

Identificación de híbridos de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) tolerantes a *Candidatus* *Liberibacter asiaticus*

Marciano Manuel Robles-González*, Silvia Heréndira Carrillo-Medrano, Miguel Ángel Manzanilla-Ramírez, José Joaquín Velázquez-Monreal, Mario Orozco-Santos, INIFAP Campo Experimental Tecomán. Km. 35 Carretera Colima-Manzanillo. Tecomán, Colima, México. C.P. 28930; Victor Manuel Medina-Urrutia† Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100 Nextipac, Zapopan, Jalisco C.P.45200.

*Autor de correspondencia: mmrobles55@hotmail.com

Recibido: Agosto 28, 2022.

Aceptado: Octubre 26, 2022.

Robles-González MM, Carrillo-Medrano SH, Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ, Orozco-Santos M y Medina-Urrutia VM. 2022. Identificación de híbridos de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) tolerantes a *Candidatus* *Liberibacter asiaticus*. Revista Mexicana de Fitopatología 40(4).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-7>

Resumen. Con el fin de identificar genotipos con mayor tolerancia a CLas, una población de 621 híbridos, desarrollados mediante el cruzamiento de cuatro genotipos de limón mexicano con tres variedades de limón italiano, cuatro citranges, un citrumelo, dos híbridos somáticos que portan genoma de citrange, un híbrido somático con genoma de pomelo y un limequat, se establecieron en campo, en un sitio con altas poblaciones del vector *D. citri* y alta carga del patógeno. A dos años y medio, cuando el 100 % de los híbridos fueron totalmente sintomáticos e iniciaron la fase de fructificación, se caracterizaron mediante un índice de expresión de síntomas, desarrollado con base el color del follaje y tonalidad del moteado. De las cruza de limón

mexicano x citranges y de limón mexicano x limones italianos, se detectaron 60 genotipos híbridos con bajo índices de expresión de síntomas. El menor índice de expresión de síntomas se asoció a bajas concentraciones de CLas en hojas. Las concentraciones de CLas fueron más bajas en los híbridos que contenían genoma de citranges. Por su nivel de tolerancia a CLas y características físicas de fruta, 16 híbridos fueron seleccionados y enviados a la fase de evaluación semicomercial.

Palabras clave: Mejoramiento genético, hibridación convencional, huanglongbing, enfermedad, síntomas.

En los últimos años el cultivo del limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) ha estado amenazado por la presencia de enfermedades que ponen en riesgo su permanencia como actividad agrícola de alta importancia económica. El Huanglongbing (HLB), asociada a la infección por la α -proteobacteria *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* (CLas) es el reto más grande que ha enfrentado este cultivo en México. Se ha determinado que el HLB provoca la pérdida

generalizada de vigor en los árboles, lo que se traduce en reducción de su capacidad de producción de fruta (Robles-González *et al.*, 2018). Cuando los síntomas de HLB se manifiestan en el 100% del dosel de los árboles, la producción de fruta se reduce hasta en 50%, comparado con árboles sin síntomas (Robles-González *et al.*, 2013).

Se ha señalado al HLB como la enfermedad más destructiva de los cítricos (Wang *et al.*, 2016) ya que ha impactado fuertemente tanto las superficies cultivadas, como los rendimientos y los costos de producción, en distintas regiones productoras de cítricos en el mundo (Hodges y Spreen, 2012; Djeddour *et al.*, 2021; Da Costa *et al.*, 2021). A pesar de los extensos esfuerzos de investigación, hasta hoy, esta enfermedad es muy difícil de controlar debido a la complejidad de las interacciones planta-vector-bacteria (Alquézar *et al.*, 2021).

De acuerdo con Stover *et al.* (2015a) y McCollum *et al.* (2016), el desarrollo de variedades de cítricos resistentes o tolerantes a CLAs es la mejor solución a largo plazo para esta enfermedad. Además de ser la más eficiente, económica y ambientalmente segura (Pappu *et al.*, 1995). Una de las estrategias de mejoramiento genético es la producción de híbridos mediante la metodología convencional, usando genotipos tolerantes o resistentes. Desafortunadamente, la mayoría de las variedades comercialmente importantes, así como muchos parientes cercanos de los cítricos, son susceptibles a la enfermedad (Albrecht y Bowman, 2011). Por lo que, hasta hoy no hay disponible ninguna variedad de cítricos resistente a HLB (McCollum *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2021; Alves *et al.*, 2021).

Aunque, como lo señala McCollum *et al.* (2016) no existe una verdadera resistencia a CLAs, hay informes de la existencia de genotipos que han mostrado diferentes niveles de tolerancia. Según Wang *et al.* (2016) y Wu *et al.* (2021) algunas especies y/o variedades de cítricos han mostrado distinto

grado de tolerancia y más alto nivel de expresión de genes relacionados con mecanismos de defensa.

Al respecto, Folimonova *et al.* (2009) al evaluar la respuesta de 30 genotipos de cítricos a los aislamientos de CLAs de Florida, bajo condiciones controladas en invernadero o cuarto de crecimiento, observaron que las plantas de *C. halimii*, la mandarina ‘Clementina Nules’ (*C. clementina*) y el tangelo ‘Minneola’ (*C. paradisi* x *C. reticulata*), resultaron ser los más sensibles y por lo general fueron las primeras en morir. La mandarina ‘Sun Chu Sha’ (*C. reticulata*), la naranja agria (*C. aurantium*), el limón ‘Volkameriano’ (*C. volkameriana*), el limón ‘Macrofila’ (*C. macrophylla*), el citrume-lo ‘Swingle’ (*C. paradisi*. x *Poncirus trifoliata*), la cidra (*C. medica*), la lima dulce de Palestina (*C. limettioides*), el limón ‘Mexicano’ (*C. aurantifolia*), el calamondín (*Citrofortunella microcarpa*) y *C. micrantha*, desarrollaron síntomas cloróticos distintivos, pero continuaron creciendo y se clasificaron como “moderadamente tolerantes. El limón ‘Eureka’ (*C. limon*), la lima ‘Persa’ (*C. latifolia*), el citrange ‘Carrizo’ (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) y *Severinia buxifolia*, fueron altamente tolerantes al patógeno. Las plantas de estos cítricos desarrollaron pocos o ningún síntoma visual bajo condiciones de invernadero y continuaron creciendo vigorosamente, de manera similar a los árboles no inoculados. Sin embargo, los autores señalan que para *P. trifoliata* los resultados fueron inconsistentes.

Por su parte Stover *et al.* (2010) al estudiar las diferencias en la aparente tolerancia/resistencia a CLAs, expresada por concentraciones bajas de la bacteria, en una plantación de *P. trifoliata* y sus híbridos injertados sobre mandarina ‘Sun Chu Sha’ y que estuvieron expuestos a la infección natural en campo, observaron que *P. trifoliata* tenían una cantidad de CLAs no detectable o baja, al igual que dos citranges, y concluyeron que *P. trifoliata* y algunos de sus híbridos pueden “tolerar” a CLAs, al supri-

mir significativamente su replicación en el floema, incluso cuando se injertan en un genotipo fuente de alta concentración de la bacteria.

Así mismo, Stover y McCallum (2011) al evaluar ocho cultivares de cítricos que crecían en plantaciones comerciales con presión de enfermedades típicas de Florida, determinaron que, la incidencia y severidad del HLB variaron considerablemente entre las huertas y detectaron diferencias específicas entre las variedades. El tangor ‘Temple’ (*C. reticulata*) mostró consistentemente la incidencia más baja de síntomas de HLB y del título de CLas. En cambio, el tangor ‘Murcott’ y tangelo ‘Minneola’ tuvieron mayor incidencia de síntomas y mayores concentraciones de la bacteria. Por lo que concluyeron que se puede encontrar una resistencia útil al HLB con síntomas reducidos y concentraciones bajas de CLas en cultivares convencionales. Albrecht y Bowman (2012) también informaron que los portainjertos citrange ‘Carrizo’, US-897 y US-942 resultaron tolerantes, US-802, US-812 y el limón ‘Volkameriano’ moderadamente tolerantes, y la mandarina Cleopatra susceptible a CLas.

No se han identificado genes específicos de tolerancia a CLas en *P. trifoliata*, pero estudios recientes han demostrado que los genes de resistencia a enfermedades constitutivas se expresaron en niveles mucho más altos en híbridos de *Poncirus* tolerantes a este patógeno en comparación con los genotipos susceptibles (Rawat *et al.*, 2017). Los informes de la mayor tolerancia expresada por *P. trifoliata* y algunos citranges, alienta a los grupos de investigación para generar híbridos complejos cruzando *Citrus x Poncirus* (McCollum *et al.*, 2016).

Por otra parte, la apomixis, también conocida como embrionía nucelar, embriogénesis adventicia o poliembrionía (Kishore, 2014) ha sido un fuerte obstáculo para la generación de variedades a través de la hibridación convencional (Wang *et al.*, 2017; Simsek *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2021). En las semillas

de especies poliembriónicas, al mismo tiempo que se inicia el crecimiento del embrión sexual o cigótico, se desarrollan varios embriones de origen nucelar, (Kepiro y Roose, 2010; Mondal *et al.*, 2015) que compiten con el embrión de origen sexual, tanto por espacio dentro de la semilla como por nutrientes, y generalmente terminan eliminándolo en etapas muy tempranas de su desarrollo (Moore *et al.*, 1993). Por lo tanto, el rescate oportuno y germinación *in vitro* de embriones inmaduros se ha convertido en una estrategia muy útil para superar el problema de apomixis y avanzar en el mejoramiento genético de cítricos.

A partir de 2009 el Campo Experimental Tecomán del INIFAP, en el estado de Colima, México, inició el programa de mejoramiento genético de limón Mexicano por el método de hibridación convencional, asistido por técnicas de rescate y germinación *in vitro* de embriones inmaduros, con la finalidad de generar variedades con mayor tolerancia a patógenos causantes de enfermedades de importancia económica como son el HLB, virus tristeza de los cítricos y antracnosis (*Colletotrichum acutatum*).

Este estudio tuvo como objetivo identificar genotipos con mayor tolerancia a CLas, en una población de híbridos F1, desarrollados mediante el cruzamiento de cuatro genotipos de limón Mexicano con tres variedades de limón italiano, cuatro citranges, un citrumelo, dos híbridos somáticos que portan genoma de citrange, un híbrido somático con genoma de pomelo y un limequat bajo condiciones de infección natural, en un sitio con altas poblaciones del vector *D. citri* y alta carga del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en los terrenos del Campo Experimental Tecomán del INIFAP,

ubicado en el Km 35 carretera Colima-Manzanillo, en Tecomán Colima, México, a los 18°53'7" latitud norte y 103°50'30" longitud oeste, a 30 msnm. Se usaron 621 genotipos confirmados como híbridos, mediante marcadores morfológicos, citometría de flujo y marcadores moleculares y que resultaron de 31 combinaciones genéticas generadas por el cruzamiento de los genotipos 'Colimex', Mex 13, Mex 20 y Mex 24 de limón mexicano con las variedades 'Limoneira 8A', 'Rosenberger' y 'Eureka' de limón italiano (*C. limon*), los Citranges 'Benton', 'C-32' y 'C-35' (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) y 'Yuma' (*P. trifoliata* x *C. sinensis*) el Citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) los híbridos somáticos HS 10 y HS 11 (*C. amblycarpa*) + (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), y HS 15 (*C. amblycarpa*) + (*C. maxima*) y el limequat, (*C. aurantifolia* × *Fortunella japonica*) como se presentan en el Cuadro 1. Los híbridos se clonaron por injerto sobre limón 'Macrofila' (*C. macrophylla*) generándose número variable de copias, desde dos hasta cuatro de cada uno y se llevaron a campo entre el 15 al 18 de julio del 2014. La plantación se hizo a doble hilera, dejando 2.5 m entre árboles, 2.0 m entre hileras y 6 m entre cada doble hilera (1,600 árboles/ha). El sitio experimental se encuentra en una zona de alta incidencia del vector y altas concentraciones del patógeno, que resulta un ambiente adecuado para observar la respuesta de los híbridos a la infección natural de CLas (Albrecht y Bowman, 2011; Albrecht *et al.*, 2014). El suelo es del tipo migajón arcilloso con alto contenido de CaCO₃ y pH de 7.8. Se aplicaron riegos por aspersión tres veces por semana con una duración de 6 horas/día. La fertilización se hizo de acuerdo al paquete tecnológico de limón Mexicano (Robles-González *et al.*, 2017). No se hizo control de vector con el fin de mantener poblaciones altas y promover la infección natural de CLas en los árboles híbridos y de esa manera poder estudiar su respuesta a la enfermedad.

Dinámica de aparición de árboles con síntomas de HLB

A partir del 8 diciembre de 2014, semana 19 desde la plantación (DP), hasta el 17 de agosto de 2015, semana 48 DP, y cuando el 100 % de los árboles en la progenie de los híbridos presentaron hojas con moteado difuso asimétrico, síntoma característico del HLB, se completaron seis inspecciones visuales de los árboles con el objetivo de registrar datos del número y porcentaje de árboles sintomáticos y con ello, determinar la dinámica de infección en las poblaciones de híbridos. Para el análisis, se calcularon las frecuencias de árboles con síntomas para cada inspección y para cada una de las combinaciones genéticas, resultado de las hibridaciones.

Color del follaje y tono del moteado amarillento en hojas sintomáticas

En diciembre de 2016, cuando los híbridos completaron dos años y medio de exposición a la infección natural de CLas y el 100 % de los árboles presentaron síntomas evidentes de la enfermedad, desde una distancia de 3 m, se revisó su copa, para determinar su respuesta a la enfermedad en función a tres niveles del color del follaje; Verde (1), Verde amarillento (2) y Amarillo (3), luego desde una distancia de 30 a 50 cm, se revisaron y caracterizaron las hojas sintomáticas con 70 a 80 días de edad, con base a tres niveles del tono del moteado; Verde claro (1), verde amarillento (2) y amarillo (3). Los valores del color del follaje se multiplicaron por los valores del tono del moteado y se generaron seis índices de expresión de síntomas del HLB (IES), con valores de 1, 2, 3, 4, 6 y 9. Para el análisis se calcularon las frecuencias (%) de árboles que mostraron cada uno de esos IES para cada una de las combinaciones genéticas.

Cuadro 1. Combinaciones genéticas entre limones mexicanos con otros cítricos que tienen potencial de generar genotipos híbridos con mayor tolerancia a CLAs.

Progenitor Femenino	Progenitor masculino
'Colimex' (<i>C. aurantifolia</i>)	HS 10: 'Amblicarpa'+'Benton': (<i>C. amblycarpa</i>) + (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
	HS 11: 'Amblicarpa'+'C-35': (<i>C. amblycarpa</i>)+(<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
	HS 15: 'Amblicarpa'+Pomelo: (<i>C. amblycarpa</i>) +(<i>C. maxima</i>)
	Citrange 'Benton' (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
	Citrange 'Yuma': (<i>P. trifoliata</i> x <i>C. sinensis</i>)
	Citrange 'C-32': (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
	Citrange 'C-35': (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
	Citrumelo-'Swingle': (<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>)
	Pomelo: (<i>C. maxima</i>)
	'Eureka'(<i>C. limon</i>)
	Limoneira L8A: (<i>C. limon</i>)
	'Rosenberg': (<i>C. limon</i>)
	'Limequat' (<i>C. aurantifolia</i> x <i>Fortunella japonica</i>)
Mex 13 (<i>C. aurantifolia</i>)	Limoneira L8A: (<i>C. limon</i>)
	'Eureka': (<i>C. limon</i>)
	'Rosenberg': (<i>C. limon</i>)
	Citrange 'C-35': (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
	Citrange 'C-32': (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
Mex 20 (<i>C. aurantifolia</i>)	Citrange "Yuma": (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
	Citrange 'C-32': (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
Mex 24 (<i>C. aurantifolia</i>)	'Limequat': (<i>C. aurantifolia</i> x <i>Fortunella japonica</i>)
	Citrange 'Yuma': (<i>C. sinensis</i> x <i>P. trifoliata</i>)
'Eureka' (<i>C. limon</i>)	'Colimex': (<i>C. aurantifolia</i>)
	Mex 13: (<i>C. aurantifolia</i>)
	Mex 20: (<i>C. aurantifolia</i>)
Limoneira L8A (<i>C. limon</i>)	'Colimex': (<i>C. aurantifolia</i>)
	Mex 13: (<i>C. aurantifolia</i>)
	Mex 20: (<i>C. aurantifolia</i>)
'Rosenberg' (<i>C. limon</i>)	'Colimex': (<i>C. aurantifolia</i>)
	Mex 13: (<i>C. aurantifolia</i>)
	Mex 20: (<i>C. aurantifolia</i>)

Tono del moteado y número de copias de CLAs en la hoja

Se seleccionaron 82 árboles híbridos F1 de las distintas combinaciones genéticas que presentaran algunos de los IES; 1, 2, 4 y 6, con 22, 19, 22 y 19 árboles respectivamente. Con el fin de promover

brotación vegetativa simultánea en todos los árboles y tener hojas de la misma edad, se les podó una ramilla en cada punto cardinal, cortando en el punto donde tuvieran de 8 a 10 mm de diámetro, sin importan que no coincidiera con la base ramilla. Después de 80 días, cuando las hojas de los brotes vegetativos emergidos después de la poda completaron

su desarrollo y las hojas presentaban ya los síntomas característicos del moteado de HLB, se colectaron 10 hojas sintomáticas por cada árbol. Se etiquetaron, se metieron en bolsas de papel, luego se pusieron en una hielera con gel refrigerante y se enviaron al Centro Nacional de Recursos Genéticos para que mediante la técnica de qPCR se determinaran las concentraciones de la bacteria a través del número de copias de gen 16S ribosomal de CLas por miligramo de tejido.

El ADN se extrajo usando el método CTAB (Doyle y Doyle, 1990). Las amplificaciones de PCR tiempo real se llevaron a cabo utilizando el sistema LightCycler 1.5 (Roche). Las reacciones se hicieron con un volumen de 10 µL conteniendo Master mix 1X, 250 nM de cada iniciador HLBas y HLBr, 150 nM de la sonda HLBp (TaqMan), 100 ng de ADN y H₂O grado molecular (Li *et al.*, 2006). Las secuencias de los iniciadores y la sonda utilizadas fueron HLBas: 5'-TCGAGCGCG-TATGCAATACG-3', HLBr: 5'-CTACCTTTTTC-TACGGGATAACGC-3' y HLBp: 5'-AGACGGG-TGAGTAACGC-3'. Las condiciones de reacción para la amplificación fueron de 95 °C por 10 min seguido de 50 ciclos a 95 °C por un min y 58 °C por 40 segundos. Todas las reacciones se llevaron a cabo por duplicado en cada corrida y se incluyó un control negativo y otro positivo.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Dinámica de aparición de árboles con síntomas de HLB

Los híbridos de todas las combinaciones genéticas mostraron igual sensibilidad a ataque de las plagas y enfermedades comunes para el limón mexicano en la región. A excepción de la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) a la que la ma-

yoría de los árboles no presentaron los síntomas correspondientes. Esto se explica por el hecho de que esta enfermedad solo ataca a los genotipos de limón Mexicano (Orozco-Santos *et al.*, 2013) y no afecta a las otras especies de cítricos que se usaron en los cruzamientos y, por lo tanto, los híbridos heredaron su tolerancia o resistencia de esos progenitores. Esto ya representa un logro importante y una ventaja respecto al limón Mexicano convencional.

En este sitio, las altas poblaciones de *D. citri* están presentes desde el 2006 y el HLB es endémico desde mayo de 2011, por lo que, para el tiempo en que se establecieron los híbridos en campo, la incidencia de árboles sintomáticos en la zona era de 100%. Dadas esas condiciones de alta concentración del patógeno en la zona, en un término de tres meses, los árboles de algunos cruzamientos ya presentaban hojas con síntomas característicos del HLB. Como se muestra en el Cuadro 2, para la semana 19 DP, el 14.3 % de árboles en la población de híbridos, presentaron el moteado característico del HLB. A nivel particular, los mayores porcentajes de árboles sintomáticos (16.6 a 44.4 %), los presentaron los progenitores de limón Mexicano y los de limón italiano, así como los híbridos de limón Mexicano x limones italianos y de limón Mexicano x híbridos somáticos. Esto demuestra una respuesta temprana a la enfermedad que tienen los limones mexicanos y los limones italianos para presentar los síntomas de la enfermedad del HLB, como lo sugiere de Curtolo *et al.* (2020). Este resultado contrasta con lo señalado para otros cítricos (Lee *et al.*, 2015). Las cruza de limones mexicanos x citranges y de limón Mexicano x 'Limequat', presentaron los menores porcentajes de árboles sintomáticos para esta variable en esta fecha.

Para las inspecciones posteriores, la proporción de árboles sintomáticos en todas las combinaciones genéticas aumentó gradualmente hasta alcanzar un promedio general de 83.88 % en la semana 48 DP.

Cuadro 2. Frecuencias (%) de árboles híbridos F1 de las cruzas de limón Mexicano con otros cítricos y sus progenitores que presentaron síntomas del HLB entre las semanas 19 a la 48 después de su establecimiento en campo.

Genealogía	Árboles Núm.	Semanas desde la plantación					
		19	26	30	37	42	48
Mexicanos x Citranges	384	3.6	5.6	25.7	42.3	64.6	71.6
Mexicano x 'Limequat'	41	0.0	0.0	9.2	23.4	64.7	66.4
Mexicano x HS	138	27.8	39.2	55.9	88.2	95.6	97.2
Mexicanos x Italianos	825	22.4	44.3	62.9	82.9	91.6	95.6
Limonos Mexicanos	19	16.6	52.8	88.9	100.0	100.0	100.0
Limonos Italianos	16	44.4	66.6	66.6	100.0	100.0	100.0
Citranges ^y	24						25.0
'Limequat' ^y	2						100.0
Híbridos somáticos ^y	15						93.0
Pomelo ^y	10						90.0
Promedio general		14.3	26.1	38.6	54.6	64.6	83.9

^yHS=Híbridos somáticos; ^yLos datos se tomaron solo en agosto de 2015 de árboles adultos expuestos al HLB desde el año de 2011.

Los limones mexicanos y los limones italianos alcanzaron el 100 % de árboles sintomáticos desde la semana 37 DP. Por su parte las cruzas de limones mexicanos x híbridos somáticos y de limones mexicanos x limones italianos superaron el 95 % hasta la semana 48 DP. Los híbridos de las cruzas de limones mexicanos x citranges registraron apenas un 71 % de árboles con síntomas en el último muestreo. Los citranges, que estuvieron creciendo en el banco de germoplasma, alcanzaron solo un 24 % de árboles sintomáticos, a pesar de que estuvieron expuestos a la infección natural desde mayo de 2011, cuando se detectó la enfermedad en este sitio experimental.

De estos resultados se puede apreciar que como lo señalan (Albrecht y Bowman, 2012; Folimonova *et al.*, 2009; Stover y McCallum, 2011) los genotipos con genoma de *P. trifoliata* presentan un comportamiento distinto en relación la dinámica de aparición de árboles sintomáticos en poblaciones expuestas a la infección natural. Lo anterior se puede explicar porque los árboles de este género y sus híbridos son menos visitados por el vector como lo

señalan Westbrook *et al.* (2011) y George y Lapointe (2019) y eso determina una dinámica más lenta para su infección. O como sucede en otros cítricos, la infección se mantiene latente y los síntomas tardan más tiempo en expresarse como lo señalan Lee *et al.* (2015).

Color del follaje y tono del moteado amarillento en hojas sintomáticas

Entre los progenitores hubo diferente respuesta al HLB. En el Cuadro 3 se presentan las frecuencias de árboles, de los distintos progenitores usados para los cruzamientos, que presentaron cada uno de los seis niveles del IES. Los IES con valor más alto corresponden a un nivel de tolerancia al patógeno más bajo. Ninguno de los progenitores registró el IES 9, lo que significa que sus árboles no alcanzaron el máximo nivel de amarillamiento en el follaje o que el tono del moteado causado por el CLAs tampoco fue el más alto. Todos los árboles siguen produciendo fruta con características físicas normales y mantienen su calidad comercial. Los progenitores

Cuadro 3. Frecuencias (%) de árboles que mostraron alguno de los seis índices de respuesta a la infección de CLas entre los progenitores usados en cruces de limón Mexicano con otros cítricos.

Progenitores	Árboles Núm.	Índice de respuesta a la infección de clas CLas					
		1	2	3	4	6	9
Hibrido Somático 10	5	-	-	25	50	25	-
Hibrido Somático 11	5	-	-	25	50	25	-
Hibrido Somático 15	5	-	-	25	50	25	-
‘Eureka’	4	-	-	-	50	50	-
‘Limoneira 8A’	4	-	-	-	25	75	-
‘Rosenberg’	5	-	-	-	60	40	-
‘Colimex’	8	-	-	-	-	100	-
Mex 13	7	-	-	-	28.5	71.5	-
Mex 20	4	-	-	-	50	50	-
Mex 24	4	-	-	-	25	75	-
Citrange ‘C-32’	5	100	-	-	-	-	-
Citrange ‘C-35’	4	80	20	-	-	-	-
Citrange ‘Benton’	5	80	20	-	-	-	-
Citrange ‘Yuma’	5	80	20	-	-	-	-
Citrumelo ‘Swingle’	5	80	20	-	-	-	-
‘Limequat’	2	-	-	-	50	50	-
Pomelo	3	-	-	-	75	25	-

de limones mexicanos, los limones italianos, el ‘Limequat’ y el pomelo, registraron IES 4 y 6. Esto sugiere que sus árboles presentan follaje verde o verde amarillento y el moteado puede ser de tono verde claro o incluso amarillo. Esto indica un nivel de tolerancia de medio a alto, lo que coincide con lo señalado por Folimonova *et al.* (2009). Sin embargo, los citranges “C-32” y ‘C-35’, ‘Benton’, ‘Yuma’, el citrumelo ‘Swingle’ registraron IES de 1 y 2 ya que sus árboles presentaron hojas con coloración de verde o verde claro y el moteado verde claro o verde amarillento. Esta es la expresión más baja de la enfermedad, indicando que estos genotipos tienen un mayor nivel de tolerancia a CLas como lo reportaron Stover *et al.* (2010).

Respecto a las poblaciones de híbridos, también mostraron gran variación respecto a esta variable. Después de dos años y medio desde la plantación, los árboles presentaron buen desarrollo, a pesar de estar plantados en un suelo con alto contenido de CaCO₃. Esto se debe a que el portainjerto Macrofi-

la le confirió adaptación a esa condición del suelo. Aunque hubo árboles amarillentos debido al síntoma de HLB, no se registró defoliación como lo reportan Stover *et al.* (2012) y Stover *et al.* (2015a) que sucede en árboles de toronja con alta sensibilidad al HLB. Tampoco se observó reducción de vigor. La mayoría de los árboles habían iniciado el periodo de fructificación, pero no se detectaron síntomas de la enfermedad en la fruta, confirmando un nivel de tolerancia de medio a alto, como lo señala Folimonova *et al.* (2009) para limón Mexicano y limón ‘Eureka’.

Ya que los árboles fueron infectados prácticamente desde la fecha de su establecimiento en campo, para este tiempo, el 100 % de su dosel presentó los síntomas del moteado asimétrico. Solo las hojas de brotes vegetativos con edad menor a los 60 días no lo presentaron, ya que, para este estado de desarrollo de las hojas, los síntomas de la enfermedad aún no se manifiestan claramente (Robles-González *et al.*, 2013). Se pudo identificar árboles

con follaje amarillento y aspecto clorótico, provocado por la expansión de las manchas del moteado asimétrico en las hojas seniles.

Como se observa en el Cuadro 4, en la mayoría de las combinaciones genéticas se detectaron árboles para los distintos IES. Los IES 4, 6 y 9 tuvieron las frecuencias de híbridos más altas con esa clasificación y promediaron 25.2, 48.1 y 23.5 % respectivamente. Estos síntomas considerados de medio a alto en la escala utilizada en el estudio. Con fre-

cuencias menores, pero importantes se detectaron árboles híbridos para los IES 1 y 2, con promedios de 16.2 y 11.9 % respectivamente. Estos árboles presentaron follaje verde, saludable y el moteado fue del tipo verde claro. Sobresalen las cruzas en las que intervinieron principalmente los progenitores de citranges y el citrumelo 'Swingle' por presentar híbridos con IES 1, el más bajo de la escala. Estos híbridos mostraron una buena respuesta a la enfermedad bajo las condiciones en que se reali-

Cuadro 4. Frecuencias (%) de híbridos de limón Mexicano que mostraron alguno de los seis niveles de expresión de síntomas de HLB con base al color de follaje, color y tono del moteado después de 48 semanas de estar expuestos a la infección natural de CLas en campo.

Cruzas	Híbridos Núm.	Índice de expresión de síntomas					
		1	2	3	4	6	9
'Colimex' x HS 10	9		11.1		11.1	66.6	11.1
'Colimex' x HS 11	22		4.5		18.2	50.0	27.2
'Colimex' x HS 15	22		4.5		13.6	68.2	13.6
'Colimex' x 'Benton'	1				100.0		
'Colimex' x 'Yuma'	8	12.5	12.5			12.5	62.5
'Colimex' x 'C-32'	43	37.2	23.2	6.9	11.6	11.6	9.3
'Colimex' x 'C-35'	17	23.5	17.6		23.5	29.4	5.9
'Colimex' x 'Suingle'	6	16.6				50	33.3
'Colimex' x 'Pomelo'	7					100.0	
'Colimex' x 'Limequat'	26	11.5	7.7	3.8	7.7	65.4	3.8
'Colimex' x 'Eureka'	4				25.0	25.0	50.0
'Colimex' x 'Limoneira 8A'	2		50.0			50.0	
'Colimex' x 'Rosenberg'	69	2.9	2.9	5.8	8.7	52.1	27.5
Mex 13 x 'Limoneira 8A'	29		10.3	3.4	20.7	55.1	10.3
Mex 13 x 'Eureka'	15				26.6	46.6	26.6
Mex 13 x 'Rosenberg'	22		13.0		43.4	30.4	13.0
Mex 13 x 'C-35'	92	17.4	5.4	2.1	21.7	47.8	5.4
Mex 13 x 'C-32'	8	22.2	11.1		33.3	33.3	
Mex 13 x 'Yuma'	16	6.2	6.2			62.5	25.0
Mex 19 x 'C-32'	32	21.8	9.3	3.1	21.8	37.5	6.2
Mex 19 x 'Limequat'	8			11.1		66.6	22.2
Mex 24 x 'Yuma'	5	33.3				66.6	
'Eureka' x Mex 13	1				40.0	40.0	20.0
'Limoneira 8A' x 'Colimex'	29		3.4	3.4	6.9	34.5	51.7
'Limoneira 8A' x Mex 13	9				55.5	44.4	
'Limoneira 8A' x Mex 20	3					66.6	33.3
'Rosenberg' x 'Colimex'	25	1.3	3.2	1.3	10.3	47.7	36.1
'Rosenberg' x Mex 13	19		15.8		5.2	47.3	31.5
'Rosenberg' x Mex 20	72	4.1	15.2	1.4	25.0	38.9	15.2
Porcentaje promedio		16.2	11.9	4.2	25.2	48.1	23.5

zó el estudio y pueden ser tomados en cuenta para posteriores trabajos de evaluación agronómica y de calidad de fruta, o bien en próximos trabajos de retrocruzas con el fin de recuperar características deseables de limón Mexicano y eliminar o reducir las no deseadas que confiere *Poncirus* y que son dominantes.

Los resultados de este trabajo tienen semejanza con los reportados por Stover *et al.* (2010) quienes consignan que el género *Poncirus* y algunos de sus híbridos tienen tolerancia a CLAs. También hay coincidencia con lo señalado por Stover *et al.* (2012) quienes señalan que, en la progenie de la cruce entre dos variedades altamente sensibles a este patógeno, pueden aparecer genotipos con mayor tolerancia que sus progenitores. Estos autores observaron que el pomelo ‘Triumph’, un híbrido producto de la cruce de toronja x naranja dulce, dos variedades con alta sensibilidad al HLB, presentó un mejor comportamiento y mayor tolerancia a CLAs bajo un ambiente de donde la enfermedad es endémica.

Algunos híbridos de las cruces de limones mexicanos x limones italianos también presentaron IES 1 y 2. Lo que sugiere que en la segregación y recombinación genética que se da en las hibridaciones entre cítricos, que normalmente son altamente heterocigóticos, se generan nuevas combinaciones

de genes, en las que, como lo menciona Stover *et al.* (2012), se pueden ganar genes de tolerancia o se pueden perder genes para sensibilidad. Cualquiera que sea el caso, es muy importante lograr genotipos que incrementen su nivel de tolerancia a este patógeno en limón Mexicano.

Expresión de síntomas y concentración de bacterias de CLAs en la hoja

De las 82 muestras que se enviaron al laboratorio del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP para determinar presencia y cantidad de la bacteria con base al número de copias de gen 16S ribosomal de CLAs, solo se procesaron exitosamente 60 muestras. El laboratorio reportó los resultados como número de bacterias/mg de tejido de hoja. Se detectó una gran variabilidad en la concentración del patógeno en las distintas muestras, que fueron desde 55 hasta 17,565,313 copias del gen 16S ribosomal /mg de tejido. Al organizar los datos con base al IES se observa cierta relación entre el valor del IES y la concentración del patógeno. En el Cuadro 5 se puede apreciar que los árboles con IES 1, promediaron 129,011 copias del gen 16S ribosomal/mg de tejido, la concentración más baja. Por el contrario, los árboles que tuvieron el IES 6 alcanzaron 2,342,563 copias/mg, el promedio de

Cuadro 5. Número de copias del 16S ribosomal de *C. Liberibacter* en relación con el Índice de Expresión de Síntomas y a tres combinaciones genéticas de limón Mexicano con otros cítricos.

Factor	Bacterias /mg de tejido
Índice de expresión de síntomas	
IES 1	129,011
IES 2	303,483
IES 4	261,503
IES 6	2,342,563
Combinaciones genéticas	
Limones mexicanos x Citranges	120,782
Limones mexicanos x limones italianos	448,879
Limones mexicanos x Híbridos somáticos	1,989,220

concentración más alto. Los árboles con IES 2 y 4, tuvieron promedios intermedios. Cuando los datos se agruparon con base a las combinaciones genéticas generadas por cruzar los limones mexicanos x otros cítricos, el grupo de híbridos de la cruce de limón Mexicano x Citranges promedió 120,782 copias/mg, la concentración más baja del patógeno. Le siguió el grupo de híbridos entre limones mexicanos x limones italianos con 448,879 copias/mg y finalmente el grupo que resultó de las cruces entre limones Mexicano x híbridos somáticos con 1,989,220 copias/mg, que resultó el promedio más alto. De acuerdo con estos resultados, la concentración de CLas en los tejidos parece estar relacionada con el genoma que se empleó en los cruzamientos. Las combinaciones donde se usaron como progenitores los citranges fueron las que tuvieron las concentraciones más bajas. En sus trabajos Stover *et al.* (2015b) encontraron relaciones similares y determinó que el pedigrí de los progenitores tuvo efecto significativo en las concentraciones de CLas.

De los híbridos que mostraron follaje menos afectado por el CLas, se seleccionaron 16 genotipos que además presentaron, ausencia de síntomas de antracnosis y fruta sin semilla. Estos materiales se clonaron y se llevaron a la fase de evaluación semicomercial, donde durante tres años han estado expuestos a la infección natural de CLas. La mayoría de esos genotipos siguen produciendo follaje verde con aspecto sano y mejor comportamiento ante la enfermedad. Un híbrido de limón Mexicano x limón italiano, por su hábito de crecimiento, follaje, tamaño y forma de la fruta, se asemeja al limón ‘persa’ (Figura 1B). Otro híbrido entre Mex 13 x citrange ‘C-35’, produce fruta del tamaño y forma semejante al limón Mexicano, pero sin semilla y con floración constante durante todo el año, lo que lo hace de interés comercial. La evaluación de estos híbridos continuará en la región citrícola de Colima, una de las primeras áreas endémicas de CLas en México y con las mayores cargas de inóculo.

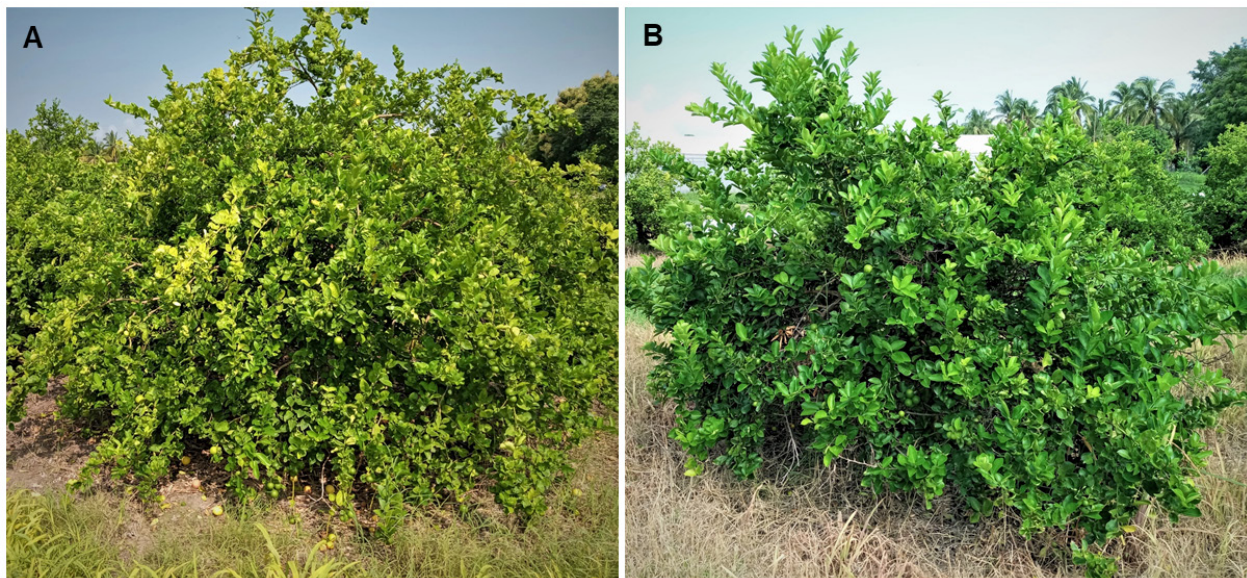


Figura 1. A) Árbol de limón Mexicano variedad ‘Colimex’ mostrando severos síntomas del HLB. B) Árbol híbrido Mex 13 x ‘Rosenberg’, mostrando follaje con síntomas ligeros del HLB.

CONCLUSIONES

La exposición a la infección natural en campo, en un sitio con alta carga del patógeno causante del HLB, permitió identificar 60 híbridos originados del cruzamiento de los genotipos ‘Colimex’, Mex 13, Mex 20 y Mex 24 de limón Mexicano con limón italiano variedad ‘Rosenberger’ y los citranjes ‘Yuma’, ‘C-32’ y ‘C-35’ y el citrumelo ‘Swingle’ con índices de expresión de síntomas bajos y una aparente mayor tolerancia a CLas.

AGRADECIMIENTOS

Al fondo SEP-CONACYT por el financiamiento del proyecto de investigación: Hibridación interploide para generar genotipos de limón Mexicano triploides, sin semilla y con tolerancia a tristeza. Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias por el financiamiento del proyecto de investigación: Evaluación y mejoramiento de híbridos de limón mexicano con mayor tolerancia al HLB-antracnosis y buena calidad de fruta.

LITERATURA CITADA

Albrecht U and Bowman KD. 2011. Tolerance of the Trifoliata Citrus Hybrid US-897 (*Citrus reticulata* Blanco x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) to Huanglongbing. *HORTSCIENCE* 46(1):16–22. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.1.16>.

Albrecht U and Bowman KD. 2012. Tolerance of trifoliata citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae* 147:71–80. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.036>

Albrecht U, Hall DG and Bowman KD. 2014. Transmission efficiency of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and progression of huanglongbing disease in graft and psyllid-inoculated citrus. *HortScience* 49:367-377. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.3.367>.

Alquizar B, Carmona L, Bennici S and Peña L. 2021 Engineering of citrus to obtain huanglongbing resistance. *Current Opinion in Biotechnology* 70:196-203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.003>.

Alves MN, Lopes SA, Raiol-Junior LL, Wulff NA, Girardi EA, Ollitrault P and Peña L. 2021. Resistance to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ the Huanglongbing Associated Bacterium, in Sexually and/or Graft-Compatible Citrus Relatives. *Frontiers in Plant Science* 11:617664. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.617664>.

Bermúdez Guzmán MJ, Guzmán Rodríguez LF, García Mariscal KP, Palmeros Suárez PA, and Orozco Santos M. 2017. Identifying hybrids of *Citrus aurantifolia* × *Citrus limon* using simple sequence repeats (SSR) markers. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 8(6): 1397–1408. doi.org/10.29312/remexca.v8i6.309

Curtolo M, de Souza Pacheco I, Boava LP, Takita MA, Granato LM, Galdeano DM, de Souza AA, Cristofani-Yaly M and Machado MA. 2020. Wide-ranging transcriptomic analysis of *Poncirus trifoliata*, *Citrus sunki*, *Citrus sinensis* and contrasting hybrids reveals HLB tolerance mechanisms. *Scientific Reports* 10(1):20865. [doi: 10.1038/s41598-020-77840-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-77840-2).

Da Costa GV, Neves CSVJ, Bassanezi RB, Pereira Leite P Jr and Telles TS. 2021. Economic impact of Huanglongbing on orange production. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal* 43(3): 1-10. <https://doi.org/10.1590/0100-29452021472>

Djeddour D, Pratt C, Constantine K, Rwomushana I and Day R. 2021. The Asian citrus greening disease (huanglongbing): Evidence note on invasiveness and potential economic impacts for East Africa. *CABI Working Paper* 24, 94 pp. <https://dx.doi.org/10.1079/CABICOMM-62-8158>.

Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

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. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-12-1346>.

George J and Lapointe SL. 2019. Host-plant resistance associated with *Poncirus trifoliata* influence oviposition, development and adult emergence of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Pest management science* 75(1):279-285. <https://doi.org/10.1002/ps.5113>.

Hodges A and Spreen T. 2012. Economic impacts of citrus greening (HLB) in Florida, 2006/07–2010/11. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. EDIS FE903. <https://doi.org/10.32473/edis-fe903-2012>.

Kepiro JL and Roose ML. 2010. AFLP markers closely linked to a major gene essential for nucellar embryony (apomixis) in *Citrus maxima* × *Poncirus trifoliata*. *Tree Genetics & Genomes* 6: 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11295-009-0223-z>.

Kishore K. 2014. Polyembryony. pp. 355–370. In: Ramawat KG, Mérillon JM and Shivanna K. (eds.) *Reproductive Biology of Plants*. CRC Press. Boca Raton FL. 390 p. <https://doi.org/10.1201/b16535>.

Lee JA, Halbert SE, Dawson WO, Robertson CJ, Keesling JE and Singer BH. 2015. Asymptomatic spread of huanglongbing and implications for disease control. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 112(24):7605-7610. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508253112>.

Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. “Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing”. *Jo-*

- urnal of Microbiological Methods 66: 104-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>.
- Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ, Bermúdez-Guzmán MJ, García-Mariscal KP, Orozco-Santos M y Robles-González MM. 2018. Manejo integral del cultivo de limón mexicano en un escenario de alta incidencia de HLB. Campo Experimental Tecomán, INIFAP. Folleto para productores No. 20. Tecomán, Colima, México. 26 p.
- McCollum G, Hilf M, Irey M, Luo W and Gottwald T. 2016. Susceptibility of Sixteen Citrus Genotypes to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. Plant disease 100(6):1080-1086. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0940-RE>
- Mondal B, Pramanick S, Saha R and Karmakar M. 2015. Application of simple sequence repeats markers for demarcation of *Citrus reticulata* nucellar and hybrid seedlings. International Journal of Biosciences 6(2):128-133. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/6.2.128-133>.
- Moore GA, Jacomo J, Neidigh L, Laurence SD and Cline K. 1993. Transformation in Citrus. pp.194-208. In: Bajaj YPS (Eds). Plant protoplast and genetic engineering IV. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer. Berlin Heidelberg. N. Y. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78037-0_15.
- Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, Robles-González M, Orozco-Romero J, Pérez-Zamora O, Velázquez-Monreal JJ, Timmer LW y Guzmán-González S. 2006. Biología y manejo integrado de antracnosis del limón mexicano en el trópico seco de México. Campo Experimental Tecomán, INIFAP. Folleto Técnico Núm. 2. Tecomán. Colima. México. 73 p.
- Pappu HR, Pappu SS, Kano T, Koizumi M, Cambra M, Moreno P, Su HJ, Garnsey SM, Lee RF and Niblett CL. 1995. Mutagenic analysis and localization of a highly conserved epitope near the amino-terminal end of the *Citrus tristeza closterovirus* capsid protein. Phytopathology 85(10): 1311-1315. <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-1311>.
- Rawat N, Kumar B, Albrecht U, Du D, Huang M, Yu Q, Zhang Y, Duan YP, Bowman KD, Gmitter FG Jr and Deng Z. 2017. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in Huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. Horticulture research 15(4):17064. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.64>.
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MÁ, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia VM, López-Arroyo JI y 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. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MÁ, Velázquez-Monreal JJ, Carrillo-Medrano SH y García-Preciado JC. 2017. Limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). pp. 89-109. En: Bonilla Cárdenas JA. et al. (compiladores). Agenda técnica agrícola Colima. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Publicación especial. 319 p. https://vun.inifap.gob.mx/BibliotecaWeb/_Content.
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MA, Velázquez-Monreal JJ, Medina-Urrutia VM y Sanches-Stuchi E. 2018. Experiencias con Huanglongbing en limón mexicano en el estado de Colima, México. Citrus Research & Technolog 39: 2–12. <https://doi.org/10.4322/crt.16518>.
- Simsek O, Donmez D, Eti S, Yesiloglu T and Kacar Y. 2018. Comparative transcriptome sequencing to determine genes related to the nucellar embryony mechanism in citrus. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 43(1): 58-68. <https://doi.org/10.3906/tar-1806-10>.
- Stover E, Shatters R Jr, McCollum G, Hall DG and Duan Y. 2010. Evaluation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* Titer in Field-infected Trifoliolate Cultivars: Preliminary Evidence for HLB Resistance. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 123:115–117.
- Stover, E and McCollum G. 2011. Incidence and severity of huanglongbing and *Candidatus Liberibacter asiaticus* titer among field-infected citrus cultivars. HortScience 46:1344–1348. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.10.1344>.
- Stover E, McCollum G, Chaparro J and Ritenour M. 2012. Under Severe HLB and Citrus Canker Pressure, ‘Triumph’ and ‘Jackson’ Perform Better Than ‘Flame’ and ‘Marsh’ Grapefruit. 125. Proceedings of the Florida State Horticultural Society. <https://journals.flvc.org/fshs/article/view/83927/80826>
- Stover E, McCollum GT, Driggers R, Lee R, Shatters R Jr, Duan YP, Ritenour M, Chaparro JX and Hall DG. 2015a. Resistance and Tolerance to Huanglongbing in Citrus. ISHS Acta Horticulturae 1065: XII International Citrus Congress - International Society of Citriculture. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.111>.
- Stover EW, Mccollum TG, Ramos JE and Shatters RG. 2015b. Growth, health and *Liberibacter asiaticus* titer in diverse citrus scions on mandarin vs. trifoliolate hybrid rootstocks in a field planting with severe huanglongbing. Proceedings of Florida State Horticultural Society 127:53-59.
- Wang Y, Zhou L, Yu X, Stover E, Luo F and Duan Y. 2016. Transcriptome Profiling of Huanglongbing (HLB) Tolerant and Susceptible Citrus Plants Reveals the Role of Basal Resistance in HLB Tolerance. Frontiers in plant Science 7:933. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00933>.
- Wang X, Xu Y, Zhang S, Cao L, Huang Y, Cheng J, Wu G, Tian S, Chen C, Liu Y, Yu H, Yang X, Lan H, Wang N, Wang L, Xu J, Jiang X, Xie Z, Tan M, Larkin RM, Chen LL, Ma BG, Ruan Y, Deng X and Xu Q. 2017. Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction. Nature Genetics 49(5): 765-774. <https://doi.org/10.1038/ng.3839>
- Westbrook CJ, Hall DG, Stover EW, Duan YP and Lee RF. 2011. Colonization of Citrus and Citrus-related germplasm by *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae). HortScience 46:1-9. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.7.997>.

Wu B, Li N, Deng Z, Luo F and Duan Y. 2021. Selection and Evaluation of a Thornless and HLB-Tolerant Bud-Sport of Pummelo Citrus With an Emphasis on Molecular Mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 31(12):739108. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.739108>

Xu Y, Jia H, Wu X, Koltunow AM, Deng X and Xu Q. 2021. Regulation of nucellar embryony, a mode of sporophytic apomixis in Citrus resembling somatic embryogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 59:101984. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.101984>