2006). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95°C por 5 s; 59 °C por 40s y 59 °C por 35s.

La cuantificación de la bacteria se realizó por el método de Li *et al.* (2006) adaptado por SENASICA-CNRF (Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria). Se generó una curva de calibración externa. Se clonó el fragmento del gen 16S ADNr en un plásmido (PGEM-T ® Promega®). El plásmido se purificó y cuantificó por uv espectrofotometría (Nanodrop 1000), posteriormente, se realizaron cinco diluciones seriadas, estas se sometieron a amplificación con dos repeticiones por concentración y se utilizó una

regresión logarítmica para estimar la concentración de CLas, la cual se expresa en número estimado de copias del gen 16S ADNr.

Se seleccionó el valor (cuantificación estimada) de las muestras cuyos Cts se encontraron dentro del intervalo [8-35]. Muestras con Cts mayores a 35 se consideraron sin confirmar o bien negativas según los estándares del equipo.

Los criterios de aprobación de la curva estándar de este trabajo fueron los que se especifican por Applied Biosystems. Los valores numéricos requeridos para la aprobación fueron la eficiencia del experimento, superior al 80% y menor a 120%; la mejor precisión fue cuando el valor era cercano a 100%. El valor de r^2 debió aproximarse a 1, (0.99 lo ideal) y el límite inferior aceptable fue 0.95 (Apéndice 6).

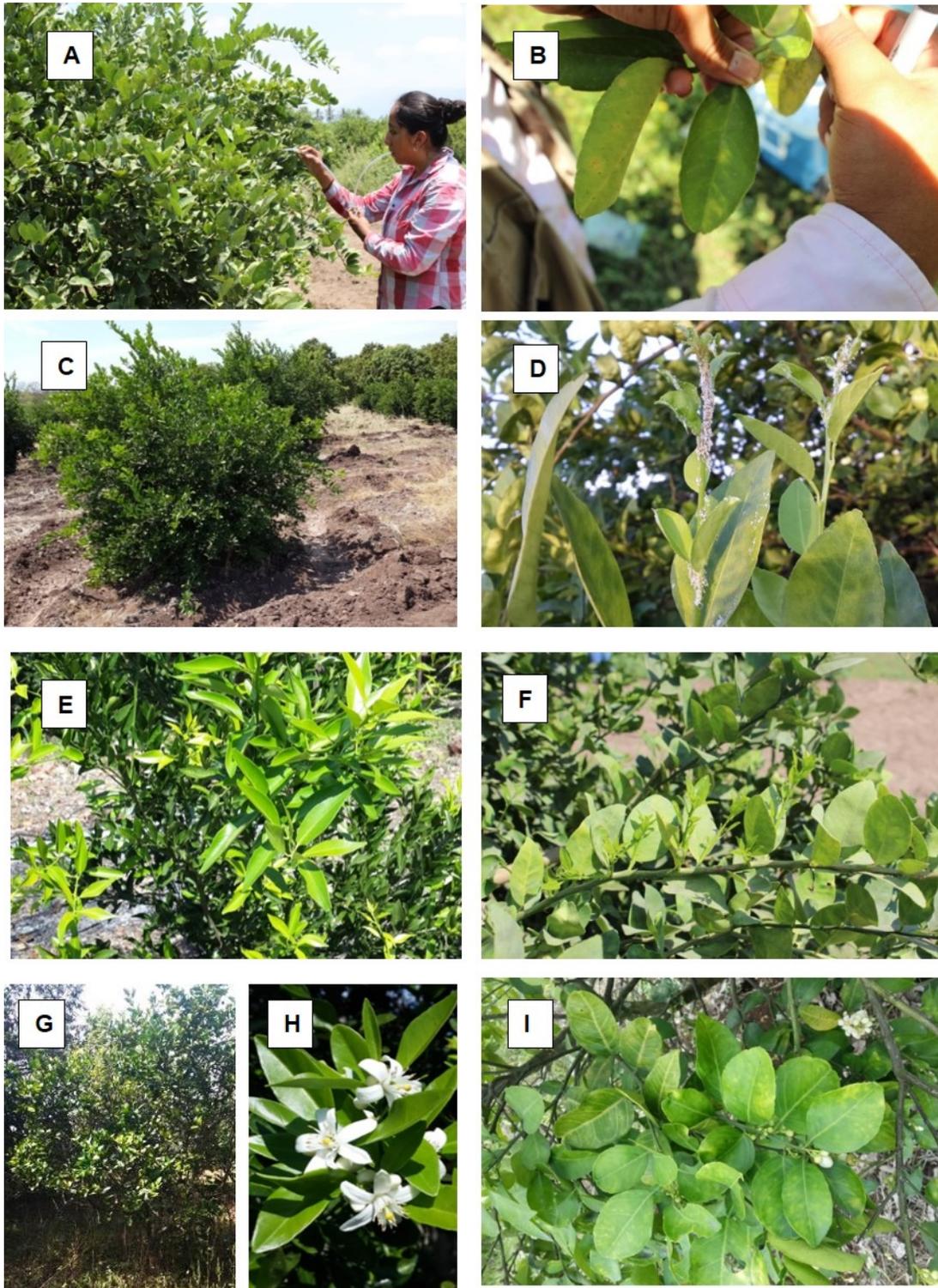


Figura 3.2. **A.** Colecta de Dc mediante aspirador manual. **B.** Colecta de hojas con aclaramiento de venas. **C.** Apariencia general de los árboles muestreados. **D.** Brotes con alta infestación de Dc. **E.** Hojas sin síntomas de HLB. **F.** Emergencia de brotes en una misma rama. **G.** Apariencia de un árbol con síntomas. **H.** Ramas florales. **I.** Ramas con hojas mostrando aclaramiento de venas.

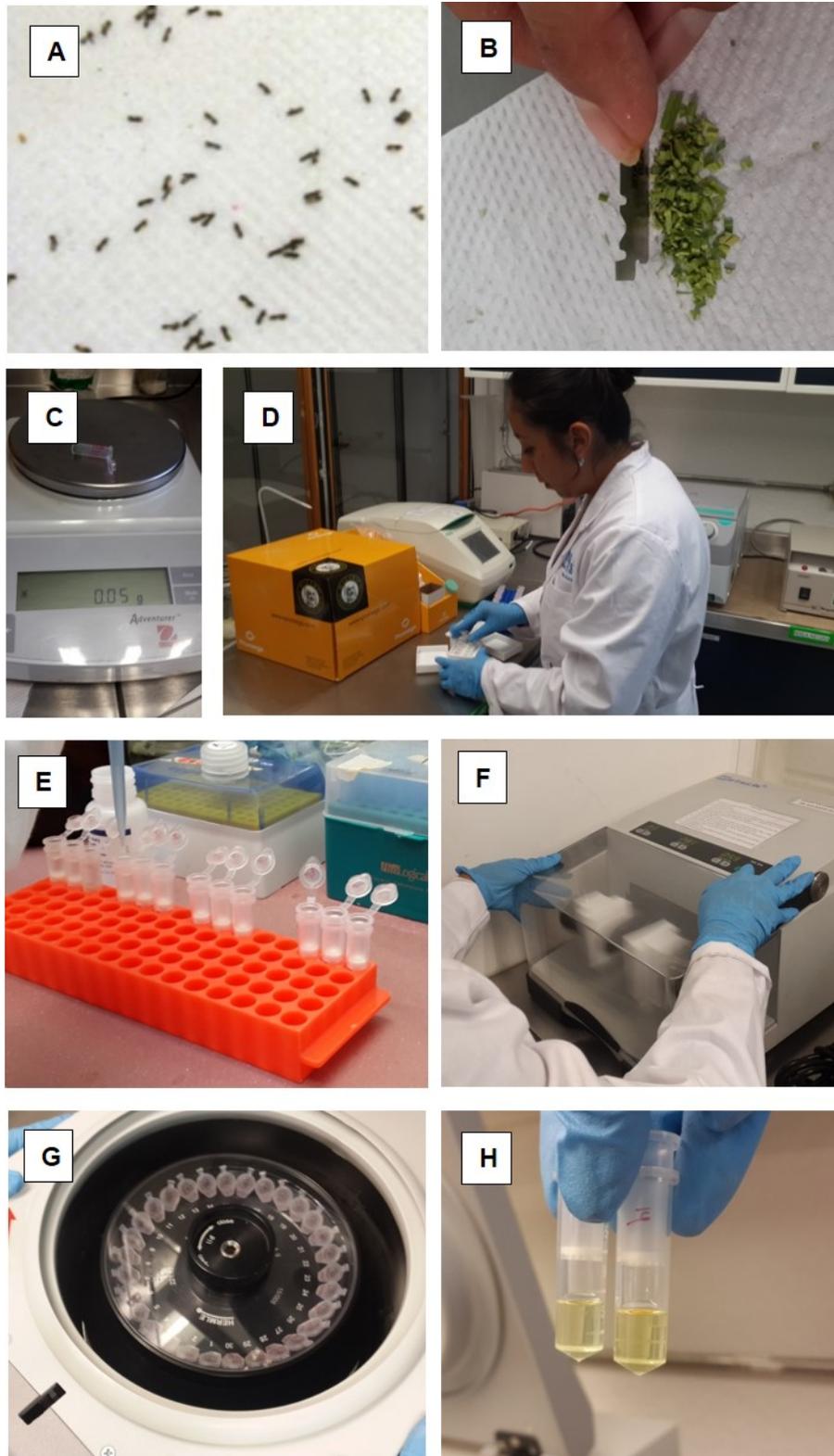


Figura 3.3. A. Secado de insectos. B. Picado de material vegetal. C, D, F, G y H. Etapas para la extracción de ADN de insectos y material vegetal.

3.7. Análisis de datos

Los datos regionales se analizaron mediante un análisis de varianza paramétrica y no paramétrica. Asimismo, la relación del promedio estimado de la carga de inóculo de Dc con respecto a la carga de inóculo bacteriana en planta se ajustó al modelo Weibull ($y = a \cdot 1 - \text{EXP}(-((t/b)^c)$), donde a = factor de corrección por el valor máximo de la carga estimada de inóculo de CLas en Dc, t = carga estimada de inóculo de CLas en planta, b = estimador de la tasa de carga estimada de inóculo de CLas en planta en vector en forma inversa y, c = forma de la curva. Este modelo se eligió para obtener la tasa media estimada de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* para los estados con mayor presencia de HLB. Los análisis se realizaron con el programa SAS v. 9.0®, mediante el procedimiento PROC NLIN para ajustar el modelo al conjunto de datos (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). El modelo fue seleccionado basado en el análisis gráfico de y y la forma de la curva de la carga de inóculo de CLas en *D. citri*. La bondad de ajuste se evaluó considerando la significancia (R^2) y la convergencia del modelo con base en el cuadrado medio del error.

3.8. Análisis espacial

El patrón espacial intraparcelario de la carga de inóculo de CLas en Dc y en plantas (Colima) fue analizado mediante un método geoestadístico interpolativo del programa Surfer vers. 10®, que consistió de mapas tridimensionales y de contorno usando la variable número de copias de las muestras positivas a CLas en planta y vector. En este análisis, las muestras de Dc y tejido vegetal se consideraron como una unidad espacial. Los mapas fueron generados para observar la distribución de la carga de inóculo de CLas en Dc y plantas para tener una referencia de comparación entre las cargas bacterianas en las mismas unidades espaciales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Distribución regional

Un total de 665 muestras compuestas de 10 especímenes de Dc provenientes de 215 huertas de siete estados del país (Figura 4.1) que corresponden a un total de 6,650 especímenes de Dc. Se detectaron 356 muestras positivas, lo cual equivale al 53% de las muestras colectadas.

Debido a la amplitud de varianza de los datos la comparación estadística mediante un análisis de varianza paramétrica y no paramétrica no fue significativa.

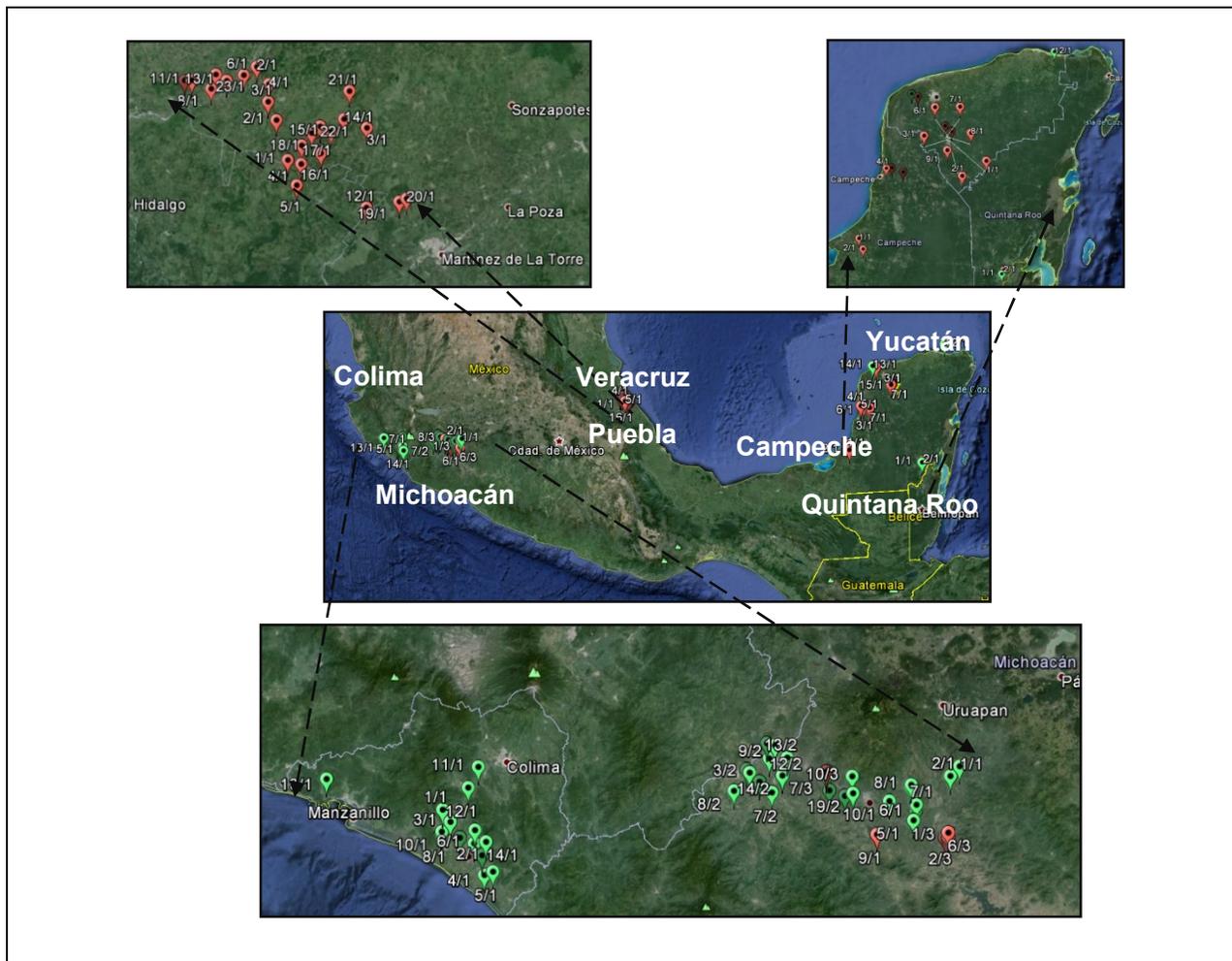


Figura 4.1. Ubicación de las huertas de cítricos donde se colectaron especímenes de Dc para estimar la carga de inóculo de CLas.

Se obtuvo el promedio del número de copias de CLas por región a partir de las muestras de Dc. Se observó que fue significativamente más alta en la región del Pacífico (9×10^6) seguida por la Península (3×10^5) y la región Centro-Golfo (5×10^1).

La carga de inóculo de CLas en muestras de Dc fue numéricamente mayor en los estados Colima y Michoacán (Región Pacífico); seguido por los estados de Quintana Roo, Yucatán, Campeche, Puebla y Veracruz (Cuadro 4.1).

En los estados de Puebla y Veracruz (Región Centro-Golfo) y de Campeche y Yucatán (Península de Yucatán) la menor carga de inóculo de CLas en Dc puede explicar el limitado proceso de dispersión resultando en una menor intensidad de la enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). Coy y Stelinski (2015) también encontraron dos niveles contrastantes de carga de inóculo en el vector en el sur de Florida e indican que la tasa de CLas en Dc no es homogénea en la región, a pesar de que el HLB está generalizado en todo el estado.

Mann *et al.* (2012) indican que adultos de Dc portadores de CLas son atraídos por plantas no infectadas, promoviendo la propagación del patógeno. Con base en lo anterior, es posible que ocurra el movimiento regional de insectos infectivos de Colima a Michoacán e intraparcariamente del bordo al interior de los huertos. Sin embargo, se observó que los rangos de concentración de la bacteria se comportaron de acuerdo al estatus epidémico (Flores-Sánchez, 2016); a mayor tiempo de infección y cronicidad mayor carga de inóculo en planta y vector (Cuadro 4.2).

En Quintana Roo solo se colectaron dos muestras de Dc, debido a que se visitaron varias huertas, pero no se tuvo acceso a ellos debido a las malas condiciones en las que se encontraban. De las dos muestras colectadas en dicho estado, la muestra con alta carga de inóculo fue obtenida en una huerta cercana con los límites con Belice (Ct= 22.4, 911,497 copias/ul). De acuerdo con Santivañez *et al.* (2013) Belice presenta un 60-80% de incidencia de HLB en cítricos dulces, y comparativamente con México y su compactación es análoga a la región del Pacífico, donde se desarrolla el proceso epidémico de mayor intensidad, pero sobre cítricos agrios.

En Yucatán, Veracruz, Puebla y Campeche la carga de inóculo fue baja comparada con las regiones citrícolas de Michoacán y Colima, donde la enfermedad presenta una

condición de alta intensidad. La baja carga de inóculo en Dc de las regiones Centro-Golfo y Península de Yucatán, es uno de los factores que puede explicar la condición de baja intensidad de la enfermedad y la prevalencia de árboles asintomáticos (Región Centro-Golfo), por limitación en el número de eventos de re-inoculación.

Cuadro 4.1. Valores promedios de cuantificación de CLas mediante qPCR de muestras compuestas de 10 especímenes de Dc por entidad federativa en tres regiones citrícolas de México. Primavera 2015.

Región	Estado	No. de copias 16S ADNr de Clas
Pacífico	Colima	10,578,370
	Michoacán	6,914,403
Península de Yucatán	Yucatán	1,700,145
	Quintana Roo	383,552
	Campeche	71
Centro-Golfo	Veracruz	74
	Puebla	30

Cuadro 4.2. Carga de inóculo mínima y máxima estimada de CLas en material vegetal y *D. citri* promediadas por entidad federativa de muestras positivas. Primavera 2015.

Estado	CLas en material vegetal			CLas en <i>D. citri</i>		
	Rango de concentración (Min-Máx)	Promedio	Desv. Estandar	Rango de concentración (Min-Máx)	Promedio	Desv. Estandar
Colima	2,120,920- 23,805,299	10,561,223	5,838,582	11,927- 24,500,000	10,578,370	8,388,521
Michoacán	85,112- 22,140,295	6,944,321	7,031,863	12,777 24,500,000	6,914,403	7,389,537
Veracruz	113-954	367	238	41-353	30	113
Puebla	132-441	288	127	22-97 (-)	74	39
Yucatán	59, 530- 8,100,618	2,648,397	3,036,360	23,507- 4,900,000	1,700,145	2,341,501
Campeche	58,511- 550,115	304,314	347,616	31-147	71	52
Quintana Roo	900,000- 1,300,000	1100,000	282,843	255,606- 511,498	383,552	180,943

Los resultados obtenidos en el presente estudio complementan a los reportados por Mora-Aguilera *et al.* (2014b), quienes indican que los diferentes escenarios epidémicos de HLB presentes en México se deben a la susceptibilidad relativa de las especies citrícolas, a la compactación citrícola, pero principalmente a la carga de inóculo, que afecta de manera determinante el comportamiento temporal y espacial de la enfermedad.

La mayor concentración regional de CLas se observó en el estado de Colima (Cuadro 4.2), así como el mayor porcentaje de muestras de insectos positivos a la bacteria, seguido por Michoacán, Quintana Roo, Yucatán y Veracruz (Cuadro 4.3 y Figura 4.2). en el caso de Quintana Roo el alto porcentaje es un efecto del reducido tamaño de muestra (2), por lo que este resultado debe verificarse, sobre todo por su proximidad con Belice.

Cuadro 4.3. Muestras positivas y negativas de CLas en Dc por entidad federativa.

Estado	(-)	(+)	Total de muestras analizadas	Porcentaje Estatal	Porcentaje relativo al total
Colima	10	200	210	95.2%	81.3%
Michoacán	48	38	86	44.2%	15.4%
Puebla	85	0	85	0.0%	0.0%
Veracruz	175	4	179	2.2%	1.6%
Yucatán	17	3	20	15.0%	1.2%
Quintana Roo	1	1	2	50.0%	0.4%
Campeche	10	0	10	0.0%	0.0%
Total general	346	246	592	41.6%	100.0%

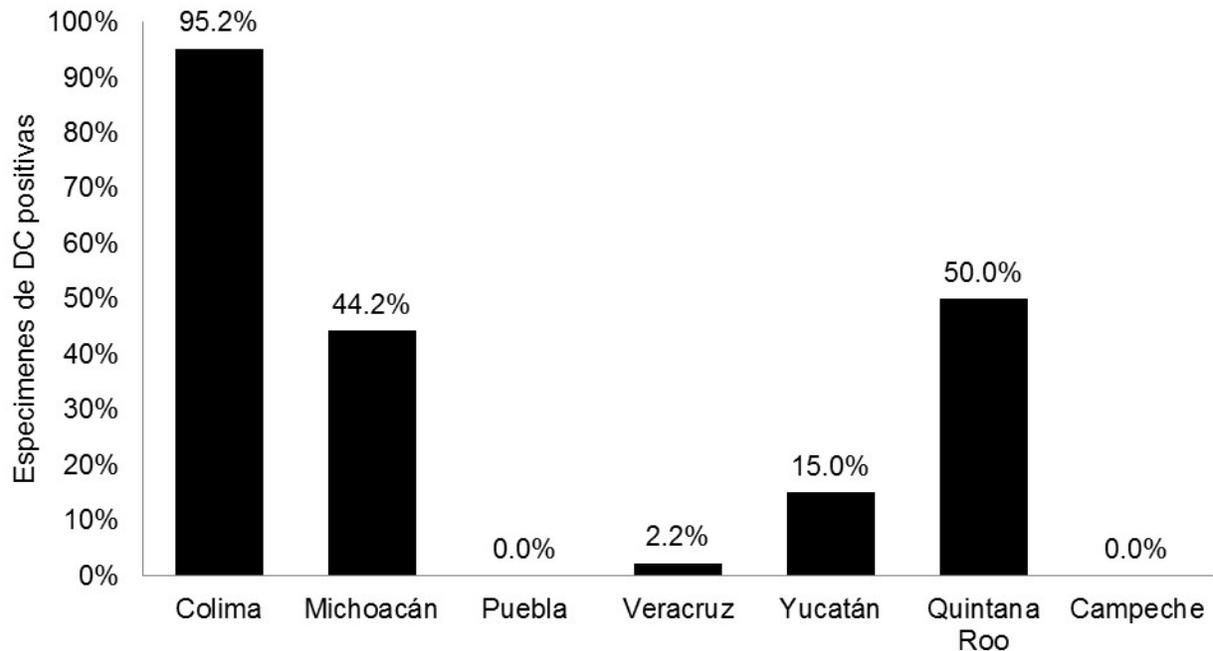


Figura 4.2. Porcentaje relativo de muestras de DC positivas a CLAs.

4.1.1. Relación de la carga de inóculo Clas en vector:planta.

Los resultados de Colima y Michoacán, región endémica de la enfermedad (Flores-Sánchez, 2016), se ajustaron al modelo de Weibull con buenos atributos estadísticos de forma y estructura, e indican que la tasa de la carga de inóculo en vector es representada por una curva de tipo sigmoideal. Se observó que la tasa de la cantidad de bacteria en el vector es baja cuando la concentración de la bacteria en la planta es baja pero aumenta conforme se incrementa la cantidad de la bacteria en la planta. Eventualmente mayor inóculo en planta no influye en la carga bacteriana en el vector (tendencia asintótica), pero si debe influir en la frecuencia de insectos que adquieren la bacteria (Figura 4.3). Pennypacker *et al.* (1980) mencionan que es deseable representar mediante una función matemática la gama de formas que se encuentran en las curvas de progreso de una enfermedad y debido a su flexibilidad, la función de densidad de probabilidad de distribución acumulativa de Weibull se puede aplicar como un modelo de progreso de la enfermedad. En este caso el modelo de Weibull modificado por carga de inóculo máximo fue apropiado para explicar la tasa de

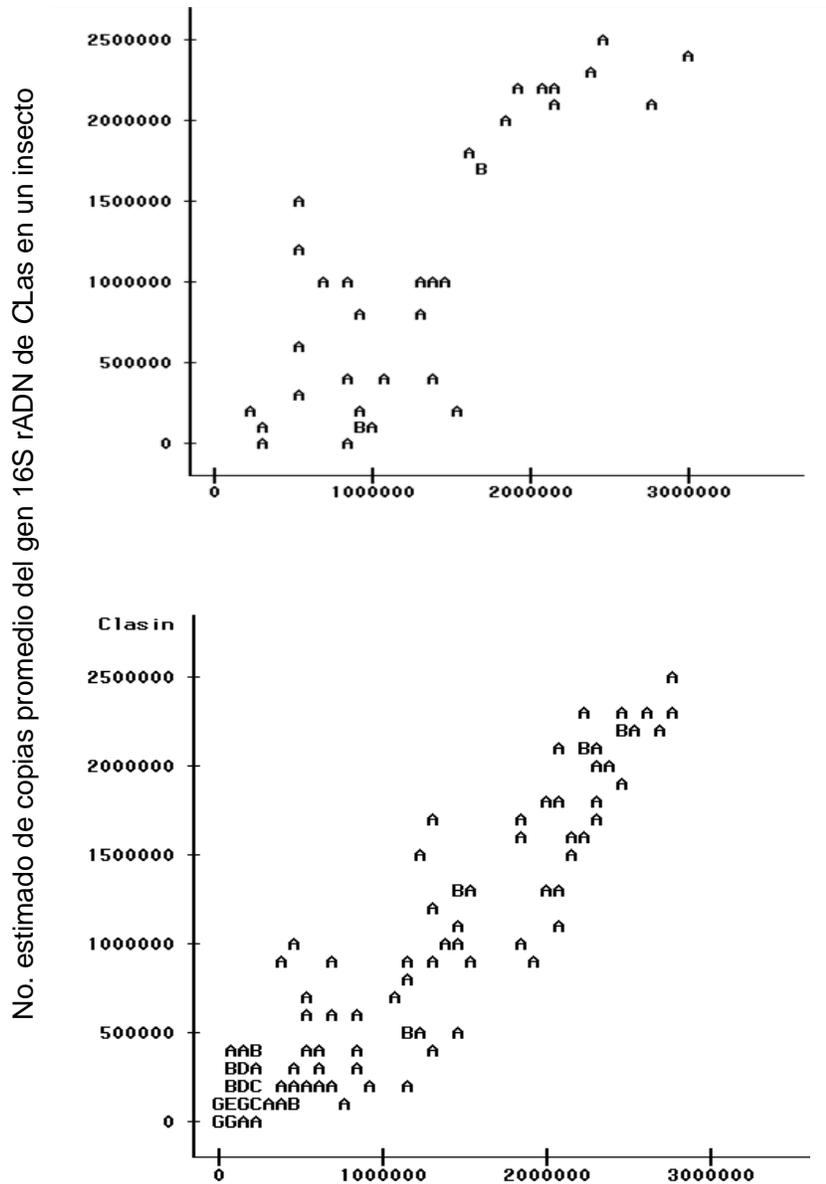
incremento de carga bacteriana en función del inóculo de la planta. De acuerdo con Salcedo *et al.* (2010) el patrón de crecimiento de cítricos infectados con HLB es de tipo sigmoideal y muestra que la tasa de crecimiento de la infección inicia lentamente pero conforme pasa el tiempo aumenta rápido para estabilizarse en forma lenta al alcanzar el valor asintótico del 100% de árboles infectados. Este comportamiento podría estar asociado con el observado en la carga de inóculo en el vector.

La curva de crecimiento está relacionada con la intensidad de infección presente en cada estado. De acuerdo con Flores-Sánchez (2016) la pérdida productiva inducida por CLas en limón mexicano es mayor en Colima (67.2%) que en Michoacán (36.7%), derivado de una mayor endemicidad y cronicidad. Aunque la intensidad de enfermedad ha sido más severa y endémico en Colima, los resultados sugieren que no existen diferencias significativas de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* entre los estados de la Región Pacífico (Colima y Michoacán). Las tasas de inóculo fueron similares en ambos estados $b = 13, 599,314$ ($r^2=0.72$) para Colima y $b = 14, 883,248$ ($r^2=0.87$) para Michoacán de acuerdo al traslape de los intervalos de confianza (95%) de los parámetros b y c (Cuadro 4.4). Esto indica que Michoacán exhibe un alto riesgo epidémico, sobre todo por predominar los cítricos agrios altamente vulnerables (Esquivel-Chávez, 2016; Esquivel-Chávez *et al.* 2012).

En Colima se observó que en huertos con una concentración de la bacteria baja en planta también lo fue para el vector. El crecimiento exponencial y ligeramente una fase terminal fue análogo para planta y vector. En el caso de Michoacán, se observó la misma relación sigmoideal, sin embargo, la fase terminal o asintótica no fue tan marcada, lo cual puede indicar un proceso activo epidémico dependiente de la dispersión del inóculo por *Dc*.

Una posible interpretación biológica a la relación asintótica en Colima puede ser pérdida de calidad de los tejidos por lo que el vector pierde preferencia y reduce tiempo de alimentación sobre estos tejidos (Wu *et al.*, 2015; Mann *et al.*, 2012).

En los demás estados (Región Centro-Golfo y Península de Yucatán) no hubo convergencia de datos y no se observó una clara tendencia debido a la baja incidencia de muestras positivas a CLas en el vector.



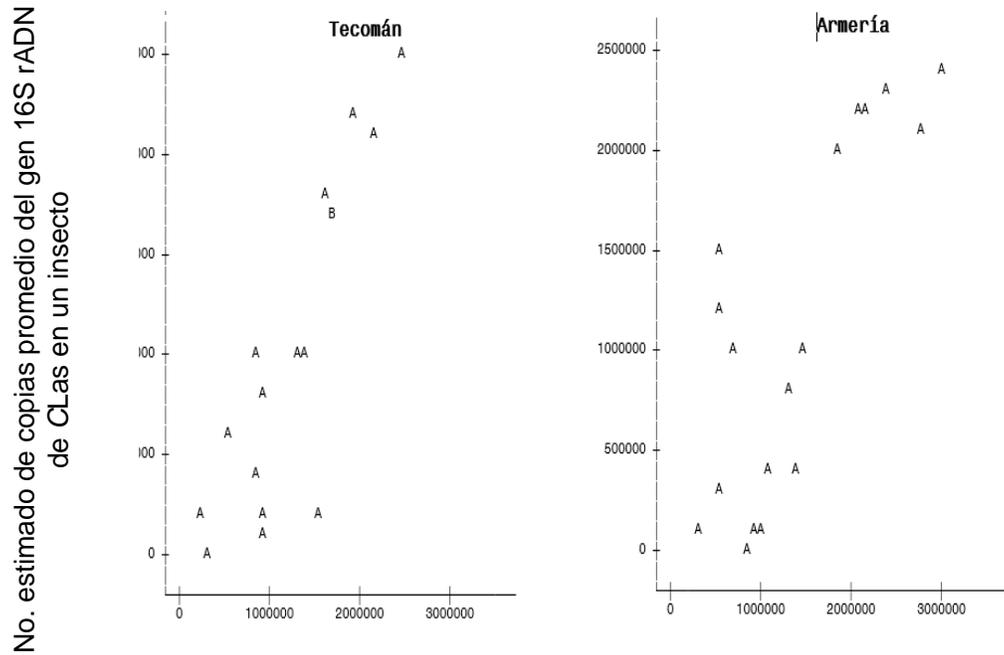
No. estimado de copias promedio del gen 16S rADN de CLas en una hoja de cítrico

Figura 4.3. Correlación del promedio estimado de la concentración de CLas en tejido vegetal con el estimado de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* por huerta en los Estados de Michoacán y Colima. Datos ajustados a una concentración promedio por un insecto y una hoja a partir de las muestras compuestas respectivas.

Las curvas con datos a nivel de los municipios de Colima y Michoacán, se ajustaron también al modelo de Weibull, sin encontrarse diferencias significativas en la carga de inóculo de CLas en el vector (Cuadro 4.5). En Colima se colectaron muestras en los Municipios de Armería y Tecomán. En el caso de la curva de la relación vector:planta de Armería (municipio de menor intensidad de la enfermedad en Colima) se observan puntos fuera de tendencia (Figura 4.4). Asimismo, en las curvas de los Municipios de Michoacán se observan resultados donde la carga de inóculo es mayor en el vector que en la planta (Figura 4.5). Estos resultados pueden deberse al proceso activo de dispersión, sugiriendo que los valores fuera de tendencia pertenecen a muestras de insectos migrantes provenientes de áreas con mayor intensidad de enfermedad, como lo es el Municipio de Tecomán en Colima y Tepalcatepec en el caso de Michoacán, los cuales tiene una influencia en los municipios colindantes. Mann *et al.* (2012) indican que los adultos de *D. citri* portadores de CLas son atraídos por arboles no infectados, lo cual promueve la propagación del patógeno. Lo anterior sugiere que existe una dispersión de insectos infectivos provenientes de áreas de mayor a menor intensidad de la enfermedad, aunque el efecto de la distancia de dispersión por este efecto no está clarificado.

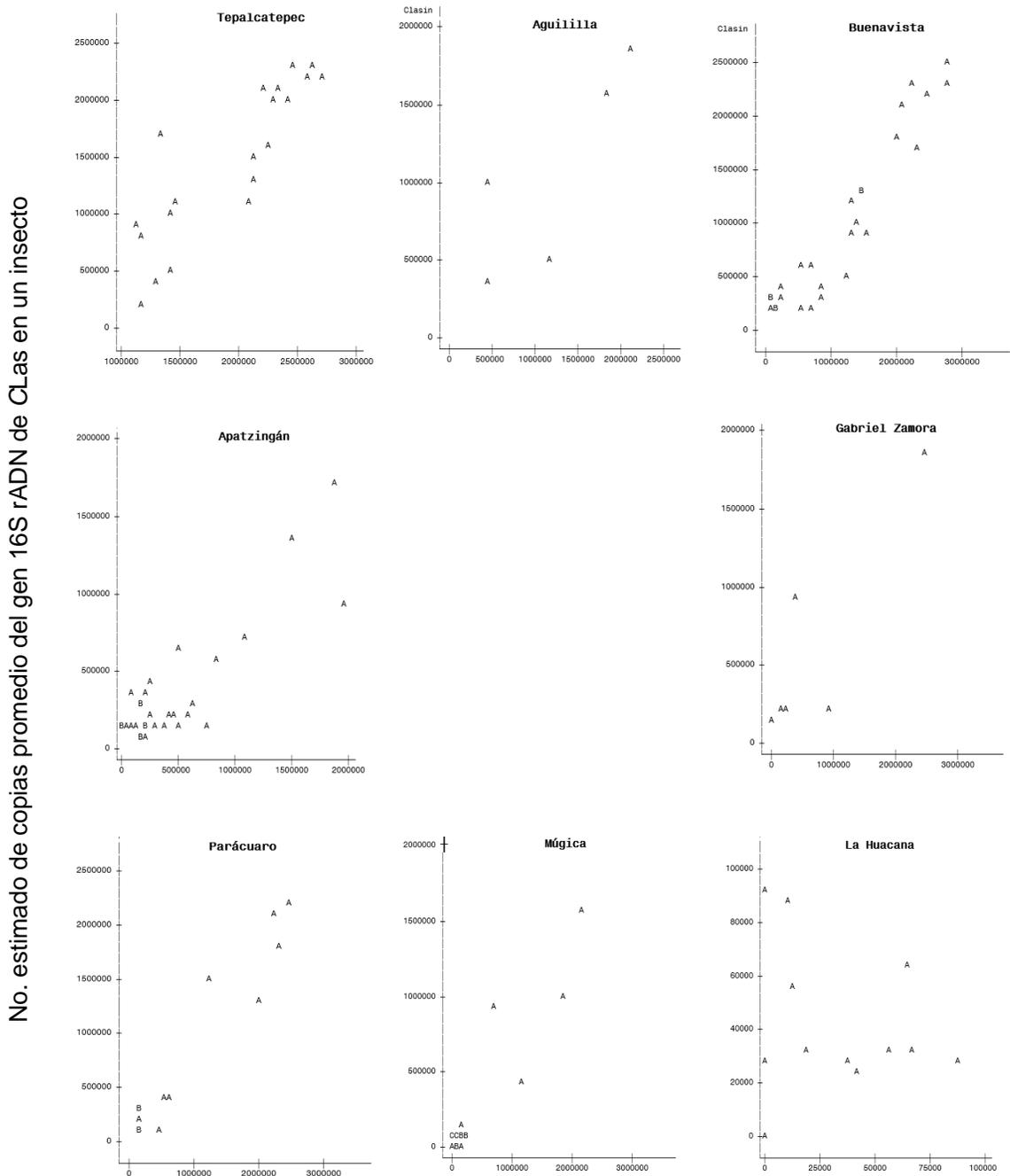
Cuadro 4.4. Parámetros ajustados del modelo de Weibull e intervalos de confianza a $p=0.05$ asociados a las curvas de la relación de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* con respecto a la concentración en planta. Datos promediados por entidad federativa.

Estado	Límite inferior	b	Límite superior	Límite inferior	c	Límite superior	r^2
Colima	1, 513,277	1, 699, 914	1, 886,552	1.71	2.96	4.22	0.72
Michoacán	1, 759, 378	1, 860, 406	1, 961, 434	1.54	1.8	2.07	0.87



No. estimado de copias promedio del gen 16S rADN de CLas en una hoja

Figura 4.4. Correlación de la concentración estimada de CLAs en tejido vegetal y la concentración estimada de CLAs en *D. citri* por huerta parcela en los municipios de Tecomán y Armería, Colima. Datos ajustados a una concentración promedio por un insecto y una hoja a partir de las muestras compuestas respectivas.



No. estimado de copias promedio del gen 16S ADN de CLas en una hoja de cítricos

Figura 4.5. Correlación de la concentración estimada de CLas en tejido vegetal y la concentración estimada de CLas en *D. citri* por huerta parcela en los municipios de Michoacán. Datos ajustados a una concentración promedio por un insecto y una hoja a partir de las muestras compuestas respectivas.

Cuadro 4.5. Parámetros ajustados del modelo de Weibull e intervalos de confianza a $p=0.05$ asociados a las curvas de la relación de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* con respecto a la concentración en planta. Datos promediados por municipio de Colima y Michoacán.

Estado	Municipio	Límite inferior	b	Límite superior	Límite inferior	c	Límite superior	r2
Colima	Tecomán	1, 438, 063	1, 662, 286	1, 886, 508	1.27	2.83	4.4	0.73
	Armería	1, 412, 521	1, 736, 071	2, 059, 620	0.93	3.56	6.19	0.71
Michoacán	Tepalcatepec	1, 748, 031	1, 938, 081	2, 128, 131	1.51	2.4	3.29	0.73
	Buenavista	1, 576, 582	1, 722, 179	1, 867, 776	1.68	2.29	2.9	0.92
	Aguililla	-152, 058	1, 918, 793	3, 989, 645	-0.82	1.04	2.9	0.6
	Apatzingán	1, 663, 405	2, 387, 268	3, 111, 131	0.82	1.19	1.55	0.71
	Gabriel Zamora	-239, 840	2, 158, 568	4, 556, 976	-0.37	1.07	2.52	0.69
	Parácuaro	1, 286, 500	1, 607, 385	1, 928,270	0.89	1.38	1.88	0.92
	Múgica	1, 783, 025	2, 586, 281	3, 389, 537	0.68	1.15	1.63	0.86
	La Huacana	---	1, 225, 000	---	1.06	1.38	1.71	0.16

Aunque no existió diferencias significativas entre municipios en los datos obtenidos en Michoacán se observa relación directa entre la concentración de CLas en material vegetal y carga de inóculo en el vector, con un gradiente de concentración que va de Tepalcatepec hacia La Huacana, región de mayor a menor concentración de CLas (Figura 4.6). Flores-Sánchez (2016) indica que la intensidad epidémica de CLas en Colima (68%) es alta y homogénea, en comparación con Michoacán (53.7%), donde la endemidad es restringida en los Municipios de Tepalcatepec (67.7%), Aguililla (65.2%) y Buenavista (57.8%), mientras que en Gabriel Zamora (43%) y La Huacana (7.5%) es de baja intensidad y con presencia de focos de infección. Precisamente en estos dos municipios el ajuste del modelo no fue significativo indicando que la carga de inóculo en el vector tiene una fuerte dependencia del inóculo local en planta. Si este es muy bajo y restringido a focos se tendrá limitado número de insectos portadores de la bacteria. El

muestreo se realizó entre febrero y marzo lo que sugiere que se colectaron adultos de las primeras generaciones del ciclo productivo y por tanto posiblemente de origen local.

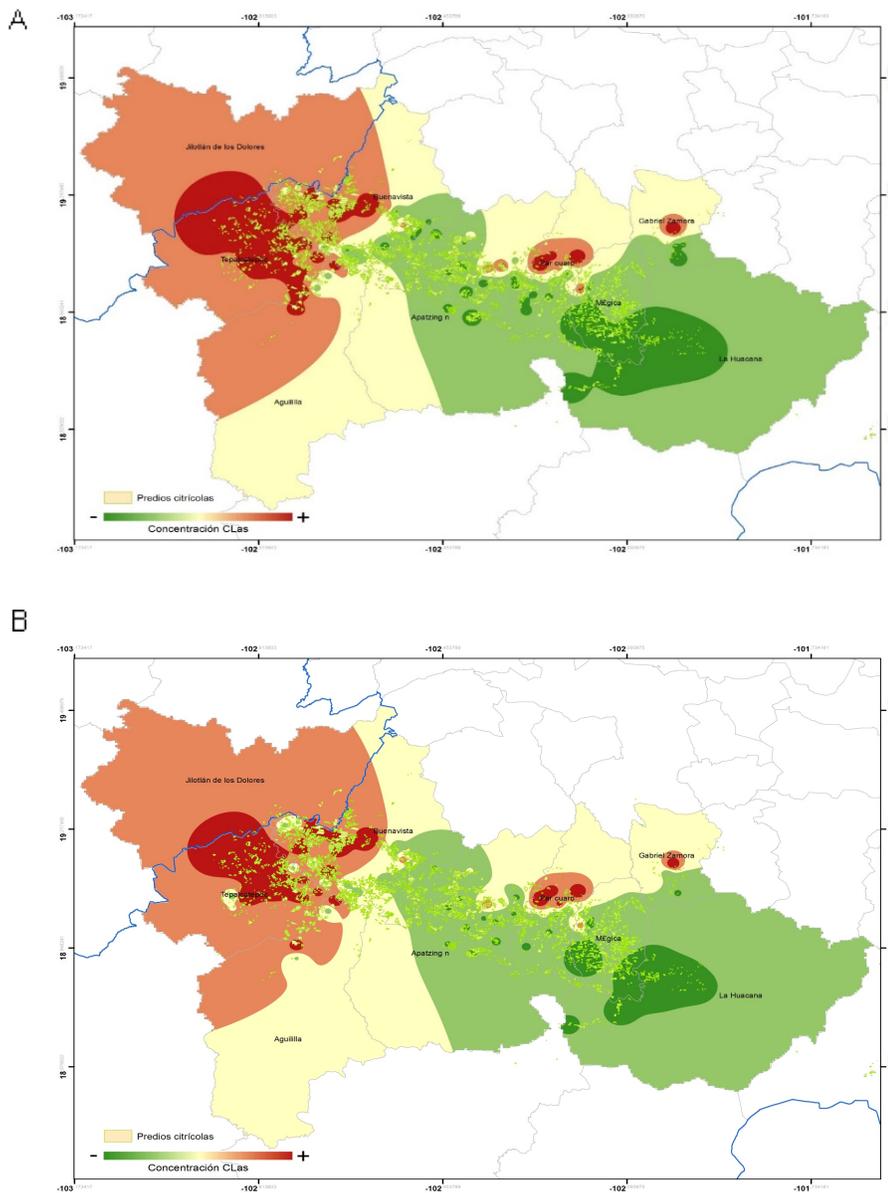


Figura 4.6. Mapas espaciales interpolados geoestadísticamente de la concentración estimada de CLas en muestras provenientes de ocho Municipios de Michoacán. A) Concentración de CLas en brotes vegetativos de cítricos. B) Carga de inóculo de CLas en DC.

4.1.2. Relación de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* con respecto a la severidad de la enfermedad

De acuerdo con Flores-Sánchez *et al.* (2015) y Mora-Aguilera *et al.* (2014b), en México los escenarios epidémicos de HLB hasta 2014 se habían categorizado en dos regiones, Pacífico y Península de Yucatán con alta y baja intensidad, respectivamente, debido a la incidencia y severidad que presenta la enfermedad. En el presente estudio se consideró una tercera región, la Centro-Golfo, en la que la enfermedad está presente en baja intensidad. Los resultados del presente estudio indican que en regiones de alta y baja intensidad e incluso en condición asintomática (Esquivel-Chávez, 2016; López-Bautista *et al.*, 2016; Martínez-Bustamante *et al.*, 2016; López-Bautista *et al.*, 2015) existe una correlación entre la severidad y la concentración de carga de inóculo (Figura 4.7). En Colima y Michoacán, se observó mayor daño relacionado con una mayor severidad y carga de inóculo en el vector. En Colima se encontró un modelo de correlación cuadrático $y=5083.4x^2-264830x+5E+6$ ($r^2=0.73$). Así como para Michoacán $y=1281.3x^2+110589x+504986$ ($r^2=0.89$). En la Península de Yucatán, al igual que en la región Centro-Golfo, la enfermedad se ha presentado en baja intensidad, menor severidad y carga de inóculo. Aunque históricamente en Yucatán se detectó por primera vez esta enfermedad en México (Mora-Aguilera *et al.* 2014a) existe un menor daño lo cual puede estar relacionado con los sitios de detección (traspatios), heterogeneidad de especies citrícolas, condiciones orográficas, así como con la carga de inóculo en planta y vector que influyen en la eficiencia de reinfección y dispersión del patógeno (Fagen *et al.*, 2012; Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). La posibilidad de un efecto fisiológico de cítricos bajo constante estrés hídrico generando brotaciones limitadas y de bajo vigor, así como el efecto de organismos benéficos endémicos (Cortez *et al.*, 2015) debido al bajo uso de pesticidas, podrían ser otras explicaciones a la baja intensidad epidémica en esta región.

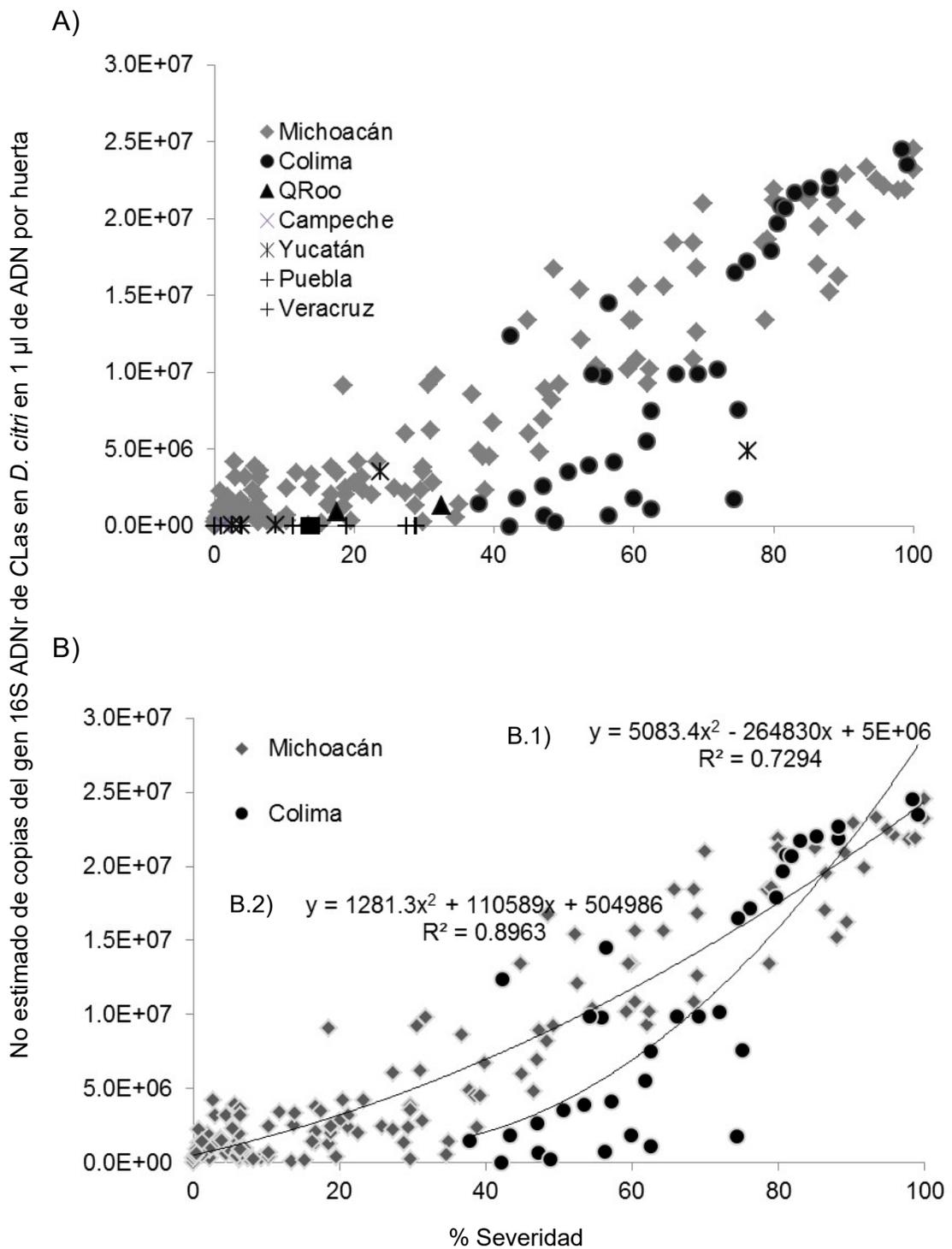


Figura 4.7. Correlación de la severidad de HLB con la carga de inóculo de CLas (número de copias del gen ADNr 16S) estimada mediante PCR en tiempo real, A) en muestras de Dc colectadas de siete estados; B) en muestras de Dc colectadas en Colima (B.1) y Michoacán (B.2).

4.1.3. Relación de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* con respecto a la brotación

Diversos estudios realizados indican que la cantidad de brotes vegetativos de cítricos está relacionada con la dinámica poblacional de Dc, debido a que parte del ciclo de vida del insecto se desarrolla en brotes tiernos (Catling, 1970; Halbert y Manjunath, 2004). En este estudio, se encontró una relación positiva entre las entidades federativas con mayor carga de inóculo (Cuadro 4.2) y mayor brotación (Figura 4.8). Salcedo *et al.* (2010) indican que en los estados de Colima y Michoacán el limón mexicano es la variedad que más se cultiva, el cual por sus características fenológicas presentan brotes vegetativos durante todo el año. Asimismo, Flores-Sánchez *et al.* (2015) mencionan que existe una mayor prevalencia de CLas en cítricos agrios, con pérdidas de producción estimadas del 13 al 70% en limón mexicano y del 17% en limón persa, dependiendo del nivel tecnológico (Flores-Sánchez *et al.*, 2015; Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez, 2016).

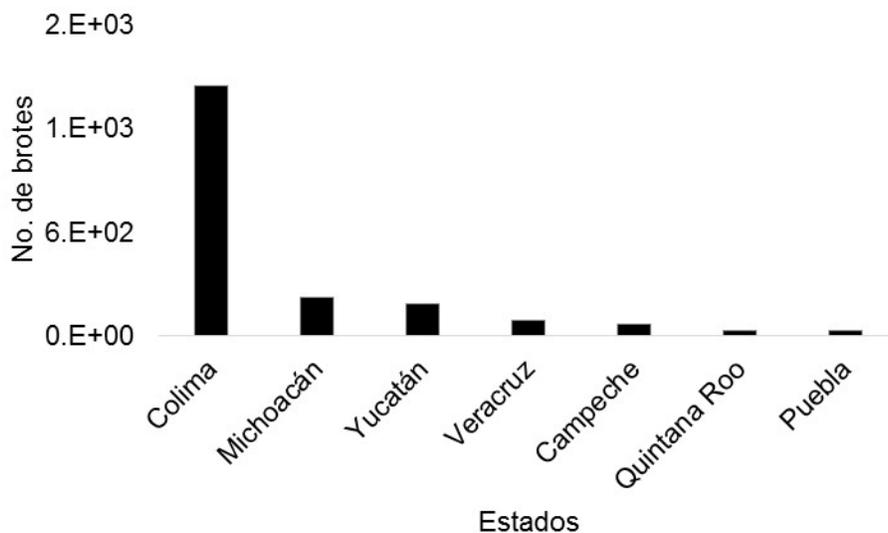


Figura 4.8. Número total de brotes registrados por huerta en las cuales se realizó colectas de Dc y tejido para la estructuración de carga bacteriana.

4.1.4. Efecto del manejo tecnológico sobre la carga de inóculo de CLas en *D. citri*

En huertos con bajo manejo tecnológico se observó mayor carga de inóculo de CLas en Dc en comparación con la carga de inóculo de Dc proveniente de huertos caracterizados con un manejo moderado y alto (Figura 4.9).

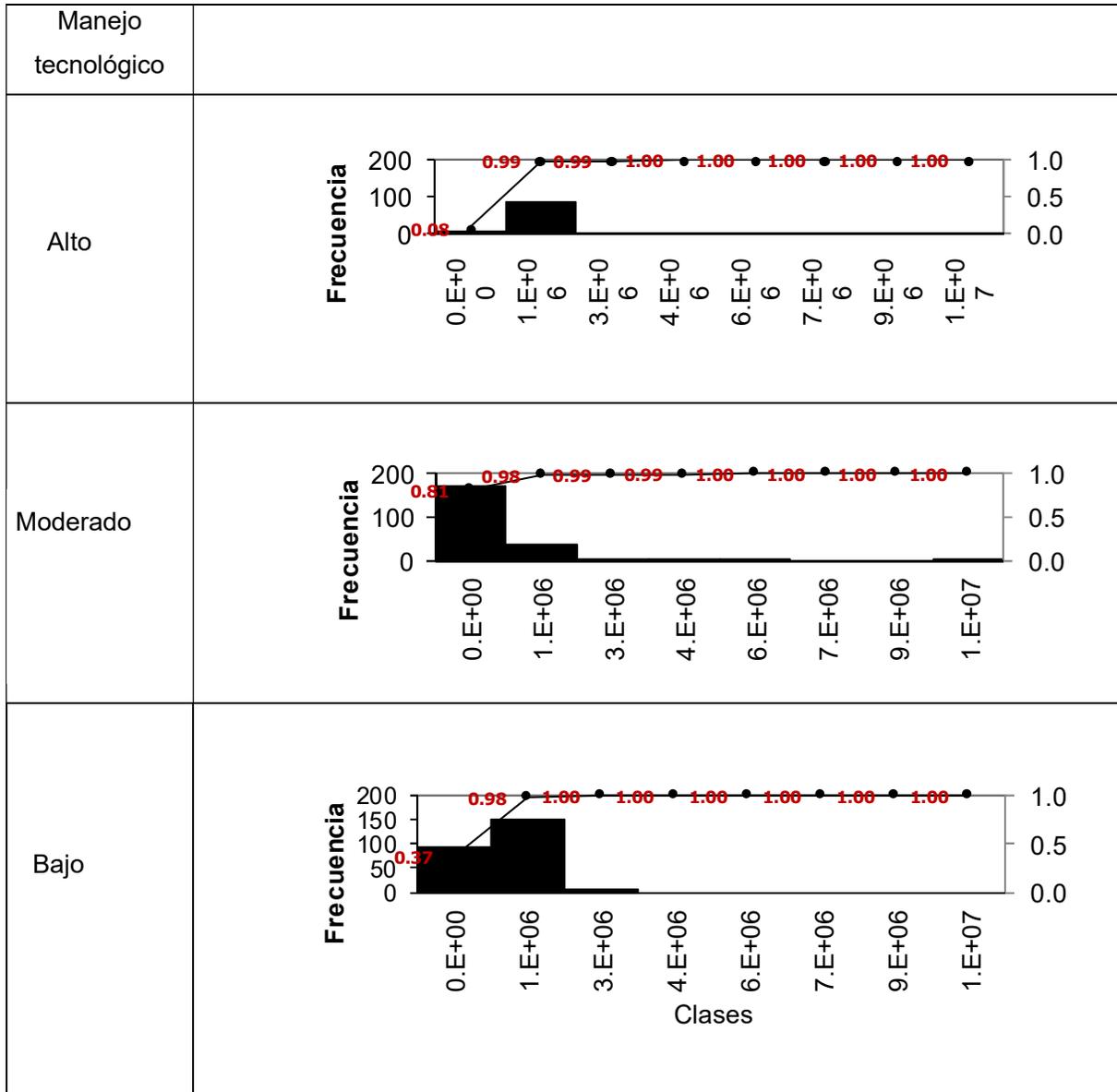


Figura 4.9. Frecuencias por clases de la carga de inóculo de CLas en Dc (número estimado de copias del gen 16S ADNr de CLas) colectados de huertas categorizados con manejo alto, moderado y bajo.

4.2. Distribución de la carga de inóculo intraparculario

El patrón espacial parcelario de la concentración de CLas en planta y vector se estudió en siete parcelas comerciales de cítricos. La carga de inóculo mostró un comportamiento marcado de efecto de borde, el cual es una característica de distribución espacial parcelaria del HLB (Gottwald *et al.*, 2010) y está asociado a una dispersión primaria de inóculo, por la influencia de insectos infectivos provenientes de huertos adyacentes. Sin embargo, se observaron características particulares relacionadas a la endemicidad de la enfermedad en las regiones y al manejo agronómico de las huertas. Así mismo, este es el primer trabajo que documenta este efecto directamente con la carga bacteriana en el vector.

En total se revisaron siete parcelas de cuatro estados con diferente estatus epidémico en las cuales se colectaron 468 muestras de insectos. Se detectaron 184 muestras positivas (39% del total). En Colima se detectaron 167 muestras positivas (97%), Michoacán 13 positivas (36%); Veracruz 4 positivas (2.5%), mientras que en Puebla no se detectaron muestras positivas. En las parcelas de la región Centro-Golfo, se concluye que existe fuerte influencia de inóculo primario. En las huertas de la región Pacífico se observó la influencia de ambas, esto es, el vector está implicado en un vector fuertemente influenciado por re-infecciones y dispersiones secundarias de CLas.

En Colima, estado de alta intensidad y endemicidad de la enfermedad, se evaluaron dos huertas (Cuadro 3.1). En las cuales se observó una distribución uniforme de la carga de inóculo de CLas en material vegetal y en el vector (Figura 4.10), con 96% y 97% de muestras positivas a CLas, respectivamente. A pesar de esta similitud, se observaron ciertas diferencias de acuerdo al manejo agronómico de cada una de ellas.

La primera huerta (T19) caracterizada con baja tecnología tuvo mayor concentración de inóculo en el vector y en material vegetal en las periferias de la huerta. En otras investigaciones se ha observado que las poblaciones de Dc es mayor en los bordes de las huertas y que las concentraciones más altas de CLas de los árboles sintomáticos se encuentran inicialmente en los primeros 30-40 m del perímetro, por ser áreas con exposición a los insectos acarreados por los vientos, con una disminución del gradiente

hacia el interior de la huerta (Boina *et al.*, 2009; Gottwald e Irey, 2008). Nuestro resultado confirma este patrón de dispersión. Asimismo, se observó la presencia de focos en el interior de la huerta; los cuales pueden provenir de un foco principal externo, de insectos que adquirieron al patógeno en huertas aledañas o que lo obtuvieron de árboles con una alta concentración de CLas, adyacentes o cercanos al sitio de colecta. De acuerdo con Gottwald *et al.* (2007), las áreas de agregación discontinuas a un foco principal, indican la presencia de focos secundarios frecuentes y los cuales están a una distancia de aproximadamente 25 a 50 m del foco asociado con el movimiento del vector. Sin embargo, este efecto puede depender de la dimensión de huertos. En huertos pequeños (p.e. <3-4ha) el efecto de borde puede no encontrarse, mientras que en plantaciones extensas, tipo Brasil, el efecto de borde será el predominante

Para el caso de la segunda huerta (Gómez), caracterizada con tecnología alta y la carga de inóculo en material vegetal y en el vector también fue uniforme (Figura 4.10); sin embargo, no se observó el efecto de orilla y la mayor cantidad de inóculo en el vector y en el material vegetal se presentó en el interior de la huerta. Estos resultados sugieren que el manejo agronómico (riego, fertilización y control químico del vector) influye en el comportamiento de la distribución del inóculo. Bassanezi *et al.* (2013) indican que uno de los efectos de la reducción de inóculo local, es que la propagación secundaria de la enfermedad, es más importantes que la propagación primaria. La dispersión secundaria se caracteriza porque existe una disminución entre la distancia de árboles infectados y a medida que aumentan éstos, se acortan las distancias de transmisión del patógeno (Gottwald *et al.*, 2010). La dispersión secundaria se incrementa con la endemidad perdiéndose el efecto de foco y de gradiente (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b)

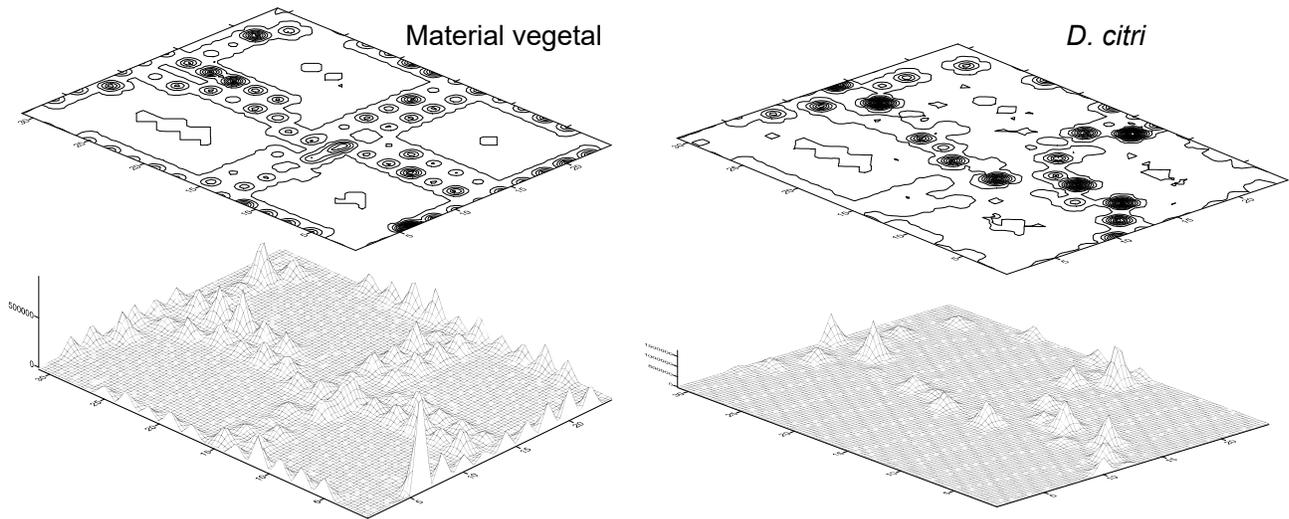
A diferencia de las huertas evaluadas en Colima, en Michoacán, la distribución de la carga de inóculo en el vector en las huertas evaluadas no fue uniforme, mostró un efecto marcado de borde y disminución al interior, lo cual indica una dispersión típica activa del inóculo primario de la periferia de las huertas con gradientes de dispersión hacia el interior (Figura 4.11). La frecuencia de muestras de Dc positivas a CLas fue de 39% y la severidad observada en las parcelas fue del 16%. Observamos, que en Michoacán a diferencia de Colima aún es importante la dispersión primaria, que se

caracteriza por la introducción de patógenos en la plantación de fuentes externas. De acuerdo con Gottwald *et al.* (2010), la diseminación primaria es la más peligrosa, porque indica un proceso de dispersión a larga distancia o regional. Mora-Aguilera *et al.* (2014c) ha demostrado que los modelos de dispersión primaria y secundaria en HLB se pueden detectar con modelos temporales regionales, siendo monomolecular el primer caso y de tipo sigmooidal y exponencial la secundaria.

En el estado de Veracruz se evaluaron dos parcelas, de las cuales solo en una se detectaron cuatro muestras positivas a CLas (de un total de 160) procedentes de la periferia colindante con la carretera principal y caminos secundarios, lo cual evidencia un efecto de orilla y presencia de brotes en el interior que puede ser resultado de una diseminación primaria e inicios de una dispersión secundaria (Figura 4.11). De acuerdo con Gottwald *et al.* (2010), la dispersión de HLB se produce de una mezcla incesante de dos procesos espaciales que ocurren simultáneamente: la introducción continúa del inóculo desde afuera de las huertas y la diseminación local desde adentro de la huerta. En la primera huerta (M7) la frecuencia de muestras de Dc positivas a CLas fue de 2.5% y la severidad de 8%. Por su parte, en la segunda huerta (M6) de Veracruz se colectaron 77 muestras de Dc y todas fueron negativas. En el caso de Puebla se evaluó una huerta (M1), en la cual se colectaron 82 muestras de Dc, todas resultaron negativas a CLas.

El número de muestras positivas en Puebla y Veracruz es bajo igual que la concentración de inóculo de aquellas que fueron positivas tanto en planta como en vector comparada con Colima, donde el HLB presenta una condición sintomática y endémica desde 2010.

A) T19



B) Gómez

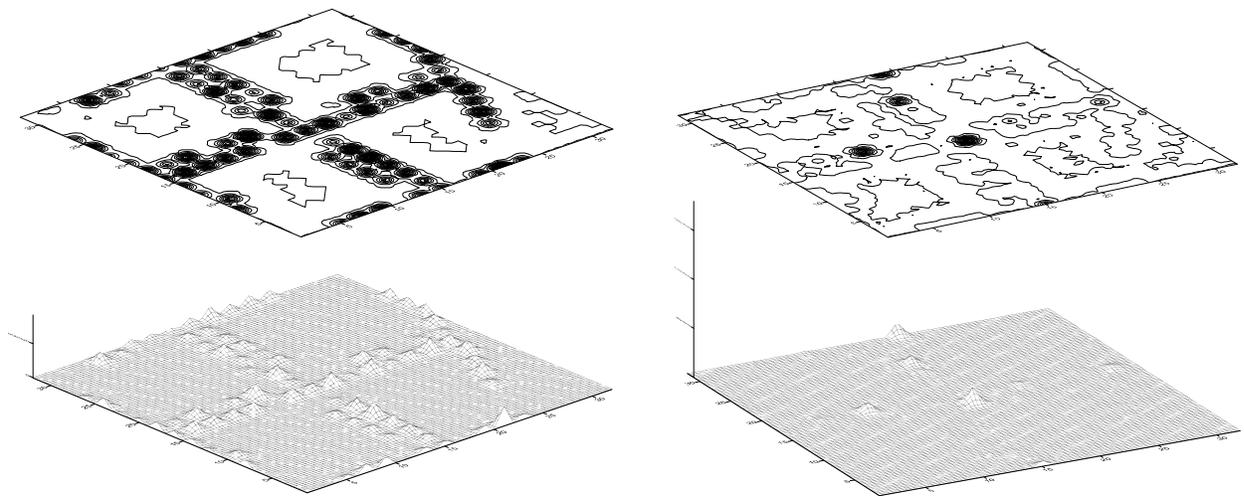


Figura 4.10. Mapas geoestadísticos interpolados de la distribución de la carga de inóculo de CLas estimado con el número de copias de bacterias/ μ l en plantas y Dc en la huerta A) T19 y B) Gómez, del estado de Colima.

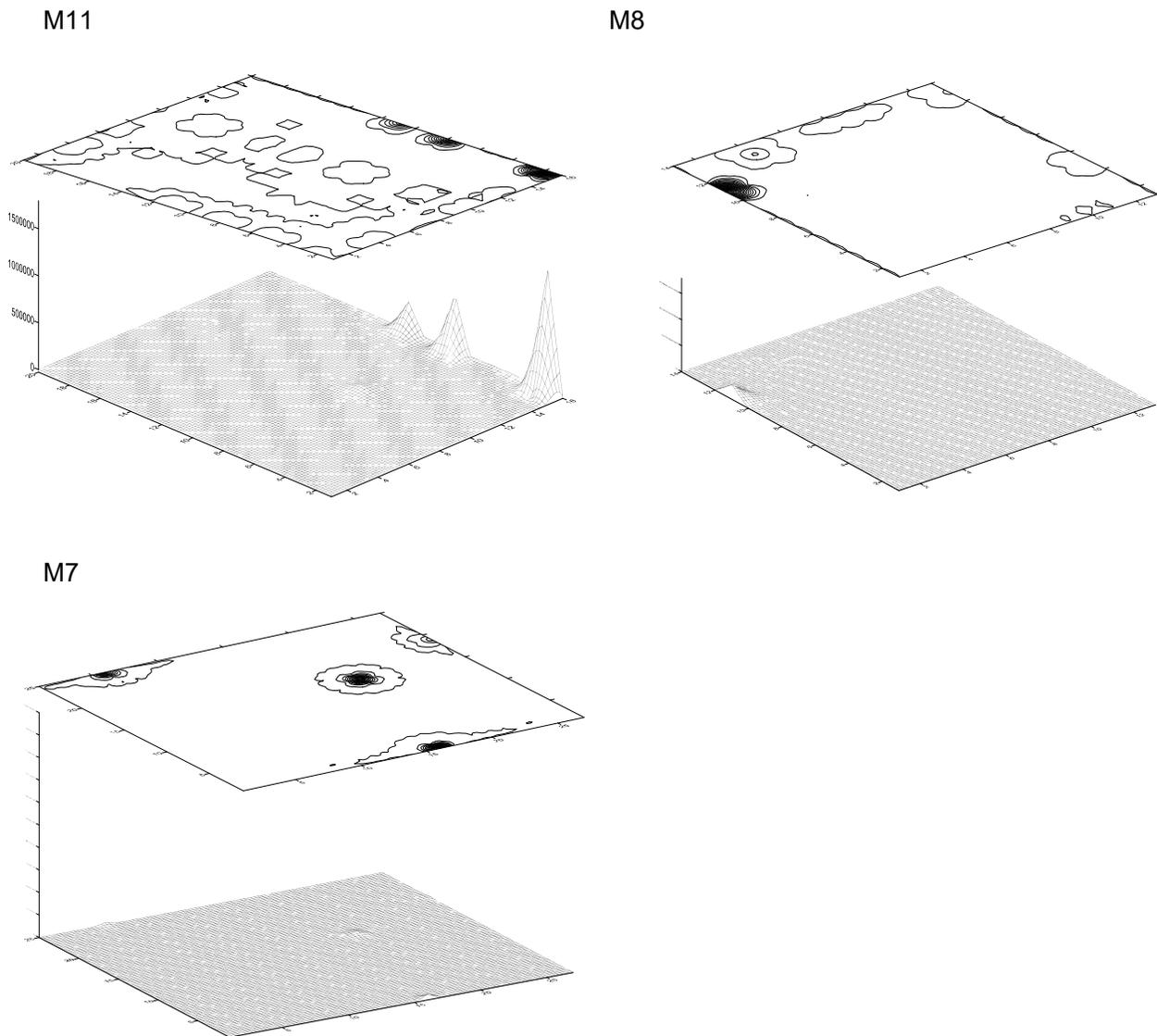


Figura 4.11. Mapas geoestadísticos interpolados de la distribución de la carga de inóculo de CLas estimado con el número de copias de bacterias/ μ l en plantas y Dc de dos huertas de Michoacán (M8 y M11) y una de Veracruz (M7).

4.2.1. Dirección de la carga de inóculo intraparceldaria

En una huerta (T19) de Colima, se observó mayor concentración de CLas en el vector en el perímetro Norte-Este, la cual fue disminuyendo gradualmente hacia el interior (Figura 4.12 A). Lo anterior, supone que la influencia de los vientos del noreste, típicos de las fechas cuando se realizó el muestreo, depositaron a los insectos de huertas aledañas en la periferia de la huerta en estudio. Razi *et al.* (2011), encontraron un mayor número de Dc en dirección norte-centro de abril a mayo e indican que de acuerdo a los periodos del año, existe variabilidad en los patrones de captura cardinales de Dc. En la segunda huerta (Gómez), la mayor cantidad de inóculo en el vector se observó en las direcciones Centro-Oeste y Centro-Este (Figura 4.12 B); este patrón se relaciona con el manejo de la huerta, donde se observa la influencia de la dispersión secundaria.

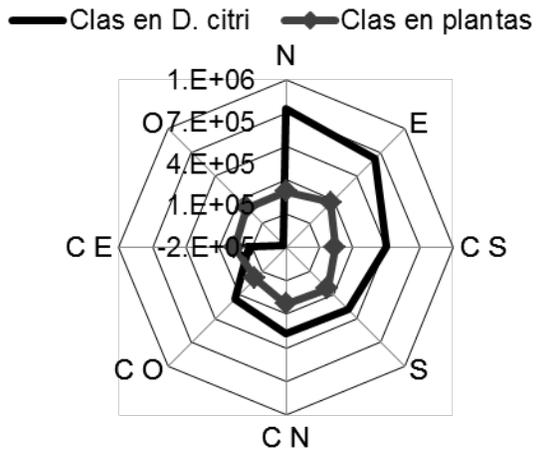
La carga de inóculo en material vegetal, en ambas parcelas fue similar a la del vector. En la primera huerta (T19) se presentó una mayor concentración en la orilla, en dirección Este-Sur con una disminución gradual hacia el interior (Figura 4.12 A). Mientras que en la segunda huerta (Gómez) la carga de inóculo en material vegetal mostró una tendencia mayor en dirección Centro-Este y Centro Sur (Figura 4.12 B).

En la primera huerta de Michoacán (M8) la mayor carga de inóculo se observó en la periferia Norte-Oeste (Figura 4.12 C), mientras que en la segunda huerta (M11) se registró en la periferia Este-Sur (Figura 4.12 D), lo cual puede estar relacionado con la llegada de Dc de huertas adyacentes.

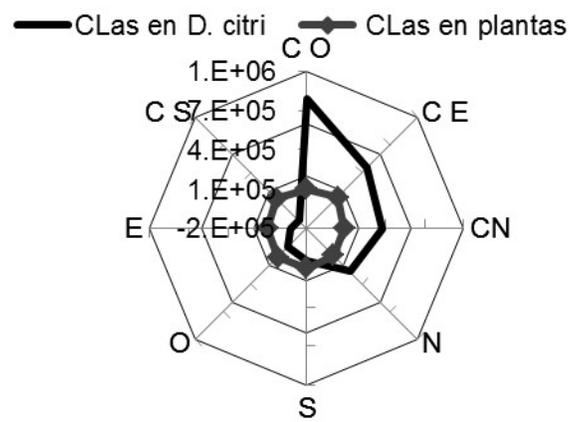
Por otro lado, en la primera (M8) se observó mayor severidad hacia el sur de la misma (Figura 4.12 C), lo cual no se relaciona con la dirección donde se ubica la mayor carga de inóculo. Este resultado puede relacionarse con el proceso de diseminación de la enfermedad. Mann *et al.*, (2012), encontraron que Dc adultos son mayormente atraídos por plantas infectadas con CLas antes de alimentarse de ellas, pero son más atraídos a los árboles no infectados después de alimentarse de los infectados, lo cual promueve la propagación del agente patógeno. En la segunda (M11) la mayor severidad se observó en dirección Este, la cual tuvo la mayor carga de inóculo (Figura 4.12 D).

En la huerta M8 la mayor cantidad de brotes se observó en el Centro-Sur y no mostró relación con la carga de inóculo encontrada en Dc, lo anterior, indica que los insectos pudieron ser acarreados de huertas aledañas. En la huerta M11 se encontró relación entre la cantidad de brotes y la carga de inóculo, cabe mencionar que adyacente al lado Este de la huerta se encontró la presencia de un canal de agua y en el lado sur de la huerta una carretera, lo cual pudo influir en una mayor brotación, así como la incidencia de insectos positivos a CLas provenientes de huertas adyacentes (Figura 4.13). Tiwarie *et al.* (2010) mencionan que adultos de Dc migrantes con carga de inóculo de CLas que posan y se alimentan de brotes nuevos puede dar lugar a una rápida multiplicación de la bacteria en plantas sanas.

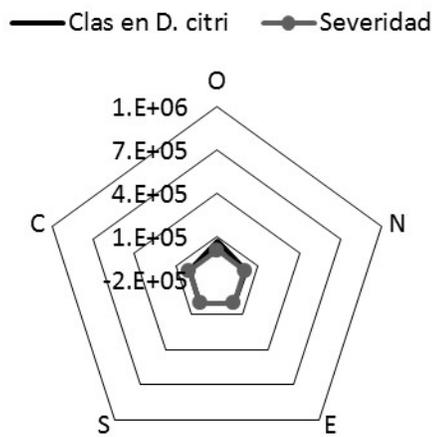
A) T19



B) Gómez



C) M8



D) M11

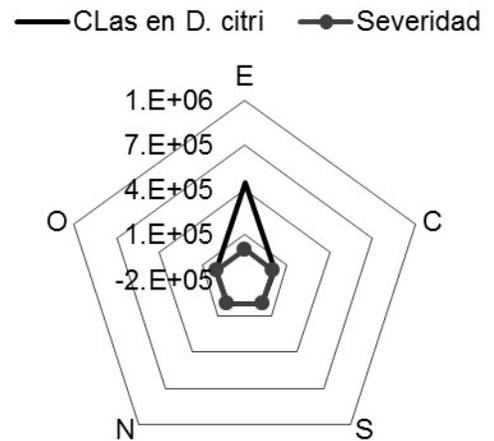
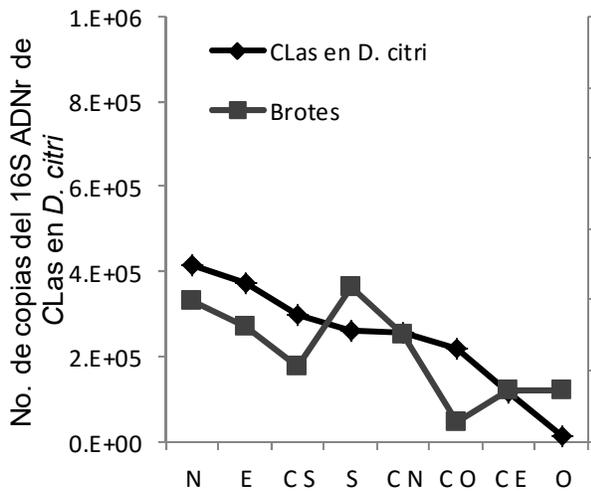
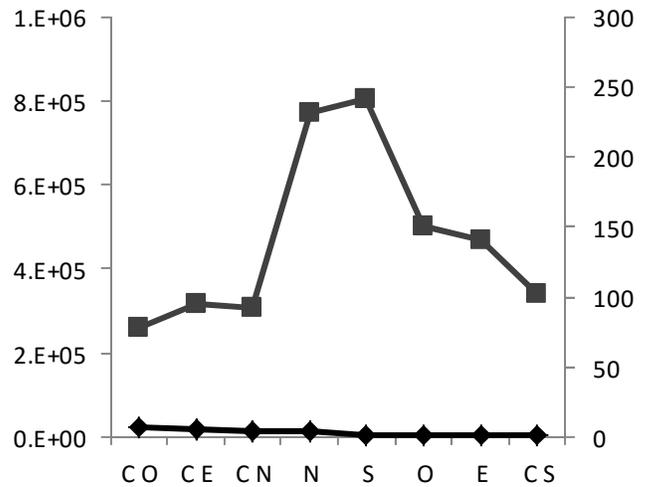


Figura 4.12. Dirección espacial de la carga de inóculo en Dc y material vegetal de dos huertas de Colima: A) T19 y B) Gómez. Dirección espacial de la carga de inóculo en Dc y severidad en dos huerta de Michoacán: C) M8 y D) M11.

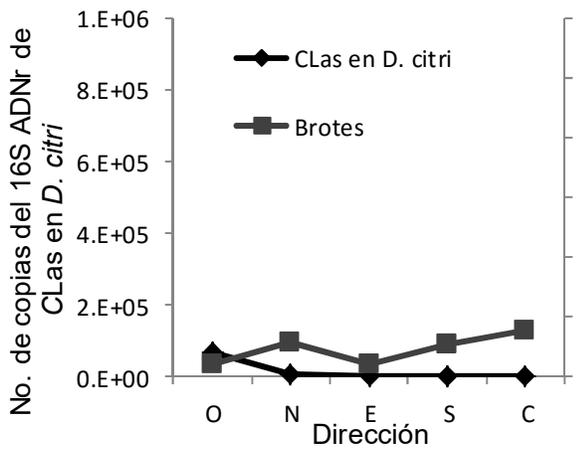
A) T19



B) Gómez



C) M8



D) M11

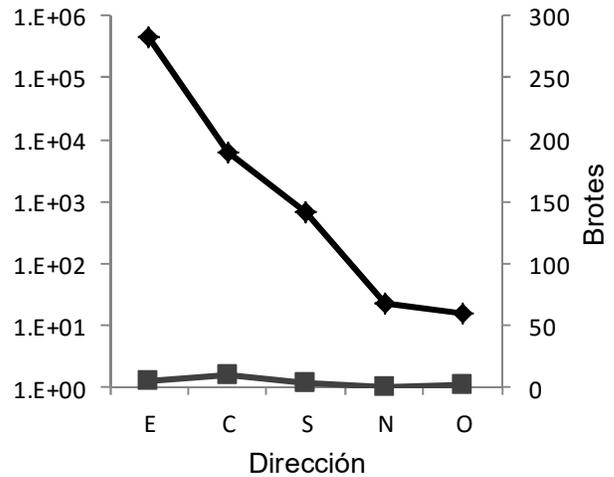


Figura 4.13. Dirección de la carga de inóculo de CLAs (número de copias del gen ADNr 16S) estimada mediante PCR en tiempo real y con respecto a los brotes observados en las huertas T19 y Gómez en el Estado de Colima y M8 y M11 en el Estado de Michoacán.

4.2.2. Estimación de un umbral de adquisición de CLas en *D. citri*

En Colima, al momento de la colecta en campo en la huerta con manejo bajo (T19), la presencia de Dc fue menor, dificultando su captura, mientras que en la huerta con alto manejo (Gómez), se encontró una mayor cantidad de insectos. Sin embargo, la mayor carga de inóculo en el vector se detectó en las muestras de la huerta T19 (Figura 4.14). Lo anterior coincide con el estudio realizado por Tiwarie *et al.* (2010), quienes encontraron menos Dc en huertas abandonadas o con un manejo bajo, pero con una carga de CLas ligeramente mayor que en aquellas que tenían algún tipo de manejo.

En la huerta T19 se obtuvieron 86 muestras de Dc y de tejido vegetal, de las cuales resultaron 85 y 86 positivas a CLas, respectivamente. En la huerta Gómez se colectaron 87 muestras de Dc y de tejido vegetal, de las cuales 82 resultaron positivas a CLas para ambos casos.

En la huerta T19 (manejo baja tecnología) la concentración más baja de CLas fue de 13,900 y 1,185 copias en plantas y Dc, respectivamente (Figura 4.15). Posteriormente, se comenzó a incrementar el número de muestras del vector positivas a CLas. En la huerta Gómez (manejo alto) el incremento de muestras positivas inició en la planta a partir de 2,694 copias, mientras que en muestras positivas del vector a partir de 693 copias de CLas (Cuadro 4.6). Esto sugiere que se requiere un rango de copias entre 2,694 y 13,900 en planta para que Dc pueda adquirir a CLas registrando una concentración bacteriana estimada de 1,185-1,167. Por lo tanto este se podría considerar como el umbral de adquisición de Dc para Dc-limón mexicano.

La concentración planta: vector en este proceso de adquisición fue de 13,900:1,185 y 2,694:1,167. Sin embargo este umbral de adquisición podría variar entre tipo de cítricos.

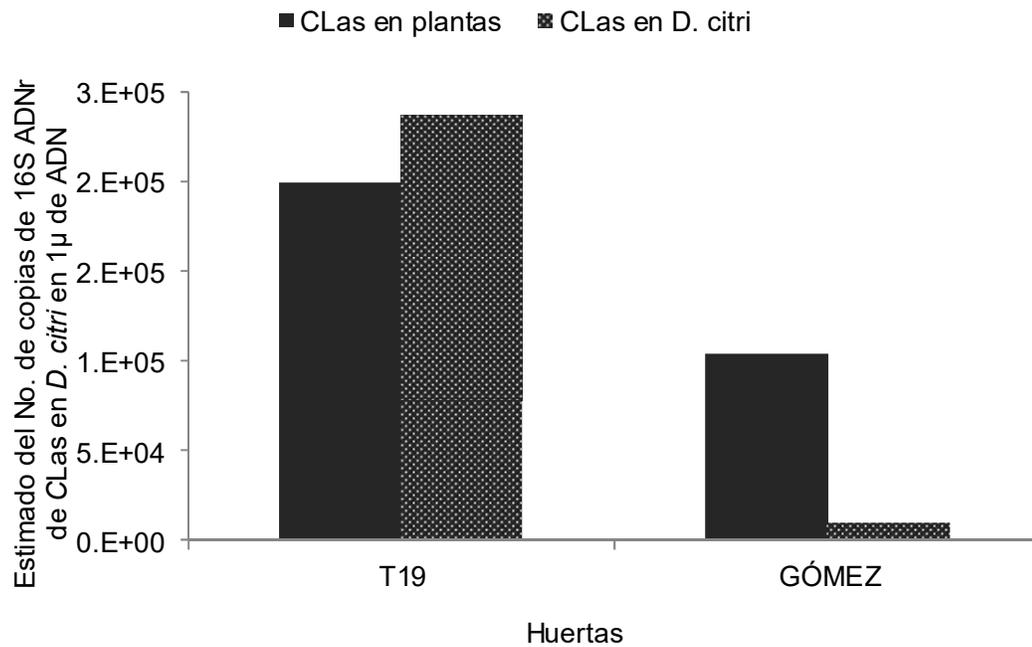
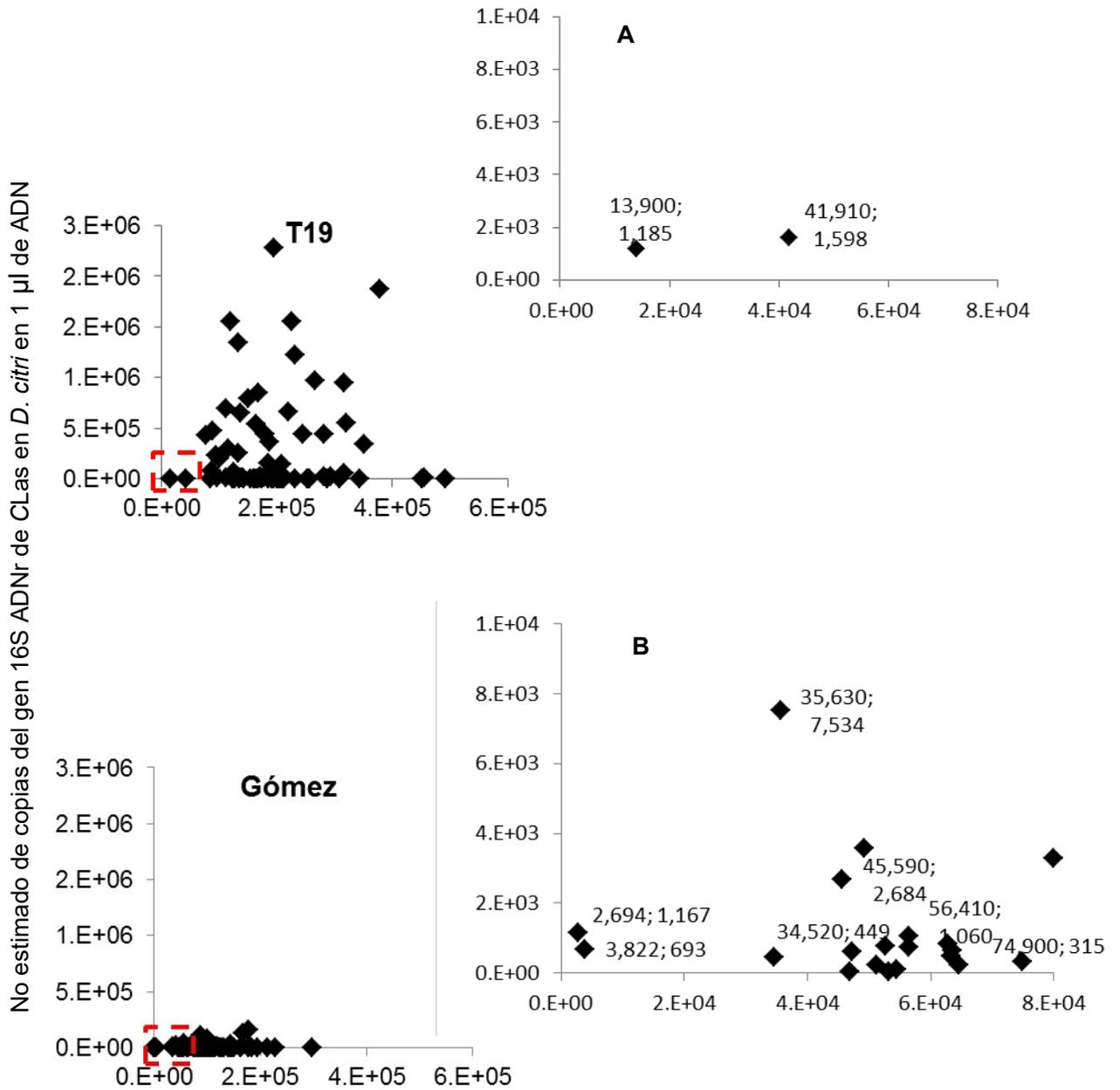


Figura 4.14. Carga de inóculo de CLas en Dc y concentración bacteriana en material vegetal, colectadas en Colima en una huerta con manejo tecnológico bajo (T19) y manejo tecnológico alto (Gómez).



No estimado de copias del gen 16S ADNr de CLas en material vegetal en 1 μ l de ADN

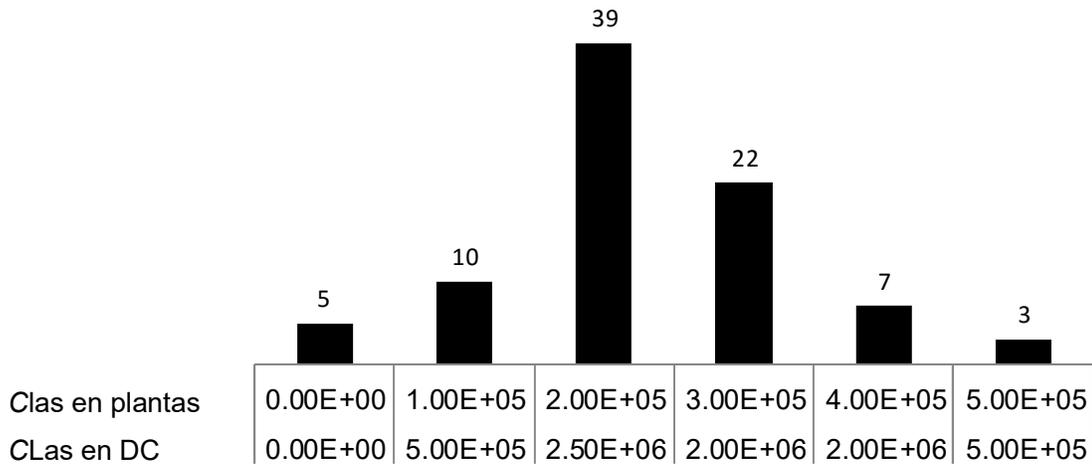
Figura 4.15. Correlación de la concentración de bacteria en plantas y carga de inóculo en Dc, en una huerta con manejo A) bajo (T19) y B) alto (Gómez) en Colima. Graficas A y B Son proyecciones parciales de T19 y Gómez para magnificar los primeros valores positivos de CLas en planta y vector.

Cuadro 4.6. Relación mínima entre el número de copias de CLas entre planta y vector para la ocurrencia de una adquisición exitosa por Dc obtenidos de una huerta con bajo manejo tecnológico (T19) y alto manejo tecnológico (Gómez) en Colima. .

Huerta	Copias/planta	Copias/vector
T19	13,900	1,185
Gómez	2,694	1,167
	3,822	693
Promedio	6805	1,015
Varianza	38,068,817	77,793
STD	6,170	279

Con los resultados obtenidos de las muestras colectadas en los huertos T19 y Gómez se obtuvo el número de muestras positivas de CLas en Dc con respecto a la concentración de CLas en material vegetal e indicaron que el mayor número de muestras positivas del vector (> 80%) se encontraron en el rango estimado de concentración de 1×10^5 a 3×10^5 copias en plantas. Asimismo, se observó que en la huerta con manejo alto (Gómez) a partir de 4×10^5 copias de CLas en la planta no se detectaron muestras de Dc positivas a CLas, a diferencia de la huerta huerta T19 en donde a partir de esta concentración se detectaron muestras positivas a CLas en Dc (Figura 4.16). Galetto *et al.* (2014) correlacionaron significativamente el número de insectos positivos de *Scaphoideus titanus* con respecto a los títulos del Flavescence dorée phytoplasma en planta. Flores-Sánchez (2016) y Flores-Sánchez *et al.* (2015) previamente evidenciaron que el manejo tecnológico alto en cítricos agrios tiene un menor impacto productivo por efecto de CLas, estos resultados muestran claramente que esto se puede explicar por una menor concentración bacteriana en planta y por tanto menor concentración en el vector, lo cual puede justificar un buen manejo tecnológico, principalmente nutricional para reducir impactos productivos al reducir el inóculo potencial regional.

A) T19



B) Gómez

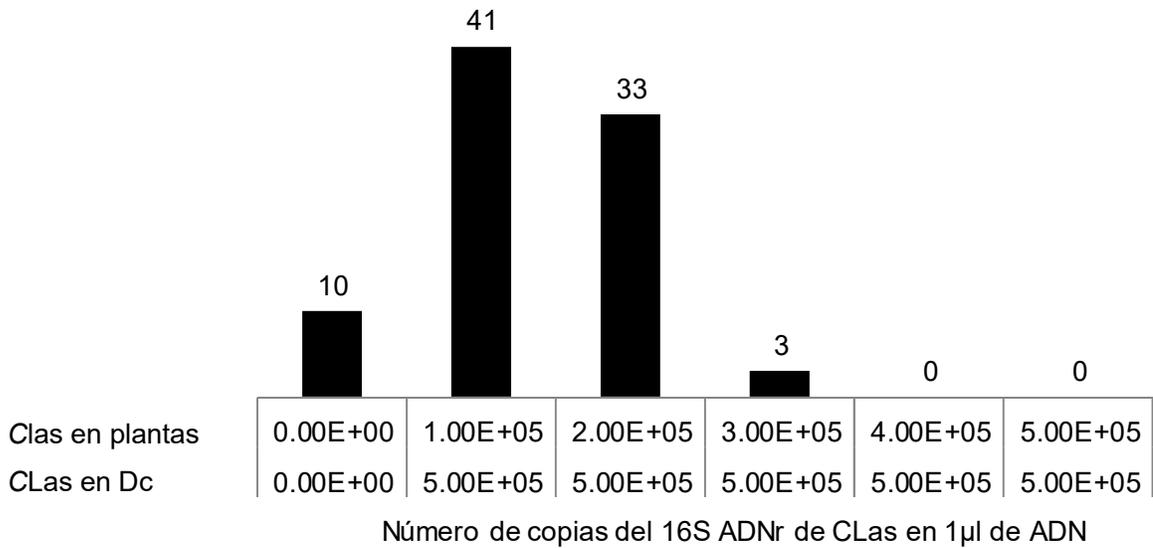


Figura 4.16. Frecuencia de muestras de Dc y tejido vegetal categorizada en clases de concentración a CLas detectado en la huerta T19 con bajo manejo tecnológico (A) y Gómez con alto manejo tecnológico (B).

5. CONCLUSIÓN

Distribución regional

Existe una relación directa de la carga de inóculo de CLas estima en el vector *D. citri* con el estatus epidémico de la enfermedad, en los distintos escenarios citrícolas del Pacífico, Centro-Golfo y Península de Yucatán.

En Colima y Michoacán, entidades con alta intensidad epidémica con predominio de huertas comerciales de limón mexicano, la concentración de CLas en el vector fue muy alta con cargas máximas estimadas en 2.5×10^7 copias por huerta, mientras que la carga máxima estimada en Yucatán, donde existe una marcada influencia de traspatios urbanos y rurales con naranja y limón persa, fue de 5×10^6 y en Veracruz, donde predominan huertas de naranja y limón persa, 4×10^2 copias por huerta.

En Colima y Michoacán, los resultados estimados de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* en función de la carga bacteriana en planta muestran una curva de tipo sigmoideal, e indican que la tasa promedio de la carga de inóculo de CLas en *D. citri* es estadísticamente similar en ambos con $b^{-1} = 13, 599,314$ ($r^2=0.72$) y $b^{-1} = 14, 883,248$ ($r^2=0.87$) para Colima y Michoacán, respectivamente. Sin embargo, en Michoacán la condición de la enfermedad no es endémica por lo que la dispersión de CLas en *D. citri* se encuentra bajo un proceso activo y de alto riesgo.

Los resultados en los estados de la Península de Yucatán y, específicamente, Centro-Golfo, sugiere una condición de baja prevalencia y focos iniciales. El riesgo de dispersión es latente sin un manejo adecuado del vector.

La diferencia en la cantidad de bacteria entre regiones, sugieren que existen diferencias en las eficiencia de adquisición-transmisión que puede estar relacionado con las características asociadas a la fisiología de los distintos tipos de cítricos, variabilidad genética de insecto o del patógeno o ambos, así como los efectos climáticos, particularmente la temperatura. Por lo cual, es necesario realizar estudios adicionales

de variabilidad genética del vector y la bacteria, y estudios específicos de transmisibilidad para las condiciones de México.

Distribución Intraparcelaria

El patrón espacial parcelario de concentración de CLas en el vector y planta está en función de la cronicidad de la enfermedad y las intensidades de los escenarios epidémicos presente en México.

La carga de inóculo mostró un comportamiento marcado de efecto de borde. Sin embargo, se observaron características particulares relacionadas a la endemidad de la enfermedad en las regiones y al manejo agronómico de las huertas.

En Colima existió una mayor carga de inóculo en la periferia (4×10^6 copias) y menor en el centro (2×10^6 copias) en la huerta con manejo tecnológico bajo, así como una menor carga de inóculo en la periferia (9×10^4 copias) y mayor en el centro (1×10^5 copias) en la huerta con manejo tecnológico alto. La dispersión de CLas en las huertas de Michoacán y Veracruz se encuentra bajo un proceso activo de dispersión con un avance desde los bordes hacia el interior de las huertas. Los resultados de cuantificación indican 3×10^5 y 2×10^2 copias y 1×10^5 y 1×10^2 copias en las periferias y en el centro, respectivamente. En Puebla las muestras colectadas fueron negativas.

6. RECOMENDACIONES

La comprensión de la potencial dispersión regional de CLas estimada mediante la carga de inóculo de la bacteria en *D. citri* puede ser empleado como un indicador de manejo regional denominados ARCO's para optimizar la estrategia y minimizar el impacto del HLB en México.

En regiones donde la enfermedad es endémica, como Colima y la carga de inóculo es mayor y uniforme, se sugiere reforzar las ARCO's en la proximidad a otras áreas citrícolas para disminuir el movimiento externo de inóculo. El control del vector se debe incorporar a un programa de manejo integrado en la zona endémica. Aunque Michoacán no tiene una condición endémica como Colima su carga de inóculo es análoga a la de este estado, por lo que las ARCO's deben optimizarse al máximo con un programa de control riguroso.

En áreas de recién ingreso de CLas o de baja prevalencia se sugiere continuar con las ARCO's dirigiendo aplicaciones estratégicas químicas y biológicas en parcelas y traspatios con fines de prevención y manejo. De acuerdo a los resultados de éste trabajo, se debe aplicar y monitorear en la periferia donde se concentra la mayor carga de inóculo. Lo anterior para hacer eficiente el recurso, incrementar el área a proteger y disminuir el impacto ambiental.

Asimismo, se recomienda continuar con los estudio de variabilidad genética de *D. citri* y CLas para determinar la implicación de la variabilidad genética en la carga del inóculo, con el fin de diseñar estrategias de precisión para el manejo regional de la enfermedad.

7. LITERATURA CITADA

- Aguilera, P., Ruiz, T. M., Rocha, M. M. G., Pineda, O. B., Chánez, C. M. E. 2014. PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 175-201 pp.
- Alemán, J., Baños, H., y Ravelo, J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica. Revista de Protección Vegetal 22(3):154-165.
- Arauz-Cavallini, L. F. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 443 p.
- Bassanezi, R. B. 2010. Epidemiology of huanglongbing and its implications on disease management. 2° Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. 30 de Julio, Mérida, Yucatán, México .
- Bassanezi, R. B., Montesino, L. H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P. T., Gottwald, T. R., Amorim, L., and Bergamin Filho, A. 2013. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. Plant Disease 97:789-796.
- Beattie, G. A. C., Holford, P., Haigh, A. M., and Broadbent, P. 2009. On the origins of Citrus huanglongbing, *Diaphorina citri* and *Trioza erythrae*. Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing, December 2008. Orlando, FL, USA. 23–56 pp.
- Boina, D., Meyer, W. L., Onagbola, E. O., and Stelinski, L. L. 2009. Quantifying Dispersal of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) by immunomarking and potential impact of unmanaged groves on commercial citrus management. Environmental Entomology 38(4):1250-1258.
- Bonani, J. P., Appezzato-da-Gloria, B., Fereres, A., Engels, F. E., and Lopes, J. R. S. 2008. Leaf age influencing acquisition of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by the

psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama. International Research Conference on Huanglongbing.249 p.

Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88 (1):7-37.

Burckhardt, D. and Ouvrard, D. 2012. A revised classification of the jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea). *Zootaxa* 3509:1–34.

Campbell, B. C., Steffen-Campbell, J. D., and Gill, R. J. 1994. Evolutionary origin of whiteflies (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae) inferred from 18S rDNA sequences. *Insect Molecular Biology* 3(2):73–88.

Catling, H. D. 1970. Distribution of the psyllid vectors of citrus greening disease, with notes on the biology and bionomics of *Diaphorina citri*. *FAO Plant Protection Bulletin* 18: 8-15.

Cen, Y., Yang, C., Holford, P., Beattie, G. A. C., Spooner-Hart, R N., Liang, G., Deng, X. 2012. Feeding behavior of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 143(1):13-22.

Chien, C. C and Chu, Y. I. 1996. Biological control of citrus *Diaphorina citri* in Taiwan. *International Journal of Pest Management* 34: 93-105.

Coletta-Filho, H. D., Takita, M. A., Targon, M. L. P. N., and Machado, M. A. 2005. Analysis of 16S rDNA Sequences from citrus huanglongbing bacteria reveal a different “*Ca. Liberibacter*” strain associated with citrus disease in São Paulo. *Plant Disease* 89(8):848-852

Cortez-Madrugal, H., Sánchez-Saavedra, J. M., Díaz-Godínez, G. and Mora-Aguilera, G. 2014. Enzymatic Activity and Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi from Central and Southeastern Mexico to *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Southwestern Entomologist* 39(3):491-502

Coy, M., Stelinski, L., and Alfred, L. 2015. Great variability in the infection rate of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in field populations of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Florida. *Florida Entomologist* 98:356-357.

- Da Graca, J. V. 2008. Biology, history and world status of Huanglongbing. *In*: memorias del I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los Citricos *Candidatus Liberibacter spp*) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). 7-9 de Mayo, 2008. Hermosillo, Sonora, México. 1-7 pp.
- Daugherty, M. P., Bosco, D., and Almeida, R. P. P. 2009. Temperature mediates vector transmission efficiency: inoculum supply and plant infection dynamics. *Annals of Applied Biology* 155:361-369.
- Dharajothi, B., Verghese, A., and Tandon, P. L. 1989. Ecological studies on citrus psylla, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) with special reference to its spatial distribution and sampling plan. *Entomon* 14(3-4):319-324.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Esquivel-Chávez, F. 2016. Epidemiología del HLB bajo tres escenarios regionales en México. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 167p.
- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Flores-Sánchez, J. L., López-Arroyo, J. I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782.
- Fagen, J. R., Giongo A., Brown, C. T., Davis-Richardson, A. G., Gano K. A., and Triplett, E. W. 2012. Characterization of the relative abundance of the citrus pathogen *Ca. Liberibacter asiaticus* in the microbiome of its insect vector, *Diaphorina citri*, using high throughput 16s rRNA sequencing. *The Open Microbiology Journal* 6:29–33.
- FAO. 2012. Frutos cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf
- FAO. 2014. Anuario Estadístico de la FAO. <http://www.fao.org/3/a-i3620e.pdf>

- Félix-Portillo, M., Martínez-Quintana, J. A., Arredondo-Bernal, H. 2011. Estacionalidad de la infectividad de HLB (Huanglongbing) en Colima. 2° Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Diciembre 2011, Tecomán, Colima. 17-21 pp.
- Filho, A. B., Inoue-Nagata, A. K., Bassanezi, R. B., Belasques, Jr. J., Amorim, L., Macedo, M. A., Barbosa, J. C., Willocquet, L., Savary, S. 2016. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Security* 8(1): 221-238.
- Flores-Sánchez, J. 2011. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing de los cítricos (HLB) en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 75 p.
- Flores-Sánchez, J. 2016. Epidemiología del HLB bajo tres escenarios regionales en México. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 289 p.
- Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Velázquez-Monreal, J. J., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J. I. y Acevedo-Sánchez, G. 2013. Caracterización Epidemiológica del HLB en Colima con énfasis en el subsistema manejo. *In: Avances de Investigación del Instituto de Fitosanidad-Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos*. 6 de Diciembre. Texcoco, México.
- Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., López-Arroyo, J. I y Robles-García, P. 2015. Pérdidas en producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:195-210
- Fonseca, O., Valera, N., y Vásquez, C. 2007. Registro y ciclo de vida de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en tres hospederos en el Estado Lara, Venezuela. *Entomotropica* 22(3):145-152.
- García-Pérez, F. 2013. Caracterización morfológica y genética de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) de Rutáceas en Cazones, Veracruz, México. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados. Montecillos, México. 75p.
- Galetto, L., Miliordos, D., Roggia, C. 2014. Acquisition capability of the grapevine Flavescence dorée by the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* Ball correlates with phytoplasma titre in the source plant. *J Pest Sci* 87:671.

- Gottwald T. R., Bergamin-Filho, A., Bassanezi, R., Amorim, L., Irey, M., Zhao, X., and Auberi, B. 2006. Concepts in Huanglongbing epidemiology. *In* The international workshop for prevention of citrus greening disease in severely infested areas. December 6 and 7, Ishigaki, Japan. 1-10 pp.
- Gottwald, T. R. 2007. Citrus canker and citrus huanglongbing, two exotic bacterial diseases threatening the citrus industries of the Western Hemisphere. *Outlooks on Pest Management* 18:274–279.
- Gottwald, T. R., Da Graça, J. V., Bassanezi, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact plant health progress. doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV
- Gottwald, T. R. and Irey, M. 2008. The plantation edge effect of HLB – A geostatistical analysis. *Proc. International Research Conference on Huanglongbing*, Orlando. December 2008. 265-268 pp.
- Gottwald, T. R. 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48:119–39
- Grafton-Cardwell, E. E., Stelinski, L. L., Stansly, P. A. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology* 58:413–432.
- Gutiérrez, A. P. and Ponti, L. 2013. Prospective analysis of the geographic distribution and relative abundance of Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae) and citrus greening disease in North America and the Mediterranean Basin. *Florida Entomologist* 96(4):1375-1391.
- Halbert, S. E. and Núñez, C. A. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Rhynchota: Psyllidae) in the Caribbean basin. *Florida Entomologist* 87:401–402.
- Halbert, S. E. and Manjunath, K. L. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87:330–353.

- Hall, D. G. 2008. Biology, history and world status of *Diaphorina citri* North American Plant Protection Organization. Proceedings of the Taller Internacional Sobre Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos. 7 al 9 de Mayo, Hermosillo, Sonora, México. 11 p.
- Hall, D. G., Richardson, M. L., Ammar, E. and Halbert, S. E. 2012. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. Entomología Experimentalis et Applicata 146:207-223.
- Henson, J. M. and French, R. C. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Plant Pathology 31:81-109.
- Hernández-Fuentes, L. M., Urias-López, M. A., Gómez-Jaimes, R., López-Arrollo, J. I., Velázquez-Monreal, J. J., Orozco-Santos, M. 2014. El Huanglongbing y su vector psílido en limón persa en Nayarit: recomendaciones para su manejo. Libro Técnico Num. 3. ISBN: 978-607-37-0283-6. 75 p.
- Hernández-Juárez, C., Villegas-Jiménez, N., Colmenares-Aragón, D., Rivera-Díaz, J. B., Sandoval-Rodríguez, A., Cárcamo-Rodríguez, A., y Mora-Aguilera, G. 2008. Metodología de estudios epidemiológicos, caso Huanglongbing -*Diaphorina citri*. In: Taller Internacional de Vigilancia Epidemiológica para el pronóstico de plagas. 19 - 23 de Mayo de 2008, San Luis Potosí, SLP, México.
- Hill, B. L. and Purcell, A. H. (1995) Acquisition and retention of *Xylella fastidiosa* by an efficient vector, *Graphocephala atropunctata*. Phytopathology 85: 209–212.
- Hung, T. H., Hung, S. C., Chen, C. N., Hsu, M. H., and Su, H. J. 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 Pathol 53:96-102.
- Iftikhar, Y., Rauf, S., Shehzad, U., and Zahid, M. A. 2014. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management– A review. Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences 15(1):1-11
- Jagoueix, S., Bové, J. M., Garnier, M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the protobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 44:379-386.

- Jeong-Soon, K. and Wang, N. 2009. Characterization of copy numbers of 16S rADN and 16S rRNA of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and the implication in detection in planta using quantitative PCR. BMC Research Notes 2:37. Doi: 10.1186/1756-0500-2-37.
- Li, W., Hartung, J. S., and Levy, L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. Journal of Microbiological Methods 66(1): 104-15.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., and Mroginski, L. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 58-59 pp.
- López-Arroyo, J. I., Peña, M. A., Rocha Peña, M. A. & Loera, J. 2005. Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), pp. C68. In: VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., México
- López-Bautista, V., Martínez- Bustamante, V., Mora-Aguilera, G., Coria-Contreras, J., Alanis-Martínez, I., Gutierrez-Espinosa, A., Loeza-Kuk, E. y Robles-García, P. 2015. Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en raíz de *Citrus sinensis*, bajo condición asintomática. In: XVII Congreso Internacional y XLII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología S 195. 19-23 de Julio, Ciudad de México, México.
- López-Bautista, V., Mora-Aguilera, G., Martínez-Bustamante, V., Domínguez-Monge, S., Robles-García, P., Alanis-Martínez, I., Gutiérrez-Espinosa, M. A. 2016. Interacción de CLas y CTV en dosel y raíz de naranja dulce, bajo una condición asintomática. In: XVIII Congreso Internacional y XLIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. 3-7 de Julio, Ciudad de México, México.
- López-Collado, J., López-Arroyo, J. I., Robles-García, P. L. and Márquez-Santos M. 2013. Geographic distribution of habitat, development, and population growth rates of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, in Mexico. Journal of Insect Science 13:114.
- Lopes, S. A., Luiz, F. Q. B. F., Martins, E. C., Fassini, C. G., Sousa, M. C., Barbosa, J. C. and Beattie, G. A. C. 2013. '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' titers in citrus and acquisition rates by *Diaphorina citri* are decreased by higher temperature. Plant Disease 97(12):1563-1570.

- Manjunath, K. L., Halbert, S. E., Ramadugu, C., Webb, S., and Lee R. F. 2008. Detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Bacteriology* 98(4):387-396.
- Manjunath, K. L., Ramadugu, C., Rodriguez, E., Kubota, R., Shibata, S., Hall, D. G., Roose, M. L., Jenkins, D., Lee, R. F. 2015. A rapid field detection system for citrus huanglongbing associated '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from the psyllid vector, *Diaphorina citri* Kuwayama and its implications in disease management. *Crop Protection* 68:41-48.
- Mann, R. S., Ali, J. G., Hermann, S. L., Tiwari, S., Pelz-Stelinski, K. S., Alborn, H. T. and Stelinski, L. L. 2012. Induced release of a plant-defense volatile 'Deceptively' attracts insect vectors to plants infected with a bacterial pathogen. *PLoS Pathog* 8(3): e1002610. doi:10.1371/journal.ppat.1002610.
- Martínez-Bustamante, V., López-Bautista, V., Alanis-Martínez, I., Mora-Aguilera, G., Gutiérrez-Espino, M. A., Loeza-Kuk, E., Robles-García, P., Esquivel-Chávez, F. 2015. Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el dosel de naranjo (*Citrus sinensis*), con infección asintomática. *In: XVII Congreso Internacional y XLII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología* S 203. 19-23 de Julio, Ciudad de México, México.
- Martínez-Carillo, J. L. 2008. *Diaphorina citri* Kuwuyama, Psílido asiático de los cítricos. Ficha Técnica SAGARPA- SENASICA- SINAVEF. [www: senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=21365&IdUrl=39203](http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=21365&IdUrl=39203). Acceso 24-07-2016.
- Mead, F. W. and Fasulo, T. R. 2011. Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Insecta: Hemiptera: Psyllidae). University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/in160/>. Consultado en Marzo de 2016.
- Microbial. 2009. Guía de interpretación de resultados. Sistemas de detección de patógenos por PCR a tiempo real. http://www.microbialsystems.com/web/docs/Guia_interpretacion_resultados_SPAV_2.pdf. Consultado el 2 de abril de 2016
- Morgan, J. K., Zhou, L., Li, W., Shatters, R. G., Keremane, M., and Duan, Y. P. 2012. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. *Molecular and Cellular Probes* 26:90-98.

- Mora-Aguilera, G., Nieto-Angel, D., Campbell, L. C., Teliz, D., and García, E. 1996. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86:70-78.
- Mora- Aguilera, G. 2008. Bases de Estudios Epidemiológicos para el Manejo de Patosistemas Agrícolas [En línea]. Disponible en http://langif.uaslp.mx/documentos/presentaciones_internacionl/01/drmora.pdf (revisado el 11 de abril de 2016).
- Mora-Aguilera, G., Flores-Sánchez, F., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., Oropeza-Salín, C., Flores-Olivas, A., González-Gómez, R., y Robles-García, P. 2014a. Vigilancia Epidemiológica y Estatus Actual del Amarillamiento Letal del Cocotero, Punta Morada de la Papa y Huanglongbing de los Cítricos (HLB) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 120-131.
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. L., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, D., y González-Gómez, R. 2014 b. Situación Actual y Perspectivas del Manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108-119.
- Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Flores-Sánchez, J., Hernández, R., González- Gómez R. and Robles-García P. 2014c. Regional Epidemiology: A new frontier and challenge in plant pathology. Pp: 6 *In*: 47° Congreso Brasileiro de Fitopatología. 17 - 22 de Agosto. Londrina, Paraná. Brasil
- Mukhopadhyay, S. 2011. Plant virus, vector epidemiology and management. 1st edition. Science Publishers; Distributed by CRC Press, Enfield, NH Boca Raton, FL. 503p.
- Nava, D. E., Torres, M. L., Rodrigues, M. L. D., Bento, M. S., Parra, J. R. P. 2007. Biology of *Diaphorina citri* (Hem., Psyllidae) on different host plants at different temperatures. *Journal of Applied Entomology* 131:709-715.
- Ortega-Arenas, L. D., Villegas-Monter, Á., Ramírez-Reyes, A. J., Mendoza-García, E. E. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en cazonas, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana* 29(2):317-333.
- Pennypacker S. P., H. D. Knoble, C. D. Antle and L. V. Madden (1980) A flexible model for studying plant disease progression. *Phytopathology* 70:232-235.

- Pelz-Stelinski, 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* 3(5):1531-1541.
- Ramírez-Abarca, O., González-Razo, F. J., Omaña-Silvestre, J. M., Matus-Gardea, J. A., Rebollar-Rebollar, S., Kido-Cruz, A. 2008. Situación económica de la producción de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) en los estados de Oaxaca y Guerrero, México. *Revista Mexicana de Agronegocios* 12(22):570-580.
- Razi, M. F., Khan, I. A., Jaskani, M. J. 2011. Citrus plant nutritional profile in relation to Huanglongbing prevalence in Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 48(4): 299-304.
- Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., López-Arroyo, J. I., Flores-Virgen, R. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de Limón Mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el Estado de Colima, México. *Revista Chapingo serie Horticultura* 19(1):15-31.
- Salcedo, D., Hinojosa, R., Mora-Aguilera, G., Covarrubias, I., De Paolis, F., Cíntora, C. 2010. Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HLB) en la cadena cítrica mexicana. México: IICA, SAGARPA, SENASICA. 120 p.
- Sandoval-Rincón, J. A. 2011. Paquete tecnológico de cítricos. www.inifap.gob.mx/Documents/inicio/paquetes/citricos.pdf. Acceso Julio 2016
- Santivañez, C. T., Mora-Aguilera, G., Díaz, P. G., López, A. J. I., Vernal, H. P. 2013. Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. FAO. Roma, Italia. 72 p.
- Schena, L., Li-Destri-Nicosia, M. G., Sanzani, S. M., Faedda, R., Ippolito, A., and Cacciola, S. O. 2013. Development of quantitative PCR detection methods for phytopathogenic fungi and oomycetes. *Journal of Plant Pathology* 95 (1):7-24.
- Sétamou, M. and Bartels, D. W. 2015. Living on the edges: Spatial niche occupation of asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae), in Citrus Groves. *Plos One*. 10(7): e0131917.doi:10.1371/journal.pone.0131917.

- SENASICA. 2016. Huanglongbing de los cítricos. <http://senasica.gob.mx/?id=4512>. Consultado en Julio 2016.
- Shapiro, L. R., Seidl-Adams, I., De Moraes, C. M., Stephenson, A. G., Mescher, M. C. 2014. Dynamics of short- and long-term association between a bacterial plant pathogen and its arthropod vector. *Scientific Reports*. 4:4155. DOI: 10.1038/srep04155.
- SIAP, 2016. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>. acceso Julio 2016
- Skelley, L. H. and Hoy, M. A. 2004. A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. *Biological Control* 29: 14-23.
- Tabachnick, W. J. 2015. *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) Vector competence for the citrus greening pathogen '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Journal of Economic Entomology* 108(3):839-848.
- Teixeira, D. C., Saillard, C., Couture, C., Martins, E. C., Wulff, N. A., Eveillard-Jagoueix, S., Yamamoto, P. T., Ayres, A. J., Bové, J. M. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:139-150.
- Tiwari, S, Lewis-Rosenblum, H., Pelz-Stelinski, K., Stelinski, L. L. 2010. Incidence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection in abandoned citrus occurring in proximity to commercially managed groves. *Journal of Economic Entomology* 103:1972-1978.
- Trujillo-Arriaga, J. 2010. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. *In: Memorias del 2° Taller Internacional del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los cítricos*. 19-23 Julio, Mérida, Yucatán, México. 141-149 pp.
- Tsai, J., H and Liu, Y. H. 2000. Biology of *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) on four host plants. *Journal of Economic Entomology* 93:1721–1725.
- Tsai, J. H., Wang, J. J., Ying-hong, L. 2002. Seasonal abundance of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae) in Southern Florida. *Florida Entomologist* 85(3):446-451.

- Velázquez-Monreal, J. J., Robles-González, M. M., Manzanilla-Ramírez, M. A., Carrillo-Medrano, S. H., and Orozco-Santos, M. 2011. Dinámica poblacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) en el estado de Colima. pp. 161-168 pp. *In*: 2° Simp. Nac. sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. 5 y 6 de Diciembre, Montecillo, México. ISBN 978-607-425-680-2.
- Wenninger, E. J. and Hall, D. G. 2007. Daily timing of and age at mating in the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist* 90:715-722.
- Wenninger, E. J., Stelinski, L. L., and Hall, D. G. 2008. Behavioral evidence for a female-produced sex attractant in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 128:450–459.
- Wenninger, E. J., Hall, D. G., and Mankin, R. W. 2009. Vibrational communication between the sexes in *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). *Annals of the Entomological Society of America* 102:547–555.
- White I. M., and Hodkinson, I. D. 1985. Nymphal taxonomy and systematics of the Psylloidea (Homoptera). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology* 50:153-301.
- Wu, F., Cen, Y., Deng, X., Chen, J., Xia, Y., and Liang, G. 2015. Movement of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) adults between huanglongbing-infected and healthy citrus. *Florida Entomologist* 98(2):410-416.
- Yang, Y., Huang, M., Beattie, G. A. C., Xia, Y., Ouyang, G., y Xiong, J. 2006. Distribution, biology, ecology and control of the psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama, a major pest of citrus: a status report for China. *International Journal of Pest Management* 52:343–352.

8. APÉNDICES

Apéndice 1. Número de huertos muestreados por región

Huertos muestreados	Región						
	Península de Yucatán			Pacífico		Centro-Golfo	
	Yucatán	Campeche	Quintana Roo	Colima	Michoacán	Puebla	Veracruz
Muestreo parcelario	20	10	2	17	35	4	21
Muestreo Intraparcenario	0	0	0	2	2	1	2
No. de muestras totales por región		32			56		28

Apéndice 2. Materiales para la colecta de insectos y material vegetal en árboles de cítricos.

Material general:

- Mapa de la zona incluyendo rutas, huertas, etc.
- Bitácora de campo
- Tabla de campo
- Etiquetas
- Lápices
- Pinturas de aerosol para marcar árboles
- GPS
- Cámara digital
- Marcadores indelebles
- Sanitas

Para insectos:

- Frascos de plástico
- Alcohol al 90%
- Pinceles
- Red entomológica
- Aspiradores manuales

Para tejido vegetal:

- Bolsas de plástico (polipapel)
- Tijeras para cortar material vegetal
- Desinfestante
- Hielera
- Gel refrigerante o Hielos

Apéndice 3. Método de extracción de ADN de insectos para la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* empleando el Kit Axygen® (Protocolo modificado por el Área de Diagnóstico de la Dirección General de Sanidad Vegetal, 2013).

1. Colocar 10 insectos sobre una sanita y dejar se evapore el alcohol.
2. Precalear el buffer TE a 65 °C para usarse posteriormente.
3. Transferir los insectos en un tubo de 1.5 ml estéril, agregar 350 ul de buffer PBS 1X pH 7.2 (Fosfato de potasio 50mM, NaCl 150 mM). Agregar 500 ul de la solución AP1 y 100 ul de la solución AP2.
4. Agregar un balín (pequeño) y macerar los insectos en el disruptor por 30 rpm durante 3min.
5. Centrifugar 8 min a 14 000 rpm.
6. Preparar la columna y etiquetar los tubos de recolección.
7. Transferir el sobrenadante a la columna (aprox. 750 ul)
8. centrifugar 1 min 8000 rpm. desechar el sobre nadante.
9. Agregar 700 ul de la solución AW1. Centrifugar 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
10. Agregar 700 ul de la solución AW2. Centrifugar 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
11. Agregar 300 ul de la solución AW2. Centrifugar 2 min a 14000 rpm. Retirar cuidadosamente la columna para evitar que ésta entren contacto con el precipitado. pasar a un tubo de 1.5ml y etiquetar.
12. Agregar 35 ul de TE precalentado a 65 °C, incubar 5 min a temperatura ambiente y centrifugar 1 min a 8000 rpm.
13. Repetir el paso 12.
14. Desechar la columna y almacenar el ADN a -20°C

Apéndice 4. Método de extracción de ADN de Dc para la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* empleando Kit Wizard® SV Genomic ADN Purification System (Protocolo modificado por el Área de Diagnóstico de la Dirección General de Sanidad Vegetal)

1. Transferir 10 insectos en un tubo de 1.5 ml estériles, agregar 400ul de PBS 1X pH 7.2, (Fosfato de potasio 50mM, NaCl 150 Mm) y macerar. Centrifugar unos segundos.
2. Adicionar 350 ul de Buffer Lysis Wizard® SV y dar vortex unos segundos.
3. Centrifugar a 8 min a 12000 rpm.
4. Preparar la columna y etiquetar tubos de recolección.
5. Pasar el sobrenadante a la columna (650 ul).
6. Centrifugar 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
7. Agregar 650 ul de la solución de lavado (Wash Solution, CWA; with 95% etanol added). Centrifugar a 1 min a 8000 rpm. Desechar el sobrenadante.
8. Repetir el paso 7.
9. Agregar 300 ul de la solución de lavado. Centrifugar 2 min a 14000 rpm. Retirar cuidadosamente la columna para evitar que ésta entre en contacto con el precipitado. Pasarla a un tubo nuevo etiquetado.
10. Agregar en el centro de la columna 35 ul de agua libre de nucleasas (Nuclease-Free Water), incubar 5 min a temperatura ambiente y centrifugar 1 min a 8000 rpm. Repetir el paso 10.
11. Desechar la columna y almacenar el ADN en hielo y /o a 4° C para su uso inmediato en PCR o bien almacenar a -20° C para su uso posterior.

Apéndice 5. Protocolo CTAB 2% para extracción de ADN total de tejido vegetal (Doyle y Doyle, 1987. Modificado por Hernández G. LANREF., 2013. (Paso 2)).

1. Depositar en un tubo eppendorf 0.1 gramos de tejido vegetal. Es importante mantener la muestra en condiciones de baja temperatura.
2. Colocar dos balines de 3/16 dentro del tubo. Agregar 600 µL de buffer salino.
3. Programar el macerador de tejido a 25 f/s (frecuencias por segundo) por un tiempo de 3 minutos.
4. Transcurrido el tiempo, centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos a 4°C.
5. Descartar el sobrante y retirar los balines de la muestra.
6. Posteriormente, agregar 600µL de CTAB al 2% y 3µL de B-mercaptoetanol. Dar vortex la muestra por 10 segundos e incubar a 55°C por un lapso de 30 minutos.
7. Agregar 400µL de Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico 25:24:1 y mezclar en vortex por 10 segundos.
8. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 14 000 rpm.
9. Colectar 500µL de la fase acuosa en un tubo nuevo. Evitar que se mezclen las fases, por lo que se recomienda extraer la fase acuosa en volúmenes de 100µL. Desechar la fase sólida.
10. Agregar 50µl de acetato y 500µl de isopropanol e incubar por 10 minutos a -20°C. (Puede quedarse precipitando toda la noche).
11. Consecutivamente centrifugar por 10 minutos a 14 000 rpm a 4°C y descartar el sobrenadante cuidadosamente para no perder la pastilla que se formó.
12. Adicionar 1000µl de etanol al 70% centrifugar un minuto a 14 000 rpm a 4°C.
13. Secar la muestra a temperatura ambiente de tal modo que se evaporen los residuos de etanol dentro del tubo el lapso aproximado es de 20 minutos.
14. Resuspender la pastillas en 50µl de agua libre de RNAsas.

Apéndice 6. Protocolo de PCR Tiempo Real tipo Cuantitativo (Manual OIRSA-FAO, 2013.)

1. Desinfectar la campana de qPCR con RNASE-away, hipoclorito de sodio 1.5%, etanol 70% y someter material de ensayo (Micropipetas, rack de Tubos de PCR, Rack para placas, puntas, apresor de tubos, etc.) a luz ultravioleta durante 25 minutos previos a la preparación de mix. **Importante NO introducir ADN a la campana**
2. Descongelar los reactivos sobre hielo o en el refrigerador de 4°C (colocando los reactivos dentro de una gradilla o caja de **preferencia para uso exclusivo**)

La preparación de la sonda y los primers se debe de realizar dentro de la campana de qPCR con el fin de evitar contaminaciones.

a) **Sonda:** Tomar 10ul de stock de sonda y adicionar 990ul de H₂O libre de nucleasas, colocarlos en un tubo de 1.5 ml cubierto con papel aluminio (para evitar el contacto de la luz y se degrade la sonda). Mezclar por pipeteo y marcar en la tapa o un costado como **SONDA -----** con un marcador indeleble.

b) **Primers:** Tomar 20ul de stock del primer Forward (HLB as) y adicionar 980ul de H₂O para libre de nucleasas, colocar en un tubo de 1.5 ml, mezclar por pipeteo. etiquetar en la tapa o a un costado con el nombre del primers. Repetir el procedimiento con el primer Reverse.

3. Calcular la cantidad de reactivos necesarios en base al número de muestras a procesar; no olvidar contemplar las 12 reacciones extra necesarias para la curva estándar y 4 más empleadas en los controles positivos que se deben de agregar en cada corrida. Ej para una placa de 48 (dos controles negativos y dos controles positivos requeridos en el ensayo, 32 muestras problema y 12 reacciones requeridas para las dos repeticiones de cada punto de la curva estándar).

Reactivo	1x	49x
Bio-Rad Universal Master Mix	10 µL	490
HLBas	2.5µL	122.5
HLBp	2.5 µL	122.5
Sonda	4 µL	196
Total	19 µL	931
ADN	1 µL	

4. Para ensayos de PCR cuantitativo se deberán preparar 5 diluciones seriadas 1:10 para utilizarse como puntos de referencia en la curva estándar: Tomar muestra inicial (clona con concentración 0.005ng/ul determinada de inserto de CLas con **1109500 copias/uL**) obteniendo 6 puntos de referencia para la curva estándar

Dilución	Concentración (copias /ul)
D0 (0.005 ng/ul)	1109500
D1	110950
D2	11095
D3	1109.5
D4	110.95
D5	11.95

5. Preparar la mezcla de reacción en tubos de 1.5mL cubiertos con papel aluminio para evitar contacto de la sonda a la luz. Asegurarse de mezclar adecuadamente la solución, pipeteando consecutivamente hasta que se homogenice. El orden de preparación es el siguiente:

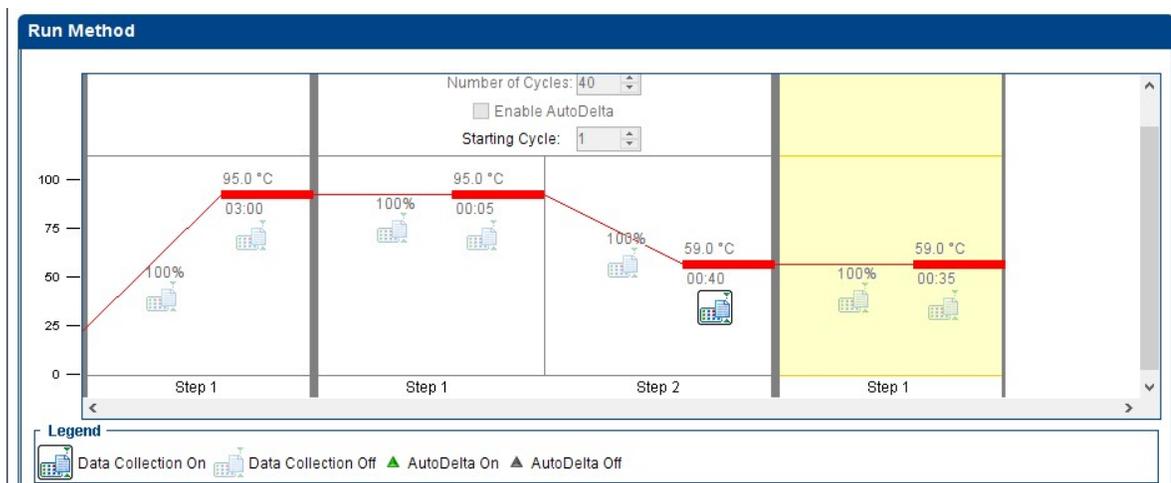
- i. Bio-Rad Universal SuperMix
- ii. HLBp
- iii. HLBas
- iv. Sonda

4. Una vez preparada la reacción, dejarla reposar en hielo mientras se acomoda la placa de 48 pozos (AppliedBiosystems) teniendo cuidado de **NO** tocar el fondo de los tubos o la placa, ya que puede afectar la lectura emitida por el termociclador.
5. Repartir 19uL de la mezcla de reacción en cada pozo, asegurándose de que la misma llegue al fondo del tubo. Una vez completado, verificar que no haya burbujas de aire en el fondo, en evento que hubiese dar un ligero golpe al borde del rack para que las mismas disipen.
6. Agregar 1uL de muestra de ADN del pozo A3-E2 (dos primeros pozos son controles negativos) y los pozos E3-E4 los controles positivos.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	N HLB Ct: Undete	N HLB Ct: Undete	U HLB 3.89E4	U HLB 139.18	U HLB 1.09E5	U HLB 143.82	U HLB 61.24	U HLB 4.61E5
B	U HLB 2.36E5	U HLB 270.23	U HLB 8.86E3	U HLB 148.27	U HLB 1.56E5	U HLB 163.65	U HLB 133.38	U HLB 104.6
C	U HLB 55.41	U HLB 166.03	U HLB 284.15	U HLB 336.49	U HLB 170.5	U HLB 336.82	U HLB 63.11	U HLB 124.1
D	U HLB 6.27E4	U HLB 406.33	U HLB 226.95	U HLB 226.07	U HLB 95.3	U HLB 363.33	U HLB 166.13	U HLB 224.32
E	U HLB 402.09	U HLB 212.63	S HLB 1.88E4	S HLB 1.8E4	S HLB 1.11E6	S HLB 1.11E6	S HLB 1.11E5	S HLB 1.11E5
F	S HLB 1.11E4	S HLB 1.11E4	S HLB 1.11E3	S HLB 1.11E3	S HLB 110.95	S HLB 110.95	S HLB 11.1	S HLB 11.1

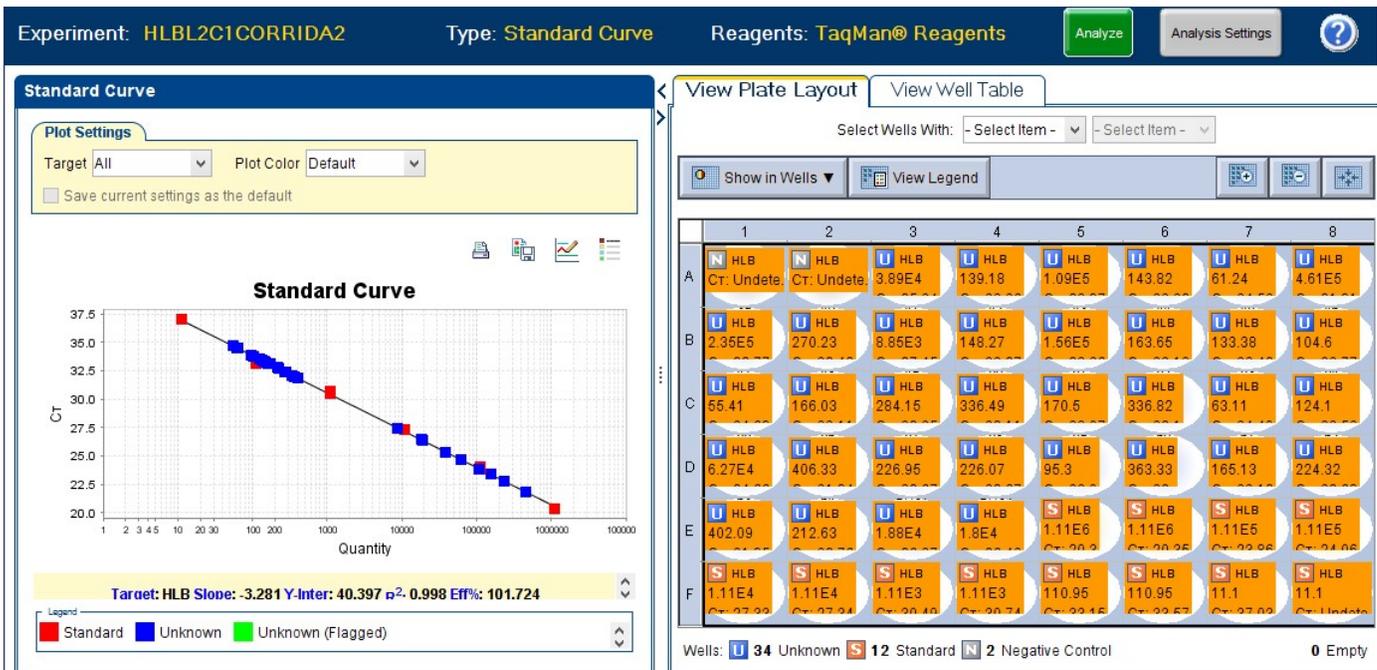
Wells: U 34 Unknown S 12 Standard N 2 Negative Control 0 Empty

7. Agregar 1uL de las diluciones D0-D5 con su respectiva repetición, las cuales ocupan del pozos E5-F8 (El orden de las diluciones debe ser de manera descendiente, por lo que la dilución de menor concentración siempre deberá ser la última, al igual, es imperativo que se respete el orden de factor y las repeticiones sean adyacentes)
8. Cubrir las muestras utilizando tiras de tapas (FastOptical AppliedBiosystems) teniendo nuevamente cuidado de no tocar las tapas directamente ajustar la tapa utilizando los apresores, para evitar contaminación. evitar movimientos bruscos para no salpicar la tapa
9. Programa de termociclaje para CLas

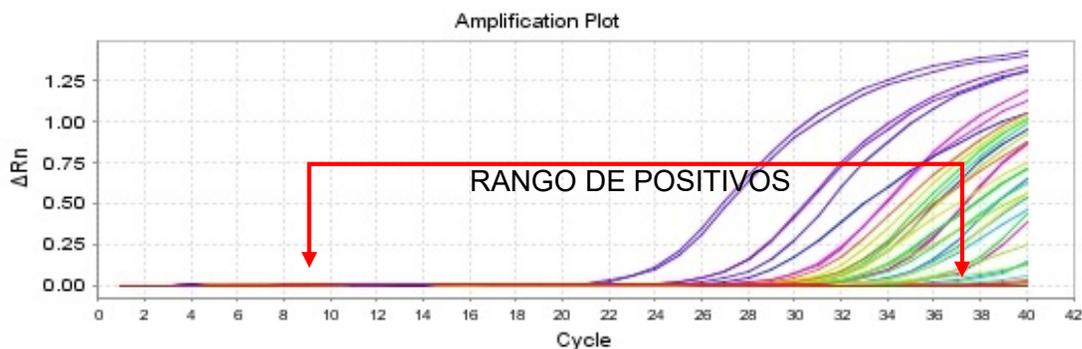


10.- Seleccionar la opción de Star run. Automáticamente aparecerá la opción de donde desea guardar el ensayo y una vez completado iniciara la corrida.

11.- Análisis de resultados



Selección de muestras positivas: Aquellas cuyos Cts (ciclo de termociclaje en el cual se rebasó el umbral de fluorescencia aceptado por el equipo) se encuentran dentro del intervalo (8,35]. Muestras con Cts mayores a 35 podrían indicar baja concentración del objetivo por lo que son consideradas sin confirmar o bien negativas según los estándares del equipo.



Aprobación de ensayos de curva estándar: Los criterios ideales para la aprobación de un ensayo de curva estándar utilizados en este experimento fueron los mismos a los establecidos en especificaciones de manufactura por Applied Biosystems, Foster City,

CA. Entre los valores numéricos contemplados para dicha aprobación se encuentra la eficiencia del experimento, ésta debió haber sido superior al 80% y menor a 120%, dándole un mayor rango de precisión al tender hacia 100%. El valor de r^2 debió aproximarse lo más posible a 1, siendo .99 lo ideal, teniendo como límites inferior aceptable .95.