






DetECCIÓN e identificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Citrus limon* L.

Detection and identification of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Citrus limon* L.

Yazmín G. Zapata-Contreras¹, Eduardo Osorio-Hernández^{1*}, Raúl Rodríguez-Herrera², Genoveva Álvarez-Ojeda³
& Lizeth G. Campos-Muzquiz²

¹Facultad de Ingeniería y Ciencias-Universidad Autónoma de Tamaulipas. Centro Universitario Adolfo López Mateos, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.C.P.87000. a2163010048@alumnos.uat.edu.mx (Y.G.Z.-C).

²Departamento de Investigación en Alimentos-Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Autónoma de Coahuila. Boulevard Venustiano Carranza esquina con Ing. José Cárdenas Valdés, Col. República, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25280. raul.rodriguez@uadec.edu.mx (R.R.-H); l_campos@uadec.edu.mx (L.G.C.-M).

³INIFAP-Campo Experimental Río Bravo. Km 61, Carretera Matamoros-Reynosa. CP. 88900, Río Bravo, Tamaulipas, México. Tel: 01 55 38 71 8700. Ext. 83210. alva-rez.genoveva@inifap.gob.mx (G.A.-O). *Autor para correspondencia: eosorio@docentes.uat.edu.mx

RESUMEN: México, se tiene una producción superior a los 8 millones 217 mil t de cítricos distribuidos en 600 mil ha los principales cítricos que se producen son: naranja, limón mexicano, lima persa y mandarina. los cítricos se ven amenazados por la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* causante de la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) dragón amarillo o enfermedad de los brotes amarillos. Por tal motivo, el objetivo fue determinar número de células bacterianas de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Citrus limon*. Se utilizaron 53 plantas de *Citrus limon* injertadas en los patrones *Citrus aurantium* L., *Citrus volkameriana* y *Citrus macrophylla*. Se realizó la inoculación de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el tallo, después de seis meses se realizó la extracción de ADN extraído de nervaduras centrales y peciolo de hojas. Entre 18 muestras de ADN extraídas de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus volkameriana*, 14 resultaron negativas para el patógeno *Candidatus Liberibacter asiaticus* y 4 positivas para el mismo,

además 20 muestras de ADN de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus aurantium*, 6 muestras resultaron positivas y 14 resultaron negativas para el patógeno, así mismo 16 muestras de ADN extraídas de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus macrophylla*, 11 resultaron negativas para el patógeno *Candidatus Liberibacter asiaticus* y 5 positivas para el mismo.

PALABRAS CLAVE: Palabras clave: ADN, PCR, HLB

ABSTRACT: In Mexico, more than 8 million 217 thousand t of citrus fruit are produced, distributed across 600,000 ha. The main citrus fruits produced are oranges, Mexican lemons, Persian limes, and mandarins. Citrus fruits are threatened by the presence of the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, which causes the disease known as Huanglongbing (HLB), or yellow dragon, or yellow shoot disease. Therefore, the objective was to determine the number of bacterial cells of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Citrus limon*. Fifty-four

Citrus limon plants grafted onto *Citrus aurantium* L., *Citrus volkameriana*, and rootstocks were used. Stems were inoculated with the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, and after six months, DNA was ex-tracted from the midribs and leaf petioles. Among 18 DNA samples extracted from *Citrus limon* on *Citrus volkameriana* rootstock, 14 were negative for the pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* and 4 were positive for it, in addition 20 DNA samples from *Citrus limon* on *Citrus aurantium* rootstock, 6 samples were positive and 14 were negative, likewise 16 DNA samples extracted from *Citrus limon* on *Citrus macrophylla* rootstock, 11 were negative for *Candidatus Liberibacter asiaticus* and 5 were positive for it.

KEYWORDS: *Citrus*, PCR, HLB.

INTRODUCCIÓN

Los principales países productores de cítrico son: China, Estados Unidos, México y Brasil (Rao *et al.*, 2021). Con una producción aproximada de 124 millones de t anuales (Bedoya *et al.*, 2021). Cabe mencionar que, en México, se tiene una producción superior a los 8 millones 217 mil t de cítricos distribuidos en 600 mil ha (Yzquierdo-Álvarez *et al.*, 2021). Donde los principales estados productores son Veracruz, Tamaulipas, Tabasco, Yucatán, Colima y Michoacán y de menor cantidad de producción Nuevo León y Puebla (Rosales *et al.*, 2020). Además, los principales cítricos que se producen son: naranja, limón mexicano, limón persa y mandarina (González *et al.*, 2020).

Cabe destacar que, los cítricos se ven amenazados por la presencia de una enfermedad conocida como HLB, huanglongbing, o dragón amarillo, la cual es causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Manzanilla-Ramírez *et al.*, 2019). La bacteria habita en el floema de la planta y causa la interrupción en el transporte de fotosintatos (Sétamou *et al.*, 2019). Se puede transmitir principalmente por el insecto vector psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* Kuwayama) y por material vegetal infectado (Moreira *et al.*, 2020). La enfermedad se caracteriza por un moteado asimétrico de coloración verde en las

hojas y puede confundirse con deficiencias de minerales como el zinc (Folimonova y Achor 2010; Bové, 2014). Una de las características principales es la muerte de ramas de manera gradual (Wang y Trivedi, 2013). Por otro lado, los frutos de los árboles enfermos son pequeños y deformes, con poca coloración, de sabor amargo y con semillas pequeñas e inviábiles (Bassanezi *et al.*, 2009). Debido a la rápida diseminación ha causado grandes pérdidas económicas (Curtolo *et al.*, 2020) de aproximadamente un 75 % en la reducción de la producción (Hu *et al.*, 2021). Una de las limitantes para el control del crecimiento de la bacteria ha sido la dificultad de cultivarla en laboratorio lo que limita que se realicen los postulados de Koch (Hong *et al.*, 2019). Por otro lado, para el diagnóstico y la confirmación de la presencia de la bacteria en árboles de cítricos se utiliza PCR en tiempo real (Kogenaru *et al.*, 2014). El proceso de detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* se basa en la amplificación selectiva de una región específica de la bacteria mediante PCR, los iniciadores diseñados para este propósito se adhieren a secuencia única del ADNr 16s de *Candidatus liberibacter asiaticus*, permitiendo la amplificación de un fragmento del ADN de 1160 pb. Esta estrategia permite detectar la bacteria antes de que aparezcan síntomas visibles (Park *et al.*, 2018). Por tal motivo, el objetivo fue determinar número de células bacterianas de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Citrus limón*.

METODOLOGÍA

Ubicación del sitio experimental

El experimento se realizó en el invernadero de la posta zootécnica "Ingeniero Herminio García González" de la Universidad Autónoma de Tamaulipas (23° 56' 26 .5" y 99° 05' 59.9", y 193 msnm) en Güémez, Tamaulipas, México.

Material Vegetal

Se utilizaron 54 plantas de *Citrus limon* injertadas en los patrones *Citrus aurantium* L., *Citrus volkameriana* y *Citrus macrophylla* (Cuadro 1).

Establecimiento de las plantas en el invernadero

Se utilizaron macetas de 50×23 cm para las plantas, con una separación de 1 m cada una. Las plantas de *Citrus limon*, fueron injertados con yemas positivas a *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Cuadro 1. Relación del portainjerto-variedad de *Citrus limon*.

Numero de combinaciones	Portainjerto	Variedad
1	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Citrus limon</i>
2	<i>Citrus volkameriana</i>	<i>Citrus limon</i>
3	<i>Citrus macrophylla</i>	<i>Citrus limon</i>

Extracción de ADN

Se recolectaron 20 hojas con y sin síntomas del HLB de cada planta, sin daños aparentes de plagas u otras enfermedades. Las muestras fueron almacenadas y etiquetadas en bolsas plásticas con cierre hermético. Posteriormente, para su análisis en laboratorio las muestras se colocaron en una hielera con geles refrigerantes. Para el procedimiento de extracción de ADN se utilizó la metodología de Li *et al.* (2006). El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso. Para verificar su pureza, se cuantifico el ADN por espectrofotometría (Epoch).

Reacción en Cadena de la Polimerasa tiempo real (q-PCR)

La obtención de productos de amplificación a partir del ADN se llevó a cabo utilizando el método descrito por Li *et al.* (2006), las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 25 µL, usando un máster mix (MM) (kit High-Stability PCR de GenScript®) los reactivos y las cantidades específicas, se describen en el cuadro 2.

Después de mezclar bien todos los reactivos con vortex, se pasaron 20 µL de MM en cada tubo, y 5 µL de ADN se agitaron en vortex y se pasó la muestra a tubos SmartCycler de 25 µL se centrifugaron por 6 s para asegurar que todo el volumen de reacción estuviera en el fondo de los tubos y se colocaron en el termociclador (SmartCycler) programado de acuerdo con los parámetros que se mencionan más adelante. La cuantificación bacteriana se realizó mediante la metodología de Vasconcelos *et al.* (2021).

Cuadro 2. Cantidades de reacción para PCR en ADN.

Reactivo	µL
Primer HLB 30 µM F	2.00
Primer HLB 30 µM R	2.00
Primer COX 10 µM F	1.00
Primer COX 10 µM R	2.00
Buffer 10x	2.50
DNTP	0.50
Taq polimerasa	0.25
ADN	5.00
Sonda HLB 30 µM	2.00
Sonda COX 10 µM	3.00
Agua	4.75

Las condiciones del termociclador de la (q-PCR) fueron las siguientes: 1 ciclo de pre-desnaturalización a una temperatura de 94 °C durante 5 min. 40 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización del ADN a 94 °C durante 30 s hibridación del oligonucleótido al ADN de 58 °C durante 30 s, extensión de la cadena complementaria de ADN, sintetizada por la DNA polimerasa a una temperatura de 72 °C durante 30 s.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento agronómico se estableció bajo un diseño completamente al azar, con 20, 18 y 16 repeticiones, los tratamientos se acomodaron en un arreglo factorial 3×2×3, donde los factores fueron: especie, estatus fitosanitario y portainjerto. El factor especie con 3 niveles, el estatus fitosanitario con 2 niveles y el factor portainjerto con 3 niveles para *Citrus limon* (*Citrus aurantium*, *Citrus macrophylla* y *Citrus volkameriana*). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y cuando fue necesario, las medias de tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entre 18 muestras de ADN extraído de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus volkameriana* de Güémez, Tamaulipas, 14 resultaron negativas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* y cuatro fueron positivas para el mismo (Cuadro 3).

Los valores de Ct de las muestras de ADN positivas estuvieron entre 19 y 27. La calidad y la consistencia de los extractos de ADN preparados a partir de estas muestras se demostró mediante los valores de TET Ct obtenidos para el control interno (COX). También se realizaron ensayos de PCR multiplex en tiempo real con diluciones de 5 y 50 veces de las muestras de ADN.

Cuadro 3. Cuantificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus volkameriana*.

Planta	TET ct	ADN de planta ng	FAM ct	Número de células bacterianas (log ₁₀)
1	16.08	15.61	19.86	5.89
2	17.07	16.60	Neg	0.00
3	14.82	14.35	Neg	0.00
4	16.95	16.48	Neg	0.00
5	15.65	15.18	Neg	0.00
6	16.41	15.94	Neg	0.00
7	15.67	15.20	Neg	0.00
8	15.98	15.51	Neg	0.00
9	16.68	16.21	Neg	0.00
10	20.16	19.69	Neg	0.00
11	14.54	14.07	Neg	0.00
12	16.64	16.17	27.23	3.76
13	16.55	16.08	Neg	0.00
14	15.57	15.10	Neg	0.00
15	16.50	16.03	Neg	0.00
16	17.25	16.78	Neg	0.00
17	15.81	15.34	24.55	4.54

No se produjeron resultados positivos adicionales, lo que indica que los inhibidores de plantas de cítricos no afectaron los resultados de la PCR en tiempo real. Por otra parte, Vasconcelos *et al.* (2020) estimaron que la población de *Candidatus Liberibacter asiaticus* era de aproximadamente 1.6×10^6 células/hoja en el mes de septiembre, así mismo, que los títulos de CLas en hojas sintomáticas y en hojas con aparentes deficiencias nutricionales presentaron una significancia más alta que en árboles con hojas asintomáticas. En el mismo sentido, Hu *et al.* (2014) mencionaron que la población de CLas fue significativamente menor en los meses de diciembre, enero y febrero. Sin embargo, Sauer *et al.* (2015) reportaron que, con el aumento de la población bacteriana en el huésped, se presenta un aumento en

la severidad de los síntomas de HLB en las hojas. Por otro lado, Manjunath *et al.* (2010) reportaron que con muestras del insecto vector *Diaphorina citri* obtuvieron nueve de las sesenta y siete extracciones de ADN positivas para la bacteria con valores umbral de FAM ct de 24 a 29.

Entre 20 muestras de ADN extraídas de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus aurantium* de Güémez, Tamaulipas, seis muestras resultaron positivas y 14 resultaron negativas para *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Los valores de FAM Ct de las muestras de ADN positivas estuvieron entre 21 y 26. La calidad y la consistencia de los extractos de ADN preparados a partir de estas muestras se demostró mediante los valores de TET Ct obtenidos para el control interno (COX) donde los valores de TET ct estuvieron entre 13 y 19. También se realizaron ensayos de PCR multiplex en tiempo real con diluciones de 5 y 50 veces de las muestras de ADN. No se produjeron resultados positivos adicionales, lo que indica que los inhibidores de plantas de cítricos no afectaron los resultados de la PCR en tiempo real (Cuadro 4).

Además, Razi *et al.* (2014) en sus estudios encontraron que en temperaturas donde se alcanzaban casi los 50 °C *Candidatus Libeibacter asiaticus* está presente en un mayor número árboles en comparación de lo reportado en Florida. Por otro lado, López-Buenfil *et al.* (2017) observaron títulos bacterianos más bajos a altas temperaturas en los árboles infectados, además, se menciona que influyen las estaciones del año en las concentraciones de la bacteria. Por otra parte, Tatineni *et al.* (2008) mencionaron que se ha intentado describir la distribución sistémica de CLas dentro de los árboles de cítricos, sin embargo, no han tenido resultados favorables.

Entre 16 muestras de ADN extraídas de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus macrophylla* de Güémez, Tamaulipas, 11 resultaron negativas para *Candidatus Liberibacter asiaticus* y cinco fueron positivas para el mismo. Los valores de FAM Ct de las muestras de ADN positivas estuvieron entre 21 y 25. La calidad y la consistencia de los extractos de ADN preparados a

partir de estas muestras se demostró mediante los valores de TET Ct obtenidos para el control interno (COX) donde los valores de TET ct estuvieron entre 16 y 23.

Cuadro 4. Cuantificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus aurantium*.

Planta	TET	ADN de planta (ng)	FAM	Número de células bacterianas (log ₁₀)
1	15.87	15.40	Neg	0.00
2	17.59	17.12	Neg	0.00
3	16.69	16.22	Neg	0.00
4	16.63	16.16	Neg	0.00
5	14.44	13.97	Neg	0.00
6	16.11	15.64	Neg	0.00
7	19.15	18.68	Neg	0.00
8	15.56	15.09	Neg	0.00
9	15.26	14.79	24.97	4.42
10	15.56	15.09	26.76	3.90
11	15.49	15.02	Neg	0.00
12	13.43	12.96	Neg	0.00
13	17.16	16.69	Neg	0.00
14	16.16	15.69	Neg	0.00
15	15.97	15.50	25.92	4.14
16	16.52	16.05	26.52	3.97
17	16.48	16.01	21.64	5.37
18	15.80	15.33	Neg	0.00
19	17.42	16.95	24.82	4.46
20	15.98	15.51	Neg	0.00

También se realizaron ensayos de PCR multiplex en tiempo real con diluciones de 5 y 50 veces de las muestras de ADN. No se produjeron resultados positivos adicionales, lo que indica que los inhibidores de plantas de cítricos no afectaron los resultados de la PCR en tiempo real (Cuadro 5).

Nageswara-Rao *et al.* (2013) señalan que las plantas de cítricos positivas a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* pueden no mostrar síntomas visibles por muchos años así mismo que la detección del patógeno no se pueda detectar. Pandey. (2021) informan que las hojas alimentadas por *Diaphorina citri* durante la etapa joven mostraron títulos bacterianos más altos de CLas.

Cuadro 5. Cuantificación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en plantas de *Citrus limon* sobre portainjerto *Citrus macrophylla*.

Planta	TET	ADN de planta (ng)	FAM	Número de células bacterianas (log ₁₀)
1	16.20	15.73	25.56	4.24
2	19.36	18.89	Neg	0.00
3	19.72	19.25	24.32	4.60
4	16.53	16.06	Neg	0.00
5	16.53	16.06	Neg	0.00
6	20.41	19.94	Neg	0.00
7	17.46	16.99	Neg	0.00
8	16.37	15.90	Neg	0.00
9	16.17	15.70	24.38	4.59
10	23.74	23.27	21.20	5.50
11	16.44	15.97	Neg	0.00
12	16.99	16.52	Neg	0.00
13	16.59	16.12	Neg	0.00
14	16.47	16.00	Neg	0.00
15	17.19	16.72	23.74	4.77
16	17.90	17.43	Neg	0.00

Entre las muestras de ADN extraídas de *Citrus limon* injertado sobre tres portainjertos en Güémez, Tamaulipas, no se observaron diferencias significativas en el número de células bacterianas (log₁₀), lo que sugiere que la acumulación de *Candidatus Liberibacter asiaticus* fue relativamente homogénea entre tratamientos. Cabe mencionar que en la cantidad de ADN vegetal sí se detectaron diferencias significativas y en los valores de TET ct, siendo *Citrus volkameriana* el portainjerto que mostró los valores más bajos en ambos parámetros. Esto podría indicar una mayor eficiencia en la amplificación del ADN o una diferencia en la calidad de tejido vegetal, lo que a su vez puede estar relacionado con una respuesta fisiológica distinta frente a la infección. Aunque la densidad bacteriana fue estadísticamente similar, estas variaciones sugieren que algunos portainjertos podrían modular la interacción planta-patógeno a través de mecanismos distintos a la simple acumulación bacteriana. Por lo tanto, estos resultados resaltan la importancia de considerar no solo la carga bacteriana, sino también la fisiología del hospedero (Cuadro 6).

Portainjerto	TET ct	ADN de planta (ng)	FAM ct	Número de células bacterianas (log ₁₀)
<i>Citrus macrophylla</i>	17.75 a	17.29 a	23.84 a	4.74 a
<i>Citrus volkamerian</i>	16.52 ab	16.06 ab	24.28 a	4.61 a
<i>a</i>				
<i>Citrus aurantium</i>	16.16 b	15.69 b	25.10 a	4.37 a

*Letra igual, no hay diferencia significativa.

Por otra parte, Vasconcelos *et al.* (2020) informaron que los títulos de CLas varían de diez a 100 veces entre la temporada alta y las temporadas con poblaciones bajas de CLas, cabe mencionar que la bacteria se transporta por el floema durante todas las etapas fisiológicas. Además, Ibanez y Stelinski (2020) mencionaron que la enfermedad causante del HLB da como resultado copas cada vez menos densas con hojas más pequeñas. Asimismo, Achor *et al.* (2020) tuvieron como resultados que, en algunos casos, se observan células bacterianas masa altas en semillas abortadas.

CONCLUSIONES

El número de células bacterianas asociadas a *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Citrus limon* mostró variación según el portainjerto utilizado. El portainjerto *Citrus volkameriana* presentó los valores más altos, con un rango de entre 4.2 y 5.5 log₁₀, lo cual sugiere una mayor acumulación bacteriana en comparación con *Citrus aurantium*, cuyos valores oscilaron entre 3.9 y 5.3 log₁₀. Por su parte, *Citrus macrophylla* presentó un comportamiento intermedio, con valores entre 4.3 y 5.5. El portainjerto puede influir en la densidad bacteriana, debido a diferencias en la respuesta fisiológica o en la susceptibilidad al patógeno. La elección del portainjerto podría ser una herramienta estratégica en el manejo del HLB, orientada a reducir la carga bacteriana en plantas infectadas.

DECLARAR SIN CONFLICTOS DE INTERES

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

ORCID DE LOS AUTORES

<https://orcid.org/0000-0002-9605-0082>
<https://orcid.org/0000-0002-9248-8167>
<https://orcid.org/0000-0002-6428-4925>
<https://orcid.org/0000-0002-2203-5402>
<https://orcid.org/0000-0002-7507-0885>

REFERENCIAS

- Achor, D., Welker, S., Ben-Mahmoud, S., Wang, C., Folimonova, S.Y., Dutt, M., Gowda, S., & Levy, A. (2020). Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement and sieve-pore plugging in citrus sink cells. *Plant Physiology*, 182(2), 882-891. doi: 10.1104/pp.19.01391
- Bedoya, S., Amar, G., Barrera, R., Arriola, E., & Ardila, A.N., (2021). Escenario técnico y económico para la valorización integral a pequeña escala de residuos de naranja en Colombia. *Ingeniería*, 26(3), 367-380. doi: 10.14483/23448393.17783
- Fernández, M.S., Hernández-Ochoa, F., Carmona-Hernández, O., Luna-Rodríguez, M., Barrientos-Salcedo, C., Asselin, H., & Lozada-García, J.A. (2021). Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the in vitro fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(1), 198-206. doi: 10.18781/r.mex.fit.2006-6
- González, A., Guillén, D., Alia, I., López, V., Juárez, P., & Bárcenas, D. (2020). Comportamiento de variedades de naranja injertadas en diferentes portainjertos en Xalostoc, Morelos. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 11(5), 1123-1134. doi: 10.29312/remexca.v11i5.2316
- Hong, Y., Luo, Y., Yi, J., He, L., Dai, L., & Yi, T. (2019). Screening nested-PCR primer for “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” associated with citrus huanglongbing and application in Hunan, China. *PLOS ONE*, 14(2). doi: 10.1371/journal.pone.0212020
- Hu, B., Rao, M.J., Deng, X., Pandey, S.S., Hendrich, C., & Ding, F. (2021). Molécula signatures between citrus and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *PLOS Pathogens*, 17. doi: 10.1371/journal.ppat.1010071
- Hu, H., Roy, A., & Bransky, R.H. (2014). Live Population Dynamics of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, the Bacterial Agent Associated with Citrus Huanglongbing, in Citrus and Non-Citrus Hosts. *Plant Disease*, 98(7), 876-884. doi: 10.1094/pdis-08-13-0886-re.

- Ibanez, F., & Stelinski, L.L. (2020). Temporal dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* titer in mature leaves from *Citrus sinensis* cv Valencia are associated with vegetative growth. *Journal of Economic Entomology*, 113(2), 589-595. doi: 10.1093/jee/toz307.
- Kogenaru, S., Yan, Q., Riera, N., Roper, M., Deng, X., Ebert, T. A., & Wang, N. (2014). Repertoire of novel sequence signatures for the detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by quantitative real-time PCR. *BMC Microbiology*, 14(1), 39. doi: 10.1186/1471-2180-14-39.
- Lagunes-Fortiz, E., & Zavaleta-Mejía, E. (2016). Función de la lignina en la interacción planta-nematodos endoparásitos sedentarios. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 43-63. doi: 10.18781/r.mex.fit.1506-7.
- Li, W., Hartung, J.S., & Levy, L. 2006. Real-time quantitative PCR for detection and identification *Candidatus Liberibacter* associated species with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66,104-115. doi: 10.1016/j.mimet.2005.10.018.
- Lopez-Buenfil, J.A., Ramirez-Pool, J.A., Ruiz-Medrano, R., Montes-Horcasitas, M.C., Chavarin-Palacio, C., Moya, J., Trujillo-Arriaga, F.J., Carmona, R.L., & Xoconostle, B. (2017). Dynamics of huanglongbing-associated bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Citrus aurantifolia* Swingle (Mexican Lime). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 20(3), 113-123. doi: 10.3923/pjbs.2017.113.123.
- Manjunath, K.L., Ramadugu, C., Majil, V.M., Williams, S., Irey, M., & Lee, R.F. (2010). First report of the citrus huanglongbing associated bacterium '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from sweet orange, mexican lime, and asian citrus psyllid in Belize. *Plant Disease*, 94(6), 781. doi: 10.1094/pdis-94-6-0781a.
- Manzanilla-Ramírez, M.A., Villegas-Monter, A., Velázquez-Monreal, J.J., Zavaleta-Mancera, H.A., Sandoval-Villa, M., & 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. doi: 10.29312/remexca.v10i7.1957.
- Nageswara-Rao, M., Miyata, S., Ghosh, D., Irey, M., Garnsey, S.M., & Gowda, S. (2013). Development of rapid, sensitive and non-radioactive tissue-blot diagnostic method for the detection of citrus greening. *Molecular and Cellular Probes*, 27(5), 176-83. doi: 10.1016/j.mcp.2013.04.003.
- Pandey, S.S., Nogales, C., Vasconcelos, F., & Wang, N. (2021). Spatiotemporal dynamics of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' colonization inside citrus plant and huanglongbing disease development. *Phytopathology*, 111(6), 921-928. doi: 10.1094/phyto-09-20-0407-r.
- Park, J.W., Louzada, E.S., Braswell, W.E., Stansly, P.A., da Graça, J. V., McCollum, G., Rascoe, J.E., & Kunta M. (2018). A new diagnostic real-time PCR method for huanglongbing detection in citrus root tissue. *Journal of General Plant Pathology*, 84, 359-367. doi: 10.1007/s10327-018-0793-4.
- Rao, M.J., Zuo, H., & Xu, Q. (2021). Genomic insights into citrus domestication and its important agronomic traits. *Plant Communications*, 2. doi: 10.1016/j.xplc.2020.100138.
- Razi, M.F., Keremane, M.L., Ramadugu, C., Roose, M., Khan, I.A., & Lee, R.F., Detection of citrus huanglongbing-associated '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus and *Diaphorina citri* in Pakistan, seasonal variability, and implications for disease management. *Phytopathology*, 104(3),257-68. doi: 10.1094/phyto-08-13-0224-r.
- Rosales, V., Francisco, A., Casanova, L., Fraire, S., Flota, C., & Galicia, F. (2020). Percepción de citricultores ante el efecto del cambio climático en Campeche. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 11(4), 727-740. doi: 10.29312/remexca.v11i4.1898.
- Sauer, A.V., Zanutto, C.A., Nocchi, P.T., Machado, M.A., Bock, C.H. & Nunes, W.M. (2015). Variación estacional de las poblaciones de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' en árboles de cítricos en el estado de Paraná, Brasil. *Plant Disease*, 99, 1125-1132. doi: 10.1094/PDIS-06-16-0859-re.
- Sétamou, M., Alabi, O.J., Kunta, M., Dale, J., & Graca, J. (2019). Distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus and the Asian citrus psyllid in Texas over a decade. *Plant Disease*, 104, 1118-1126. doi: 10.1094/PDIS-08-19-1779-RE.
- Tatineni, S., Sagaram, U.S., Gowda, S., Robertson, C.J., Dawson, W.O., Iwanami, T., & Wang, N. (2008). In planta distribution of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology*, 98,592-599. doi: 10.1094/phyto-98-5-0592.
- Yzquierdo-Alvarez, M.E., Rincón-Ramírez, J.A., Loeza-Kuk, E., López-Olguín, J.F., Aceves-Navarro, L.A., & Ortiz-García, C.F. (2021). Fluctuación espacio-temporal de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) en limón Persa (*Citrus latifolia*) en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco. *Acta Zoológica Mexicana*, 37. doi: 10.21829/azm.2021.3712374.