

Efectos fisiológicos de Huanglongbing en limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) injertado en *C. macrophylla*

Miguel Ángel Manzanilla-Ramírez*, Jose Joaquin Velazquez-Monreal, Marciano Manuel Robles-González, Juan Eduardo Murillo-Hernández, INIFAP Campo Experimental Tecomán. Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo. Tecomán, Colima, México. C.P. 28930; Angel Villegas-Montier, Posgrado en Fisiología Vegetal-Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México. CP. 562302.

*Autor de correspondencia: manzanilla.miguel@inifap.gob.mx.

Recibido: Septiembre 6, 2022.

Aceptado: Octubre 30, 2022.

Manzanilla-Ramírez MA, Velazquez-Monreal JJ, Robles-González MM, Murillo-Hernández JE y Villegas Montier A. 2022. Efectos fisiológicos de Huanglongbing en limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) injertado en *C. macrophylla*. Revista Mexicana de Fitopatología 40(4).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-11>

Resumen. La enfermedad del Huanglongbing (HLB), causa desequilibrios metabólicos por agotamiento de nutrientes y/o interferencia del transporte. En limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) ocurre una disminución de la producción. Por ello se planteó el objetivo de conocer los cambios fisiológicos con el uso del portainjerto Macrofila (*Citrus macrophylla*) en dos épocas (invierno y verano). Los tratamientos incluyeron árboles sanos y con HLB de pie franco e injertados. Se determinaron los contenidos nutrimentales (N, P, K, Ca y Mg), almidón y sacarosa, así como el rendimiento. En árboles con HLB los valores de Nitrógeno (N), Magnesio (Mg), almidón y sacarosa fueron estadísticamente diferentes entre los injertados en comparación con los de pie franco (Tukey, $p=0.05$). En árboles con

HLB, el uso del portainjerto Macrofila presentó concentraciones de N de 19.5 mg g⁻¹ y sin injertar de 15.9 mg g⁻¹ en invierno, al igual que el Mg con 1.26 y 0.98 mg g⁻¹ respectivamente. El almidón en hoja durante el verano concentró con Macrofila 0.5%, en contraste las plantas de pie franco (1.0%). La sacarosa en nervadura de injertadas en Macrofila con 17.39 mg g⁻¹ y sin injertar con 19.14 mg g⁻¹. El uso del portainjerto Macrofila no mejoró los rendimientos (7.46 kg árbol⁻¹) en comparación con pie franco que produjo 7.20 kg árbol⁻¹; sin embargo, atenúa los efectos del HLB de forma estacional.

Palabras clave: Cítricos, carbohidratos, nutrimentos, portainjerto.

En 2010 se detectó la enfermedad del Huanglongbing (HLB), en la zona productora de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) en el estado de Colima. El HLB afecta a todas las especies y variedades de cítricos. No existen reportes de árboles sanos una vez infectados (Bové, 2006; National Academies of Sciences and Medicine, 2018). Es una de las enfermedades más complejas, debido a las

interacciones entre el patógeno, vector, hospederos y ambiente (da Graça *et al.*, 2015). En Colima es causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), la cual puede ser transmitida por *Diaphorina citri* (Dc) y por injertos.

En cítricos el CLAs causa desequilibrios metabólicos por agotamiento de nutrientes y/o interferencia del transporte (Duan *et al.*, 2009). Lo que tiene como consecuencia disminución de la producción, síntoma más impactante en las áreas productoras de cítricos del mundo (Bové, 2006; Gonzalez *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009; Robles-González *et al.*, 2017). A medida que se incrementa el tiempo de la infección por CLAs, aumentan las deficiencias de nutrientes y desequilibrios de carbohidratos en hojas y raíces (Etxeberria *et al.*, 2009), detención del desarrollo de las plantas y se puede observar la muerte regresiva de brotes y ramas (Etxeberria *et al.*, 2009; Cimo *et al.*, 2013). En limón Persa (*C. Latifolia*) en México CLAs produjo un efecto perjudicial en el tamaño y peso de los frutos y se reportó la pérdida en producción de 2.4 t ha⁻¹ (Flores-Sánchez *et al.*, 2015).

En limón Mexicano se ha registrado disminución de la producción en etapas tempranas de la infección, pero cuando los árboles registran síntomas en más del 75% de la copa, las pérdidas de rendimiento alcanzan el 50%, incluso con disminución en el tamaño de la fruta cosechada. Los síntomas en hojas de limón Mexicano incluyen puntos cloróticos, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteado y clorosis difusa hasta amarillamiento generalizado en la lámina foliar y defoliación (Robles *et al.*, 2017). Histológicamente existe incremento de almidón en el mesófilo de la hoja y se presenta hiperplasia, lo que ocasiona colapso del floema (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Los árboles de limón Mexicano en producción, sufren cambios fisiológicos en la distribución y concentración de los carbohidratos, tanto en hoja como

en raíz (Manzanilla *et al.*, 2019). A pesar de estas afectaciones, González *et al.* (2017) describieron que después de varios años con la enfermedad, el limón Mexicano injertado sobre Macrofila (*C. macrophylla*) disminuyen su vigor, pero continúa produciendo. Se ha demostrado que los dos hospederos preferentes de Dc son el limón Mexicano y Macrofila, lo que explica la rápida diseminación de la enfermedad en las zonas productoras de Colima (Hall y Hentz, 2016). En contraste existen reportes que consideran al limón Mexicano (Folimonova *et al.*, 2009; Iftikhar *et al.*, 2016; Ramadugu *et al.*, 2016; Stover *et al.*, 2016; Munir *et al.*, 2017) y Macrofila (Folimonova *et al.*, 2009; Ramadugu *et al.*, 2016; Munir *et al.*, 2017) entre tolerantes y moderadamente tolerantes a CLAs. En complemento se reportó que los frutos cosechados de árboles con síntomas de HLB no se afectan significativamente (Sólidos solubles totales, acidez titulable, ácido ascórbico, pérdidas de peso e índice de color), excepto que los frutos son más sensibles al daño por frío (Saucedo-Veloz *et al.*, 2018).

La tolerancia observada en diferentes variedades y portainjertos pueden atribuirse a diversos factores, entre los que se incluyen: capacidad de colonización de Dc, ausencia de multiplicación de patógenos, replicación transitoria de la bacteria, falta de establecimiento de patógenos en la planta, infección retardada o recuperación de la infección (Ramadugu *et al.*, 2016).

En algunos casos, el portainjerto puede afectar los síntomas y nivel de gravedad de la enfermedad (Shokrollah *et al.*, 2011). Se ha reportado que los portainjertos como Macrofila que inducen mayor vigor, pueden permitir que los árboles sobrevivan a los efectos dañinos del CLAs (Albrecht *et al.*, 2012). Aunque no indujo altos niveles de resistencia al HLB en la variedad, se describieron diferencias en expresión de síntomas, el daño en la copa, crecimiento de brotes y calidad de la fruta

(Albrecht y Bowman, 2012). También se sabe que el portainjerto principalmente los trifoliados tiene un efecto en la susceptibilidad a CLAs de la variedad injertada (Ramadugu *et al.*, 2016), debido a que los portainjertos afectan caracteres hortícolas (vigor, producción, calidad de futa, etc.) y fisiológicos, tolerancia a plagas y enfermedades, así como la compatibilidad con variedades (Castle, 2010).

Existe inconsistencia en los informes publicados con relación a la respuesta de los cultivares de cítricos a CLAs, la variabilidad observada puede deberse a que son diversos genotipos del hospedero, ubicación geográfica, prácticas culturales o diferencias en la patogenicidad de diversos aislados de *Liberibacter* (Ramadugu *et al.*, 2016). Spann y Schumann en 2009, señalaron que, se tiene escaso conocimiento acerca de los cambios de las plantas asociadas con HLB a pesar de que los síntomas en hoja a menudo se caracterizan como “similares a deficiencia de nutrientes”. Por consiguiente, el presente trabajo tiene como objetivo determinar si el portainjerto *Macrofila* puede atenuar los cambios fisiológicos que causa el CLAs a árboles de limón Mexicano var. Colimex en etapa de producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en las instalaciones del INIFAP Campo Experimental Tecomán, Colima (18°58'07.38"N 103°50'43.06"O). El clima en la región es cálido semi-seco con temperatura media anual de 26 °C y precipitación media anual de 750 mm. La evaluación se realizó durante dos periodos agosto-diciembre (invierno) de 2017 y marzo-septiembre (verano) de 2018. La plantación se realizó entre el 15 al 18 de julio del 2014, en una estructura de malla antiáfidos de 4,000 m² (Figura 1A). Se usó un arreglo topológico de 2.0 m entre árboles y 3.0 m entre hileras (1,600 árboles/ha). Los

tratamientos se establecieron en contenedores con capacidad 60 L. Se utilizó un sustrato compuesto de polvillo de coco, tierra y lombricomposta (1:1:1 v/v) bajo un sistema de riego por goteo (Figura 1B). Las prácticas agronómicas se realizaron de acuerdo al paquete tecnológico recomendado por el INIFAP. La parcela experimental constó de cinco árboles por cada uno de los cuatro tratamientos. 1) Limón Colimex de pie franco sano; 2) Limón Colimex de pie franco con HLB (Figura 1C); 3) Limón Colimex injertado en *Macrofila* sano; y 4) Limón Colimex injertado en *Macrofila* con HLB (Figura 1D). El diseño experimental fue factorial 2x2 con dos fechas (invierno y verano).

Análisis foliar de nutrientes. Se evaluaron las concentraciones de macronutrientes: Nitrógeno total (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg) en hoja maduras de 120 días. Se colectaron 100 hojas de cada tratamiento. Para cada muestra se realizó una mezcla compuesta y tres repeticiones.

Concentración de carbohidratos. Se determinaron concentraciones de carbohidratos en hojas y raíces de árboles de los diferentes tratamientos. Debido a que el principal azúcar presente en el floema de los cítricos es sacarosa y en lámina foliar el almidón (Hijaz y Killiny, 2014). Se seleccionaron nervaduras y lamina foliar de hojas de 120 días para determinar almidón y sacarosa. Así como raíces secundarias para evaluar su contenido de almidón. La extracción de almidón se realizó a partir de 20 mg de tejidos de hojas y raíces liofilizadas y molidas (Gonzalez *et al.*, 2011). La obtención de sacarosa se realizó siguiendo la metodología descrita por Geigenberger y Stitt (1993).

Rendimiento de fruto. Se marcaron 15 brotes florales por tratamiento de cada una de las dos fechas



Figura 1. Tratamientos y manejo de árboles de limón Colimex en contenedores. Control de malezas (A), sistema de riego por goteo (B). Limón Colimex de pie franco sano y Limón Colimex de pie franco con HLB (C); Limón Colimex injertado en Macrofila sano y Limón Colimex injertado en Macrofila con HLB (D).

y se registró el cuajado de fruto. Posteriormente se registró la cosecha durante 12 meses en kilogramos/árbol. Los datos se ingresaron a una base de Excel para realizar un análisis estadístico con el programa estadístico InfoStat 2018. Para estudiar diferencias entre tratamientos se utilizó prueba estadística de Tukey. Con una significancia $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración nutrimental. Nitrógeno (N). Este elemento en invierno (2017) mostró diferencias

estadísticas significativas entre todos los tratamientos (Cuadro 1), los árboles injertados sanos mostraron mayor concentración con 20.6 mg g^{-1} , el cual se mantuvo dentro del intervalo óptimo de 20.5 mg g^{-1} , mientras que los demás tratamientos no alcanzaron la concentración óptima. Similar comportamiento se obtuvo en verano (2018), aunque ningún tratamiento alcanzó el nivel óptimo, el tratamiento injertado sin HLB tuvo la mayor concentración con 18.4 mg g^{-1} de nitrógeno. Pustika *et al.* (2008) reportaron en *Citrus reticulata* reducción en la concentración de N por HLB. En contraste en varios cítricos de Pakistán, el nitrógeno resultó signi-

Cuadro 1. Concentración de macronutrientes en hojas de 120 días, de plantas de limón Colimex injertadas y de pie franco, sanas e infectadas con CLAs. Evaluadas en invierno (2017) y verano, 2018.

Nutrimento	Etapa	Injertadas		Pie franco		DMS*	Intervalo de Concentración Óptimo**
		(HLB -) ^w	(HLB +) ^x	(HLB -) ^y	(HLB +) ^z		
N	Invierno	20.6 a	19.5 b	18.75 c	15.9 d	0.300	20.5-23.5
	Verano	18.4 a	15.8 b	15.0 c	12.85 d	0.146	
P	Invierno	1.22 ab	2.27 a	1.05 b	1.15 ab	1.201	1.20-1.60
	Verano	2.35 a	2.24 ab	1.77 c	2.14 b	0.115	
K	Invierno	23.2 ab	19.62 b	31.18 a	19.52 b	11.437	12.0-17.0
	Verano	22.5 a	18.14 c	19.48 b	18.08 c	1.217	
Ca	Invierno	33.14 a	20.39 a	37.82 a	24.63 a	17.668	30.0-49.0
	Verano	33.41 b	25.57 c	41.78 a	31.34 bc	6.257	
Mg	Invierno	1.71 b	1.26 c	2.11 a	0.98 d	0.253	3.0-4.9
	Verano	1.91 a	1.41 b	1.37 b	1.18 c	0.137	

W, Injertada (HLB-) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas-); X, Injertada (HLB+) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas+); Y, Pie franco (HLB-) = Limón Colimex pie franco (CLas-); Z, Pie franco (HLB+) = Limón Colimex pie franco (CLas+). Medias en la fila con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$). DMS* Diferencia mínima significativa. Concentración óptima** (Rogers *et al.*, 2017).

ficativamente alto (23 mg g⁻¹) en árboles infectados con CLAs (Razi *et al.*, 2011). Estos contrastes en la concentración de nitrógeno en árboles con HLB está influenciado por el genotipo y el manejo que se implementa en cada experimento. Los resultados muestran que CLAs afecta la concentración de nitrógeno en árboles de limón Colimex. El uso del portainjerto Macrofila aumentó la concentración de nitrógeno en las dos etapas evaluadas. En la etapa posterior a la floración, la concentración de N en las hojas de primavera disminuyó, porque este tejido se convierte en una fuente de N para el desarrollo de fruta (Legaz *et al.*, 1982). La disminución por debajo del nivel óptimo de nitrógeno afecta la síntesis de metabolitos (García-Mina, 2012), principalmente aminoácidos y proteínas, relacionados con los mecanismos de defensa, crecimiento y producción.

Fósforo (P). La concentración de fósforo en hojas obtenidas en invierno tuvo diferencias estadísticas

significativas entre el tratamiento injertado con HLB (2.27 mg g⁻¹) y el tratamiento sin injertar sano (1.77 mg g⁻¹). El limón Colimex injertado con y sin HLB presentó contenido óptimo, en contraste con los tratamientos sin portainjerto que no alcanzaron la concentración óptima de 1.20 mg g⁻¹. En verano se presentó mayor concentración en el tratamiento injertado sano con 2.35 mg g⁻¹, y fue estadísticamente diferente al tratamiento sin injertar sano que registró 1.77 mg g⁻¹ (Cuadro 1). En esta etapa los tratamientos presentaron contenidos óptimos de fósforo. Se han reportado deficiencias de P en árboles infectados con CLAs (Brlansky *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013) y se ha sugerido que la deficiencia de fósforo se vincula con la sintomatología de HLB. Los resultados muestran que el CLAs no afecta la concentración de fósforo en plantas de limón Colimex injertado en Macrofila, debido a que un pH mayor de 6.0 se facilita su absorción y los requerimientos de P en cítricos es baja (Obreza y Morgan 2008).

Potasio (K). Como en el caso de N, el K juega un papel importante en varios procesos fisiológicos, como la homeostasis del agua y el transporte dentro de la planta de diferentes nutrientes (Fe, Mg, NO₃, etc.) y metabolitos (citrato, malato, etc.). También, forma parte en la expresión de los mecanismos de defensa de las plantas con una acción indirecta sobre la fisiología de las plantas y la biosíntesis de metabolitos que podrían estar asociados (García-Mina, 2012). El K en cítricos es importante en el rendimiento, el tamaño del fruto y la calidad del jugo. En esta investigación la concentración de potasio fue mayor en los tratamientos sin presencia de CLas en las dos fechas evaluadas. En invierno existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos sin injertar sanos y enfermos con 31.18 y 19.52 mg g⁻¹ respectivamente. En verano se registraron diferencias estadísticas entre el tratamiento injertado sano que tuvo 22.5 mg g⁻¹ y los demás tratamientos, la menor concentración se obtuvo en el tratamiento sin injertar con HLB con 18.08 mg g⁻¹ de potasio (Cuadro 1). Cabe destacar que los tratamientos en las dos etapas estuvieron por encima del contenido óptimo de K de 12.0 mg g⁻¹ para cítricos. Se ha reportado que en plantas con HLB se incrementaron las concentraciones de K (Schumann *et al.*, 2009). En limón Colimex este comportamiento no se presentó. Las deficiencias de potasio no son comunes cuando se tiene una buena fertilización, como se presentó en este experimento; sin embargo, se puede presentar deficiencias en suelos con pH alto o cuando se incrementa la producción (Obreza y Morgan, 2008). Estos resultados muestran que la presencia de CLas en las plantas evaluadas no mostraron deficiencia de este nutriente, por lo que HLB no disminuye su concentración por debajo del intervalo óptimo (12.0 mg g⁻¹).

Calcio (Ca). Es el elemento mineral más abundante en los árboles de cítricos (Obreza y Morgan, 2008),

presente principalmente en las hojas. Durante las evaluaciones en invierno, las concentraciones de este elemento no presentaron diferencias estadísticas en los tratamientos evaluados; no obstante, se observó mayor concentración en los tratamientos sanos. En las evaluaciones de verano se observaron diferencias entre el tratamiento injertado sano con 33.41 mg g⁻¹ y el enfermo con 25.57 mg g⁻¹. La concentración óptima de Ca (30 mg g⁻¹) lo presentaron los tratamientos sin CLas en las dos etapas evaluadas y de los tratamientos con CLas solo las plantas no injertadas alcanzaron el óptimo en verano (Cuadro 1). Se ha reportado que el calcio disminuye de manera importante en árboles con HLB (Schumann *et al.*, 2009) hasta observar deficiencias (Brlansky *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013). Los resultados en este trabajo en limón Colimex son similares con lo reportado (Brlansky *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2013), al disminuir por debajo del nivel óptimo el Ca en hoja, debido a la infección de CLas. Esta disminución afecta el rol del calcio y complejo de Ca-calmodulina como segundos mensajeros en la respuesta inducida y por ende la activación de los mecanismos de defensa de la planta (García-Mina, 2012). Por lo que estos mecanismos pueden ser afectados en limón Colimex infectado con CLas.

Magnesio (Mg). El magnesio tuvo un comportamiento similar al Ca con diferencias estadísticas significativas, debido a que en verano e invierno se observó un mayor contenido en los tratamientos sanos comparado con las plantas con presencia de CLas. Durante el invierno, las hojas concentraron mayor contenido de Mg en tratamientos sin injertar y sin HLB con 2.11 mg g⁻¹, mientras que con HLB tuvo el menor contenido (0.98 mg g⁻¹). En verano, las plantas injertadas sanas tuvieron el mayor contenido de Mg (1.18 mg g⁻¹). Los tratamientos presentaron menor contenido de Mg que el óptimo (3.0 mg g⁻¹), en las dos etapas evaluadas (Cuadro

1). En condiciones de deficiencia de este elemento, el almidón tiende a acumularse ya que su hidrólisis, la síntesis de sacarosa y la carga de ésta en el floema, requieren energía y ésta se halla ligada a la actividad ATPásica, que depende del magnesio. Con deficiencias de Mg no hay una adecuada partición de fotoasimilados, ya que éstos no llegan al fruto y su tamaño se ve reducido (Agusti *et al.*, 2003). La deficiencia de Mg también, aumenta la incidencia de enfermedades (Jones y Huber, 2007). Por otro lado, se ha reportado disminución del contenido y deficiencias de Mg en árboles con HLB (Schumann *et al.*, 2009; Brlansky *et al.*, 2012). Resultados similares se ha obtenido en esta investigación con limón Colimex, con una disminución del contenido de magnesio debido al HLB.

El Mg, es un componente esencial de la clorofila, su deficiencia produce un patrón clorótico característico y puede causar defoliación prematura. Las variedades de cítricos con semillas como la variedad Colimex requieren de mayor cantidad de Mg debido a que almacenan mayor cantidad de Mg (Obreza y Morgan, 2008).

Concentración de almidón y sacarosa en hoja. El Cuadro 2, se muestra el análisis químico de almidón, donde se obtuvieron mayores concentraciones

en los tratamientos con HLB y fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos sanos durante la evaluación en invierno. En plantas injertadas sanas se alcanzó un 5.13% de almidón en contraste con plantas injertadas positivas a HLB con 18.54%. Las plantas de pie franco tuvieron concentraciones en hojas sanas y enfermas de 2.98 y 17.81% respectivamente. En verano tuvieron una concentración de almidón baja en comparación con invierno y no existió diferencia estadística significativa entre los tratamientos injertados con 0.38% sanos y con HLB (0.50%). Plantas de pie franco mostraron diferencias estadísticas significativas con las plantas injertadas y entre sí con 0.68% en sanas y 1.0% con HLB. Los resultados obtenidos en las concentraciones de almidón en la lámina foliar son similares a lo reportado por Boava *et al.* (2017) quienes describieron que la acumulación de almidón en el parénquima de hoja en plantas infectadas con CLas se debe a la alteración de la función del floema por la acumulación de calosa afectando la movilización de azúcares de tejidos fotosintéticos. Los genes relacionados con la deposición de calosa en el floema de plantas infectadas (tanto cultivares susceptibles como tolerantes) se sobre regulan al igual que los genes involucrados en la biosíntesis del almidón. Fan *et al.* (2012) describieron que en

Cuadro 2. Concentraciones de almidón y sacarosa de plantas de limón Colimex injertadas y de pie franco, sanas e infectadas con CLas. Evaluadas en invierno (2017) y verano, 2018.

Tratamientos	Almidón Lámina (%)		Almidón Raíz (%)		Sacarosa Nervadura (mg/g)	
	Invierno	Verano	Invierno	Verano	Invierno	Verano
Injertada (HLB-) ^W	5.13 b	0.38 c	6.33 a	2.0 b	15.16 c	0.34 a
Injertada (HLB+) ^X	18.54 a	0.50 c	5.98 ab	1.81 b	17.39 b	0.46 a
Pie franco (HLB-) ^Y	2.98 b	0.68 b	5.59 ab	2.52 a	13.77 c	0.34 a
Pie franco (HLB+) ^Z	17.81 a	1.00 a	3.37 b	1.8 b	19.14 a	0.41 a

W, Injertada (HLB-) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas-); X, Injertada (HLB+) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas+); Y, Pie franco (HLB-) = Limón Colimex pie franco (CLas-); Z, Pie franco (HLB+) = Limón Colimex pie franco (CLas+). Medias en la columna con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$).

genotipos tolerantes los tubos cribosos del floema tuvieron taponamiento de calosa y se inhibió la carga de floema, aunque el transporte en floema fue menos afectado en comparación con genotipos susceptibles. La deficiencia en la del floema que causa acumulación de almidón puede ocurrir antes de que se produzca una obstrucción visible del floema durante la infección por HLB (Fan *et al.*, 2010). Las hojas de los cítricos acumulan almidón en condiciones normales, pero se pueden acumular cantidades elevadas como resultado de la deficiencia de Zn, HLB y/o temperaturas frías del invierno (Monerri *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2012) como sucede en las hojas de limón Colimex en invierno.

El limón Colimex durante el verano no mostró concentraciones elevadas de almidón en sus hojas. La menor inhibición de las actividades de transporte de floema en hojas maduras infectadas de CLas en genotipos tolerantes, puede deberse a la formación de nuevos tejidos funcionales de floema ya que se ha detectado la regulación positiva de genes de biosíntesis de la pared celular (Fan *et al.*, 2012). Una vez acumulado el almidón de la hoja en los cítricos tiende a no degradarse, aunque puede producirse cierto agotamiento de las reservas de almidón durante las fases de crecimiento de los órganos demanda (Monerri *et al.*, 2011), como lo observado en las hojas de limón Colimex en verano.

CLas tiene influencia en el metabolismo de los carbohidratos en la planta, acumulando almidón en hojas, mientras que el almidón de las raíces es consumido para sostener sus actividades metabólicas y un limitado número de azúcares le son desplazados (Etxeberria *et al.*, 2009). En complemento, la acumulación de sacarosa en hojas sugiere que la translocación de fotoasimilados se ve afectada, debido a la obstrucción del floema (Fan *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2009; Koh *et al.*, 2012).

Por otro lado, en naranjas (*Citrus sinensis*) el contenido de almidón predice de manera confiable la presencia de CLas durante la “estación cálida”

(de junio a noviembre), pero no en la “estación fría” (de diciembre a mayo). En este estudio en la estación fría, los niveles de almidón en árboles con HLB fueron bajos (Whitaker *et al.*, 2014), lo cual muestra la importancia en los cambios en la concentración de almidón en hojas de cítricos con HLB a lo largo de las temporadas del año. Los datos de esta investigación muestran mayor concentración de almidón en invierno en hoja de limón Colimex comparado con la evaluación de verano. Esto puede deberse, a que el fruto es demandante de carbohidratos, por lo que, la carga elevada de fruto reduce tanto el desvío de carbohidratos hacia el sistema radicular como la acumulación de reservas de carbohidratos, tal como sucede en la época de verano donde existe mayor producción de limones. En contraste, las mayores reservas de invierno se utilizan durante la brotación de yemas y en la producción por lo que la concentración de carbohidratos en las hojas disminuye hasta un valor mínimo en verano (Monerri *et al.*, 2011), como lo sucedido en limón Colimex.

Concentración de almidón en raíz. La mayor concentración de almidón se presentó con el uso de portainjerto sano en invierno con 6.33% y fue estadísticamente diferente al de pie franco con HLB que tuvo 3.37% de almidón. El uso del portainjerto no mostró diferencias estadísticas significativas entre árboles sanos e infectados con CLas. Al igual que en hojas, durante el verano las raíces redujeron el contenido de almidón en todos los tratamientos evaluados, árboles de pie franco tuvieron la mayor concentración con 2.52% de almidón y la menor concentración estuvo en los tratamientos con HLB (1.80%), aunque sin diferencia estadísticas con las plantas injertadas positivas y negativas a CLas (Cuadro 2).

Se ha registrado que en las raíces no existen importantes diferencias entre los tratamientos sanos y con HLB en cítricos tolerantes, probablemente

a que los fotosintatos todavía se transportan en el floema de hojas afectadas a los órganos de demanda como las raíces, mientras que, las raíces de cítricos susceptibles sufren importantes daños (Fan *et al.*, 2012). Al mismo tiempo que se ha observado la acumulación de almidón en las partes aéreas, el agotamiento de las reservas de carbohidratos del sistema radicular no solo refleja la perturbación general en el metabolismo de los carbohidratos, sino que también se cree que es la razón principal de la senescencia de árboles asociada al HLB (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010). Al igual que en la hoja, la concentración de almidón en raíces de limón Colimex en producción, tuvo diferencias entre invierno y verano. El uso del portainjerto Macrofila aumenta la concentración de almidón en raíces de invierno (almacenaje). Mientras que en verano hay una disminución de almidón en raíces debido a la alta demanda de carbohidratos por los frutos. CLas no afecta la concentración de almidón de raíces de limón Mexicano injertado en Macrofila.

Concentración de sacarosa en hoja. En el Cuadro 2, se observa que las nervaduras de hojas recolectadas en invierno tuvieron una mayor concentración de sacarosa en los tratamientos con HLB donde los árboles de pie franco e injertados tuvieron 19.14 y 17.39 mg g⁻¹ de sacarosa respectivamente, con diferencias estadísticas entre ambos. Los tratamientos sanos fueron estadísticamente diferentes a los infectados con CLas mostrando la menor concentración con 15.16 mg g⁻¹ en las injertadas y pie franco con 13.77 mg g⁻¹ respectivamente, sin diferencias estadísticas entre ellas. En las hojas recolectadas en verano, se tuvieron niveles bajos de sacarosa en nervaduras, sin diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados. La mayor concentración la obtuvo el tratamiento injertado con HLB con 0.40 mg g⁻¹, mientras que la menor concentración se obtuvo de las nervaduras de los

tratamientos sin HLB que tuvieron 0.34 mg g⁻¹ de sacarosa.

La sacarosa se acumuló en nervaduras de las hojas infectadas con CLas durante el invierno, consistente con las observaciones de Kim *et al.* (2009) y Fan *et al.* (2010), lo que implica que la translocación de fotoasimilados se ve afectada por la infección por CLas y la acumulación de sacarosa podría contribuir a algunos síntomas de HLB. Se ha reportado CLas tiene un comportamiento parasitario, que ocasiona una partición deficiente de carbohidratos que tiene como resultado acumulación de sacarosa en la hoja y, por lo tanto, la inhibición de la fotosíntesis (Fan *et al.*, 2010). Es posible que la fotosíntesis en hojas esté regulada por la sacarosa en hoja, en lugar del contenido de almidón (Cimo *et al.*, 2013). La fotosíntesis es inhibida por los productos fotosintéticos acumulados en hoja y la reducción del transporte de azúcares de la fuente (hoja) a la demanda (raíz, fruto, etc.) (Boava *et al.*, 2017). El HLB aumenta las concentraciones de sacarosa en nervaduras de invierno. En verano disminuye la sacarosa en hoja, demostrando su transporte en limón Colimex a pesar de la infección con CLas en periodos de alta demanda de fotoasimilados.

Rendimiento. Existen reportes sobre la disminución de la producción como uno de los síntomas impactantes en áreas productoras de cítricos del mundo {Bové, 2006 #231} (Bové, 2006; Li *et al.*, 2009; Gonzalez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2017). En la Figura 2, se observan el rendimiento de los tratamientos evaluados con diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos sin y con HLB en rendimiento anual. El tratamiento injertado sano registró 13.38 kg por árbol en contraste el tratamiento injertado infectado con CLas (7.46 kg). Los tratamientos pie franco obtuvieron 11.26 y 7.20 kg árbol⁻¹ en sanos y enfermos respectivamente. Durante los períodos de abscisión de la fruta,

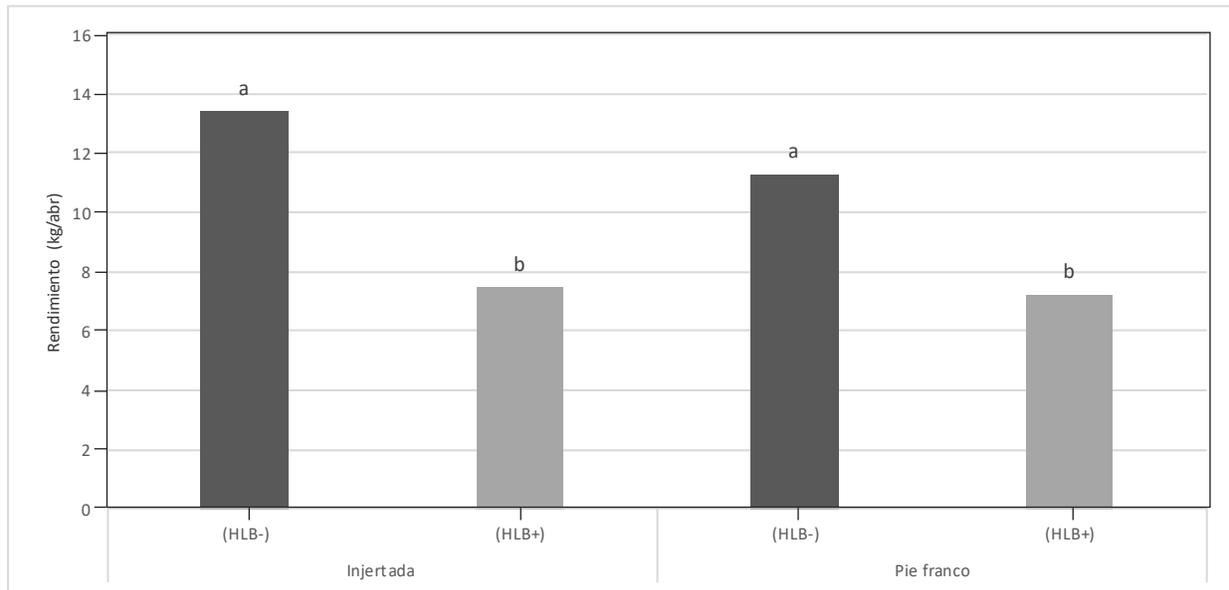


Figura 2. Rendimiento de frutos en kg por árbol de plantas de limón Mexicano en contenedores. Injertada (HLB-) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas-); Injertada (HLB+) = Limón Colimex injertado en Macrofila (CLas+); Pie franco (HLB-) = Limón Colimex pie franco (CLas-); Pie franco (HLB+) = Limón Colimex pie franco (CLas+). Medias en las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$).

la competencia por los carbohidratos se considera un factor limitante y la nutrición se apoya en la fotosíntesis actual y los carbohidratos almacenados después de la anthesis (Monerri *et al.*, 2011). Dutt *et al.* (2015), demostraron que la infección de CLas activa mecanismos de resistencia de la planta los cuales pueden afectar negativamente a la biomasa de los cultivos, debido a la competencia metabólica entre ambos procesos biológicos (Cipollini *et al.*, 2003). También existe la hipótesis que la deposición de calosa en poros de tubos cribosos que interfiere con el transporte de productos fotosintéticos a los órganos demanda (Boava *et al.*, 2017), afectando la productividad y la calidad de la fruta (Shen *et al.*, 2013). En esta investigación se observó que el rendimiento fue afectado por el CLas en limón Colimex aún injertado en Macrofila, concordando

con lo reportado por Robles-González *et al.* (2017) quienes describieron que en limón Mexicano con CLas, inducen pérdidas del 50% en la producción.

CONCLUSIONES

El uso del portainjerto Macrofila en árboles de limón Colimex con CLas disminuye el almidón en lámina foliar, la sacarosa en nervadura, y aumenta las concentraciones de nutrimentos (N y Mg) de forma estacional; aunque, se aminoran algunos efectos negativos del HLB. El uso del portainjerto Macrofila no mejoró los rendimientos en limón Colimex infectado con CLas (7.46 kg árbol⁻¹) en comparación con pie franco que produjo 7.20 kg árbol⁻¹.

LITERATURA CITADA

- Achor D, Etxeberria E, Wang N, Folimonova S, Chung K and Albrigo L. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathology Journal* 9(2):56-64. <http://dx.doi.org/10.3923/ppj.2010.56.64>
- Albrecht U and Bowman KD. 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science* 185: 118-130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.09.008>
- Albrecht U, McCollum G and Bowman KD. 2012. Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) trees. *Scientia horticultrae* 138: 210-220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2012.02.027>
- Boava LP, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2017. Physiologic, anatomic, and gene expression changes in *Citrus sunki*, *Poncirus trifoliata*, and their hybrids after '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Infection. *Phytopathology* 107(5): 590-599. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0077-R>
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology* 88(1):7-37. <https://www.jstor.org/stable/41998278>.
- Brlansky R, Chung K and Rogers M. 2012. 2006. Florida citrus pest management guide: Huanglongbing (citrus greening). UF/IFAS Extension. <https://swfrec.ifas.ufl.edu/hlb/database/pdf/00001370.pdf>
- Castle WS. 2010. A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience* 45(1):11-15. <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.45.1.11>
- Cevallos-Cevallos JM, Futch DB, Shilts T, Folimonova SY and Reyes-De-Corcuera JI. 2012. GC-MS metabolomic differentiation of selected citrus varieties with different sensitivity to citrus Huanglongbing. *Plant Physiology and Biochemistry* 53: 69-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.010>
- Cimo G, Bianco RL, Gonzalez P, Bandaranayake W, Etxeberria E and Syvertsen JP. 2013. Carbohydrate and nutritional responses to stem girdling and drought stress with respect to understanding symptoms of Huanglongbing in citrus. *HortScience* 48(7): 920-928. <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.48.7.920>
- Cipollini D, Purrington CB and Bergelson J. 2003. Costs of induced responses in plants. *Basic and Applied ecology* 4(1): 79-89. <http://dx.doi.org/10.1078/1439-1791-00134>
- da Graça J, Kunta M, Sétamou M, Rascoe J, Li W, Nakhla M, Salas B and Bartels D. 2015. Huanglongbing in Texas: Report on the first detections in commercial citrus. *Journal of Citrus Pathology*. <http://dx.doi.org/10.5070/C421027939>
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW and Williams KP. 2009. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(8): 1011-1020. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>
- Dutt M, Barthe G, Irey M and Grosser J. 2015. Transgenic citrus expressing an Arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). 10(9): e0137134. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137134>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782.
- Etxeberria E, Gonzalez P, Achor D and Albrigo G. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74(1): 76-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2009.09.004>
- Fan J, Chen C, Brlansky R, Gmitter Jr F and Li ZG. 2010. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Plant pathology* 59(6): 1037-1043. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02328.x>
- Fan J, Chen C, Yu Q, Khalaf A, Achor DS, Brlansky RH, Moore GA, Li ZG and Gmitter Jr FG. 2012. Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection. *Molecular plant-microbe interactions* 25(11): 1396-1407. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-06-12-0150-R>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G 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. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>
- Folimonova SY, Robertson CJ, Garnsey SM, Gowda S and Dawson WO. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99(12): 1346-1354. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1346>
- García-Mina JM. 2012. Plant Nutrition and Defense Mechanism: Frontier Knowledge. In: Srivastava A. (eds.) *Advances in Citrus Nutrition*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4171-3_1
- Geigenberger P and Stitt M. 1993. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189(3): 329-339. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00194429>
- Gonzalez P, Reyes-De-Corcuera J and Etxeberria E. 2012. Characterization of leaf starch from HLB-affected and unafflicted-girdled citrus trees. *Physiological and molecular plant pathology* 79: 71-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2012.05.002>

- Gonzalez P, Reyes J and Etxeberria E. 2011. Starch analysis of HLB-affected and control healthy citrus leaves reveal variations in the amylose/amylopectin ratio. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 124: 69-75. <http://journals.fcla.edu/.../81743>
- Hall DG and Hentz MG. 2016. An evaluation of plant genotypes for rearing Asian citrus psyllid (Hemiptera: Liviidae). Florida Entomologist 471-480. <http://dx.doi.org/10.1653/024.099.0320>
- Hijaz F and Killiny N. 2014. Collection and chemical composition of phloem sap from *Citrus sinensis* L. Osbeck (sweet orange). PLoS One 9(7):e101830. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101830>
- Iftikhar Y, Rauf S, Shahzad U and Zahid MA. 2016. Huanglongbing: Pathogen detection system for integrated disease management—A review. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 15(1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2014.04.006>
- Kim J-S, Sagaram US, Burns JK, Li J-L and Wang N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection: microscopy and microarray analyses. Phytopathology 99(1): 50-57. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-1-0050>
- Koh E-J, Zhou L, Williams DS, Park J, Ding N, Duan YP and Kang BH. 2012. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. Protoplasma 249: 687-697. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-011-0312-3>
- Legaz F, Primo-Millo E, Primo-Yufera, Gil EC and Rubio JL. 1982. Nitrogen fertilization in citrus, I: absorption and distribution of nitrogen in Calamondin trees (*C. mitis* Bl.) during flowering, fruit set, and initial fruit development periods. Plant Soil 66:339-351. <https://doi.org/10.1007/BF02183800>
- Li W, Levy L and Hartung JS. 2009. Quantitative distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in citrus plants with citrus huanglongbing. Phytopathology 99: 139-144. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-2-0139>
- Manzanilla-Ramírez MÁ, Villegas-Monter Á, Velázquez-Monreal JJ, Zavaleta-Mancera H A, Sandoval-Villa M y Muñoz-Orozco A. 2019. Cambios fisiológicos en árboles de limón Mexicano en producción infectados con HLB. Revista mexicana de ciencias agrícolas 10 (7): 1603-1614. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1957>
- Menge JA, Johnson ELV and Platt RG. 1978. Mycorrhizal dependency of several citrus cultivars under three nutrient regimes. New Phytologist 81(3): 553-559. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.1978.tb01628.x>
- Monerri C, Fortunato-Almeida A, Molina R, Nebauer S, Garcia-Luis A and Guardiola J. 2011. Relation of carbohydrate reserves with the forthcoming crop, flower formation and photosynthetic rate, in the alternate bearing ‘Salustiana’ sweet orange (*Citrus sinensis* L.). Scientia Horticulturae 129(1): 71-78. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.009>
- Munir S, He P, Wu Y, He P, Khan S, Huang M, Cui W, He P and He Y. 2017. Huanglongbing Control: Perhaps the End of the Beginning. Microbial ecology 76(1):192-204 <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-017-1123-7>
- National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. 2018. A Review of the Citrus Greening research and development efforts supported by the Citrus research and development Foundation: Fighting a Ravaging Disease. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25026>
- Obreza TA and Morgan KT. 2008. Nutrition of Florida Citrus Trees, 2nd Edition. Florida Cooperative Extension Service. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Pustika A, Subandiyah S, Holford P, Beattie G, Iwanami T and Masaoka Y. 2008. Interactions between plant nutrition and symptom expression in mandarin trees infected with the disease huanglongbing. Australasian Plant Disease Notes 3: 112-115. <http://dx.doi.org/10.1007/BF03211261>
- Ramadugu C, Keremane ML, Halbert SE, Duan YP, Roose ML, Stover E and Lee RF. 2016. Long-term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in Citrus relatives. Plant disease 100(9):1858-1869. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0271-RE>
- Razi M, Khan IA and Jaskani MJ. 2011. Citrus plant nutritional profile in relation to Huanglongbing prevalence in Pakistan. Pakistan Journal of Agricultural Sciences 48(4):299-304.
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MÁ, Velázquez-Monreal JJ y Carrillo-Medrano SH. 2017. Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón Mexicano en Colima, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8(5): 1101-1111. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.111>
- Saucedo-Veloz C, Hernández-Rivera A, Arellano-Ostoa G, Robles-Gonzales MM, Jaén-Contreras D y Contreras-Oliva A. 2018. Calidad y vida poscosecha de frutos de limón Mexicano provenientes de árboles con síntomas de HLB y asintomáticos. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 9(8): 1801-1807. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i8.1724>
- Schumann AW, Syvertsen JP and Morgan KT. 2009. Implementing advanced citrus production systems in Florida: Early results. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 122:108-113. https://swfrec.ifas.ufl.edu/docs/pdf/economics/projects/econ_aps.pdf
- Shen W, Cevallos-Cevallos JM, Da Rocha U, Arevalo HA, Stansly PA, Roberts PD and van Bruggen AH. 2013. Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus Liberibacter Ct* values in citrus trees infected with Huanglongbing. European journal of plant pathology 137: 727-742. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-013-0283-7>
- Shokrollah H, Abdullah TL, Sijam K and Abdullah SNA. 2011. Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks against HLB disease in Malaysia. Crop protection 30(5): 521-525. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2010.09.005>

- Spann TM and Schumann AW. 2009. The role of plant nutrients in disease development with emphasis on citrus and Huanglongbing. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 122: 169-171.
- Stover E, Shatters RG, Gruber B, Kumar P and Moore GA. 2016. Influence of Photoperiod Duration and phloem disruption through scoring on growth, disease symptoms, and bacterial titer incitrus graft inoculated with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. HortScience 51(10):1215-1219. <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI11084-16>
- Whitaker DC, Giurcanu MC, Young LJ, Gonzalez P, Etxeberria E, Roberts P, Hendricks K and Roman F. 2014. Starch content of citrus leaves permits diagnosis of Huanglongbing in the warm season but not cool season. HortScience 49(6): 757-762. <http://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI.49.6.757>
- Zhao H, Sun R, Albrecht U, Padmanabhan C, Wang A, Coffey MD, Girke T, Wang Z, Close TJ and Roose M. 2013. Small RNA profiling reveals phosphorus deficiency as a contributing factor in symptom expression for citrus Huanglongbing disease. Molecular plant 6(2): 301-310. <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sst002>