

**Densidad de microorganismos en rizósfera de limón mexicano
con HuangLongBing e inoculado con hongos micorrízicos arbusculares
y bacterias benéficas en invernadero**
**Microorganism density in the rhizosphere of Mexican lime
with HuangLongBing and inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi
and beneficial bacteria in greenhouse**

**Christian Salvador Mendoza-Hernández^{1,2} , Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar² ,
Guadalupe Esperanza López-Ramírez^{1,2} , Luis López-Pérez³  y Gabriel Rincón-Enríquez^{2,‡} **

¹ Ingeniería en Agrotecnología, Universidad Politécnica del Bicentenario. Carretera libre Silao-Romita km 2, Col. San Juan de los Durán. 36283 Silao de la Victoria, Guanajuato, México.

² Laboratorio de Fitopatología, Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco A.C. Camino Arenero 1227, Col. El Bajío del Arenal. 45019 Zapopan, Jalisco, México.

[‡] Autor para correspondencia (grincon@ciatej.mx)

³ Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro km 9.5. 58880 Tarímbaro, Michoacán, México.

RESUMEN

México está entre los primeros productores de limón mexicano (Lm), con 2.5 millones de hectáreas por año. Actualmente esta actividad agrícola se ve amenazada por el HuangLonBing (HLB), causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). El desarrollo de estrategias biotecnológicas dirigidas al combate de esta enfermedad es indispensable para incorporarlas al manejo actual. El objetivo del presente trabajo consistió en aislar y determinar la abundancia de bacterias (B) y hongos filamentosos (HF) totales de rizosfera de plantas de Lm infectadas con CLAs y tratadas con *Bacillus subtilis* (BS) o *Funneliformis mosseae* (FM). Se empleó un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos con cinco repeticiones con árboles de un año y medio e infectados con CLAs vía injerto de yema siendo estos: 1) aplicación mensual de BS (5×10^5 UFC g⁻¹ de sustrato: BsCLAs); 2) aplicación única de FM (5 esporas g⁻¹ inóculo: FmCLAs); 3) fertilización química sin CLAs (Q); 4) fertilización química con CLAs (QCLAs); 5) fertilización orgánica sin CLAs (O) y 6) fertilización orgánica con CLAs (OCLAs). Se realizaron cinco muestreos rizosféricos, cada 70 días

después de la primera aplicación (ddpa) de la nutrición química y orgánica o después de la inoculación de los microorganismos. Las poblaciones de B y HF se determinaron mediante la técnica de diluciones decimales, siembra en placa (NA y PDA) y conteo de UFC. Se encontraron diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$) en la dinámica de B y HF en tratamientos con CLAs con respecto a sin infectar. A los 368 ddpa en B totales se encontraron 7.4×10^5 UFC g⁻¹ de sustrato en QCLAs en contraste con las 2.67×10^6 UFC g⁻¹ de sustrato para Q. La dinámica de B fue mayormente afectada en comparación con HF. La inoculación de microorganismos benéficos o aplicación de nutrición orgánica fueron incapaces de mantener las poblaciones de B totales.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, cítricos, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Funneliformis mosseae*.

SUMMARY

Mexico is among the first producers of Mexican lime (ML), with 2.5 million hectares per year. Currently, this agricultural activity is threatened by HuangLonBing

Cita recomendada:

Mendoza-Hernández, C. S., E. E. Quiñones-Aguilar, G. E. López-Ramírez, L. López-Pérez y G. Rincón-Enríquez. 2019. Densidad de microorganismos en rizósfera de limón mexicano con HuangLongBing e inoculado con hongos micorrízicos arbusculares y bacterias benéficas en invernadero. *Terra Latinoamericana* 37: 379-389.

DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v37i4.525>

Recibido: 14 de marzo de 2019.

Aceptado: 31 de mayo de 2019.

Publicado en *Terra Latinoamericana* 37: 379-389.

(HLB), caused by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). The development of biotechnological strategies aimed at combating this disease is imperative in order to incorporate them into the current management. The objective of our study was to isolate and determine the abundance of total bacteria (B) and filamentous fungi (FF) in the rhizosphere of MI plants infected with CLAs, treated with *Bacillus subtilis* (BS) and *Funneliformis mosseae* (FM). A completely randomized experimental design was used in six treatments and five replicates with one and a half year old trees infected with CLAs via bud grafting as follows: 1) monthly application of BS (5×10^5 CFU g⁻¹ of substrate: BsCLAs), 2) single application of FM (5 spores g⁻¹ inoculum: FmCLAs); 3) chemical fertilization without CLAs (Q), 4) chemical fertilization with CLAs (QCLAs); 5) organic fertilization without CLAs (O) and 6) organic fertilization with CLAs (OCLAs). Five rhizospheric samplings were carried out each 70 days after the first application (dafa) of the chemical and organic nutrition of after the inoculation of microorganisms. The populations of bacteria (B) and fungi (FF) were determined using the decimal dilution method, plating (AN and PDA) and CFU count. Statistical differences (Tukey's, $P \leq 0.05$) were found in the population dynamics of B and total FF in treatments infected with CLAs, with regard to non-infected treatments. At 368 dafa, total substrate B were 7.4×10^5 CFU g⁻¹ in treatment QCLAs, in contrast, total substrate B were 2.67×10^6 CFU g⁻¹ in treatment Q. The population dynamics of B was the most affected compared to that of FF. The inoculation of beneficial microorganisms or application of organic nutrition were unable to maintain total B populations.

Index words: *Bacillus subtilis*, *citrus*, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Funneliformis mosseae*.

INTRODUCCIÓN

México es el cuarto país productor de cítricos en el mundo (Miranda-Salcedo *et al.*, 2012¹) y segundo lugar de limón. El cultivo de limón mexicano (Lm) se desarrolla principalmente en las costas del pacífico mexicano (González-Sánchez y Echevarria, 2003), con una producción que superó las 2.5 millones de

toneladas para 2017 (SIAP, 2019). En la actualidad esta actividad agrícola se ve amenazada por la enfermedad denominada HLB (Sánchez-Borja *et al.*, 2010), cuyo agente causal es *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) (Kim *et al.*, 2008). CLAs es una bacteria fastidiosa, Gram negativa y cuyo hábitat es el floema presentando una distribución irregular en el árbol (Robles *et al.*, 2010). Su sintomatología se caracteriza por el desarrollo de un ataque sectorial, apareciendo en una sola rama y las hojas presentan manchas cloróticas difusas (jaspeado), posteriormente estas se amarillentan y caen. Finalmente, los árboles mueren al cabo de algunos años (Armenta-Cardenas *et al.*, 2010).

El estado de nutrición de las plantas genera resistencia a las enfermedades, la cual influye en la comunidad microbiológica de la rizosfera, que en consecuencia contribuye al cambio de la composición del floema induciendo resistencia sistémica a bacterias u hongos endófitos (Shen *et al.*, 2013). El estado nutricional de las plantas puede ser afectado químicamente por productos agrícolas aplicados a ellas de manera artificial o por la utilización de microorganismos benéficos (Santillano *et al.*, 2019). Referente a esta última, se encuentran los hongos micorrízicos arbusculares (HMA). Los HMA fueron descritos por primera vez a principios de la década de 1880, cuando el patólogo forestal alemán A. B. Frank, acuñó el término *mykorrhiza*, haciendo referencia a la interacción entre una especie de hongo y la raíz de una especie vegetal (Andrade-Torres, 2010). En esta interacción, la planta le proporciona carbohidratos (azúcares, producto de su fotosíntesis) y un microhábitat al hongo para completar su ciclo de vida; el hongo le proporciona a la planta una mejor captación de agua, minerales de baja disponibilidad (P, N, K, Ca, Mg, Fe, Zn y Mn) e induce la defensa contra patógenos (Sarabia *et al.*, 2010; Camargo-Ricalde *et al.*, 2012; Trinidad *et al.*, 2017). Los HMA generan una respuesta diferente dependiendo de la planta hospedera y no son específicos a una especie o a un grupo vegetal en particular (Hernández-Cuevas *et al.*, 2003), no pueden desarrollar su ciclo sin un hospedero (son obligados), y crecen solo en raíces de plantas hospederas (Hernández-Cuevas *et al.*, 2003). Por otra parte, también se encuentran las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), las cuales pueden

¹ Miranda-Salcedo, M., J. López Arroyo, J. Padrón Chávez y J. Velázquez Monreal. 2012. Fitosanidad y problemática de la citricultura en el valle de Apatzingán, Michoacán. In: Congreso Mexicano de Investigación en Cítricos 2012. Centro de Investigación Regional Golfo-Centro (CIRGOC), Campo Experimental Ixtacuaco. Veracruz México.

incrementar el crecimiento y productividad vegetal sin dañar o contaminar el suelo (Loredo-Osti *et al.*, 2004). Las BPCV pueden solubilizar fosfatos, producir hormonas o fijar nitrógeno, lo que afecta directamente a las plantas de una forma benéfica, incrementando el fluido del agua y minerales, mejorando el desarrollo radicular y aumentando la actividad enzimática de la planta; incluso algunas tienen la capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos que la atacan (De-Bashan *et al.*, 2007). Entre las BPCV más conocidas están las especies que pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus*. El análisis de las poblaciones de microorganismos de la rizósfera puede reflejar las condiciones y la diversidad microbiana encontrada, así como la salud de un ecosistema; sin embargo, existen varios factores que pueden alterar las poblaciones de microorganismos tal es el caso de la temperatura, radiación ultravioleta, radiación ionizante, humedad, pH, potencial REDOX, ácidos orgánicos, sales y gases tales como nitrógeno y oxígeno (Calvo *et al.*, 2008). No existen trabajos previos sobre la dinámica poblacional de bacterias y hongos de la rizósfera de plantas de Lm infectadas por CLas. Su estudio puede abrir un panorama sobre el control y manejo de la enfermedad relacionada a este fitopatógeno. El objetivo del trabajo fue aislar y determinar la abundancia de bacterias (B) y hongos filamentosos (HF) totales en muestras de sustrato de plantas de limón infectadas con CLas y tratadas con *Bacillus subtilis* (BS) o *Funneliformis mosseae* (FM).

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento tuvo una duración de un año bajo condiciones de invernadero en las instalaciones de la Unidad Zapopan del CIATEJ (20.700861, -103.473855). Consistió en un diseño completamente al azar con seis tratamientos utilizando árboles certificados de *Citrus aurantifolia* injertados sobre *Citrus macrophylla* de un año y medio, provenientes de Tecmán Colima en bolsas de 2 kg de sustrato. Los árboles de limón mexicano (Lm) se infectaron con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Clas) vía injerto de yema, utilizando varetas de árboles sintomáticos provenientes de huertos de Lm de Tecmán Colima, el injerto se hizo ocho meses previo al trasplante a macetas de 20 L y al comienzo del experimento. Los árboles se regaron a capacidad de campo por lo menos una vez por semana. La descripción de los tratamientos es mostrada en el Cuadro 1, al momento del trasplante se aplicó *Funneliformis mosseae* a la raíz de los árboles. La primera aplicación de tratamientos con *B. subtilis*, nutrición química y nutrición orgánica se inició a los 30 días posteriores de la inoculación con *F. mosseae*. A los tratamientos que recibieron nutrición química (Q) se les aplicó urea (46% de N) y triple 16 (16-16-16% de N-P-K) cada tres meses (cuatro veces) sumando una dosis total de 150-18-18 (12.8 g de urea más 2.6 g de triple 16 por unidad experimental). A los dos tratamientos que recibieron nutrición orgánica (O), se les suministró lombricomposta líquida de manera mensual (Cuadro 1). El sustrato empleado en el experimento fue

Cuadro 1. Diseño de tratamientos para evaluar el efecto de aplicación de microorganismos benéficos en las poblaciones de bacterias y hongos de la rizosfera de plantas de limón mexicano enfermo con HLB.

Table 1. Design of treatments performed to evaluate the effect of the application of beneficial microorganisms over populations of bacteria and fungi from the rhizosphere of Mexican lime plants infected with HLB.

Tratamiento		Condiciones de aplicación			
Clave	Descripción	CLas	Concentración	Total	Periodicidad
FmCLas	<i>Funneliformis mosseae</i> +FQ	Con	5 esporas g ⁻¹ inóculo	100 g	Inicio
BsCLas	<i>Bacillus subtilis</i> +FQ	Con	2.5 × 10 ⁸ UFC mL ⁻¹	100 mL	Cada 30 días
QCLas	Fertilización química (kg ha ⁻¹)	Con	37.5-4.5-4.5	150-18-18	Cada 90 días
Q	Fertilización química (kg ha ⁻¹)	Sin	37.5-4.5-4.5	150-18-18	Cada 90 días
OCLas	Fertilización orgánica	Con	47000 mg kg ⁻¹	100 mL	Cada 30 días
O	Fertilización orgánica	Sin	47000 mg kg ⁻¹	100 mL	Cada 30 días

FQ = fertilización química: urea (46% N), triple 16. Fertilización orgánica = lombricomposta líquida. CLas= *Candidatus Liberibacter asiaticus*.
 FQ = chemical fertilization: urea (46% N), triple 16. Organic fertilization = liquid vermicompost. CLas = *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

una mezcla suelo:arena:agrolita:turba (Sunshine Mix® No. 3) (50:30:10:10, v/v/v/v). Previo a la esterilización del sustrato en autoclave (120 °C, 1.05 kg cm⁻², 6 h) se realizó el conteo de B y HF totales. Se emplearon recipientes de plástico negro con capacidad de 20 L como macetas para cada planta de limón, en cada maceta se colocaron 16 kg de la mezcla esterilizada. La mezcla esterilizada presentó una textura franca, pH neutro en agua (6.52), contenido de materia orgánica de 13.5%, conductividad eléctrica de 3.31 dS m⁻¹, contenido de N, P, K, Ca y Mg de 51, 184, 445, 3348 y 712 mg kg⁻¹ respectivamente, estos análisis fueron realizados por el Laboratorio de Análisis Agrícola de la empresa Fertilab® de Celaya Guanajuato (fertilab.com.mx) de acuerdo a los procedimientos descritos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000, 2002). Posteriormente de la aplicación de cada uno de los tratamientos se realizaron cuatro muestreos rizosféricos a 70, 140, 210 y 280 días después de la primera aplicación (ddpa) así como un muestreo al final del experimento (368 ddpa), utilizando un tubo de PVC de 1.27 cm de diámetro y 35 cm de alto, introduciéndolo en cuatro puntos alrededor de la planta (Norte, Sur, Este y Oeste) a tres diferentes profundidades (5, 15 y 30 cm), posteriormente éstas muestras fueron homogenizadas y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento. Se analizaron cinco repeticiones por tratamiento. Una unidad experimental consistió en una maceta con un árbol de limón mexicano. Para el conteo de bacterias totales se utilizó el medio de cultivo agar nutritivo (AN, 213000 DIFCO®), mientras para la determinación de hongos totales se empleó el medio agar papa dextrosa (PDA, 213400 DIFCO®), a pH de 5.5, 3.3 mL L⁻¹ de rosa de bengala al 1% (198250 SIGMA®) y 40 µg mL⁻¹ de estreptomycin (S9137, SIGMA®). La cuantificación de las unidades formadoras de colonia (UFC) se realizó por medio de diluciones decimales seriadas en cada muestra siguiendo lo propuesto por Camacho *et al.* (2009), con algunas modificaciones. Para lo cual se determinó el peso seco de las muestras a analizar, posteriormente para cada uno de los tratamientos se tomaron 10 g de muestra y se le añadieron 90 mL de agua destilada para obtener la dilución 10⁻¹, prosiguiendo a tomar 1 mL de la dilución 10⁻¹ y disolverla en 9 mL de agua destilada para obtener la dilución 10⁻². Repitiendo sucesivamente los pasos mencionados anteriormente hasta la dilución 10⁻⁵.

Los datos obtenidos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía y mediante

la comparación múltiple de medias de Tukey, ambos a un nivel de significancia del 5% ($P \leq 0.05$) mediante el programa estadístico Statgraphics® Centurion XV versión 15.2.06 (StatPoint Inc. 2005). Los resultados obtenidos a partir del análisis estadístico se presentan de la manera siguiente: 1) el efecto producido en las poblaciones de B y HF totales, por la inoculación de *F. mosseae* (FmCLAs) y *B. subtilis* (BsCLAs) en contraste con el tratamiento QCLAs dado que los tratamientos FmCLAs y BsCLAs tuvieron fertilización química; 2) el comparativo poblacional de B y HF totales, en los tratamientos QCLAs y Q; y 3) el contraste poblacional de B y HF totales obtenido de los tratamientos OCLAs y O con respecto a los tratamientos QCLAs y Q con el fin de determinar el efecto de distintas formas de fertilización. Con este análisis se comprende el fenómeno biológico ocurrido al aplicar los microorganismos benéficos, así como la nutrición orgánica contra la química en las plantas de Lm infectadas con CLAs.

Para determinar la presencia de CLAs en los árboles de limón inoculados con el patógeno se realizó una PCR punto final. La extracción de ADN se realizó a partir de las nervaduras centrales de las hojas utilizando el protocolo CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) a 3% de acuerdo a Zhang *et al.* (1998). Para la reacción PCR punto final, se amplificó la secuencia parcial del gen ribosomal 16S ADNr (1160 pb) con los oligonucleótidos específicos OI1 (5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3') y OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3') (Jagoueix *et al.*, 1994), empleando las siguientes condiciones: 94 °C por 5 min; 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 68 °C, 60 s a 72 °C; un ciclo final a 72 °C por 10 min (Lou *et al.*, 2012). La reacción de PCR se migró por electroforesis (90 V por 40 min) en geles de agarosa a 0.8% y se observó en un transiluminador con GelRed® (1X).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Infeción de los Árboles de Limón Mexicano con el Agente Causal del HLB (CLAs)

Las plantas de limón que fueron infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) por medio del injerto de yema se enfermaron con HLB. La extracción de ADN fue efectiva utilizando el método de CTAB (Zhang *et al.*, 1998) (Figura 1A) y se amplificó la secuencia parcial del gen ribosomal 16S ADNr

de la bacteria CLas (1167 pb) con los oligonucleótidos específicos OI1 y OI2c (Lou *et al.*, 2012) (Figura 1B). Esto demuestra que las plantas de limón fueron infectadas con CLas a través del injerto de yema.

Efecto de la Aplicación de Microorganismos Benéficos en las Poblaciones de Bacterias y Hongos Filamentosos Totales en Plantas de Limón Infectadas con CLas

Las poblaciones de microorganismos están altamente influenciadas por los exudados radicales que incluyen aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos, ácidos orgánicos, fenoles, reguladores de crecimiento, poliamidas, esteroides, azúcares y vitaminas (Wang *et al.*, 2018; Ramírez *et al.*, 2013), los cuales pueden ser modificados a través de la interacción de las plantas

con los microorganismos promotores de crecimiento vegetal (González y Fuentes, 2017).

Al sustrato inicial se le determinó el número de UFC g⁻¹ de sustrato de bacterias y hongos filamentosos totales, constatando su presencia previa al experimento, presentando 1.56×10^5 UFC g⁻¹ de sustrato de bacterias y 1400 UFC g⁻¹ de sustrato de hongos filamentosos totales.

En tres de los cinco muestreos los conteos de UFC de bacterias totales para el tratamiento QCLas fueron inferiores con respecto a los tratamientos inoculados con los microorganismos benéficos (Cuadro 2). La inoculación de *F. mosseae* (FmCLas) y *B. subtilis* (BsCLas) influye positivamente en la población de los microorganismos de la rizosfera (Cuadro 2), mostrando diferencias significativas en comparación con el tratamiento infectado (QCLas).

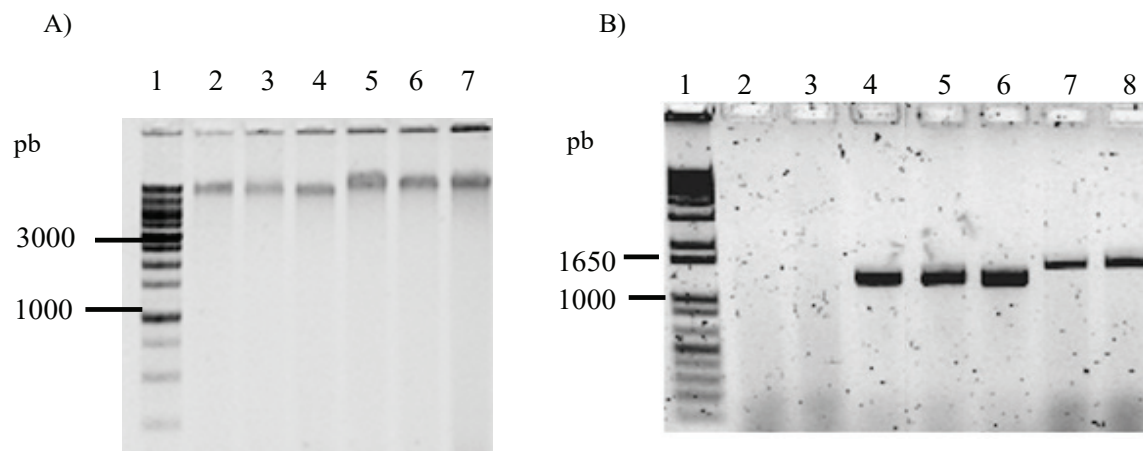


Figura 1. Determinación de la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) en plantas de limón mexicano inoculadas con la bacteria fitopatogénica *Candidatus*. A) Extracción de ADN de plantas de limón mexicano, utilizando el protocolo de CTAB a 3%. Carril 1: 1 Kb Ladder Plus (Invitrogen); carril de 2 al 7: ADN de plantas de limón con y sin inoculación de CLas. B) Determinación de la presencia de CLas en árboles de limón mediante PCR punto final (1167 pb) de plantas injertadas con varetas de árboles enfermos con HLB. Carril 1: 1 Kb Ladder Plus (Invitrogen); carril 2: plantas no inoculadas con CLas y con tratamiento de fertilización química (Q); carril 3: plantas no inoculadas con CLas y con tratamiento de fertilización orgánica (O); carril 4: plantas inoculadas con CLas y con tratamiento de fertilización química (QCLas); carril 5: plantas inoculadas con CLas y con tratamiento de fertilización orgánica (OCLas); carril 6: plantas inoculadas con CLas y con inoculación de *Bacillus subtilis* (BsCLas); carril 7: plantas inoculadas con CLas y con inoculación de *Funnelformis mosseae* (FmCLas); carril 8: plásmido con ADN de CLas.

Figure 1. Determination of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) in Mexican lime plants inoculated with the phytopathogenic bacterium *Candidatus*. A) DNA extraction from Mexican lime plants using the protocol CTAB. Lane 1: 1 Kb Ladder Plus (Invitrogen); lane 2 to 7: DNA from Mexican lime with and without inoculation of CLAs. B) Determination of CLAs in Mexican lime trees by endpoint PCR (1167 pb) of plants grafted with spikes of trees infected with HLB. Lane 1: 1 Kb Ladder Plus (Invitrogen); lane 2: plants without inoculation with CLAs and treated with chemical fertilization (Q); lane 3: plants without inoculation with CLAs and treated with organic fertilization (O); lane 4: plants inoculated with CLAs and treated with chemical fertilization (QCLAs); lane 5: plants inoculated with CLAs and treated with organic fertilization (OCLAs); lane 6: plants inoculated with CLAs and *Bacillus subtilis* (BsCLAs); lane 7: plants inoculated with CLAs and *Funnelformis mosseae* (FmCLAs); lane 8: plasmid with CLAs DNA.

Cuadro 2. Dinámica poblacional de bacterias totales después de la primera aplicación de microorganismos benéficos en árboles de limón mexicano bajo condiciones de invernadero.**Table 2. Population dynamics of total bacteria after the first application of beneficial microorganisms in Mexican lime trees under greenhouse conditions.**

Tratamiento	Días después de la primera aplicación (10^6 UFC g^{-1} sustrato)				
	70	140	210	280	368
FmCLas	5.37c	5.00a	2.50b	0.76b	0.46a
BsCLas	3.40b	4.83a	3.00d	0.62b	0.65ab
QCLas	0.56a	13.50b	0.45a	0.37a	0.74b
Q	0.55a	6.87a	2.63c	0.65b	2.67c

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Different letters in the same column indicate significant differences according to the Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Todos los muestreos presentaron un incremento en la población de bacterias en comparación con el conteo inicial (1.56×10^5 UFC g^{-1} de sustrato).

La inoculación con *F. mosseae* a los 70 y 140 ddpa presentó su mayor incremento en la población de bacterias totales (5.37×10^6 y 5×10^6 UFC g^{-1} de sustrato respectivamente; Cuadro 2), en contraste con el conteo inicial (1.56×10^5 UFC g^{-1} de sustrato). Con respecto al aumento del conteo de UFC, Gui *et al.* (2017) mencionan que los HMA pueden impactar en las comunidades bacterianas de la rizósfera, produciendo nichos para su crecimiento, además de mejorar la actividad de éstas asociándolo con la disponibilidad de N. Posteriormente, la población de bacterias totales disminuyó a partir de los 280 ddpa hasta su mínimo conteo de 4.6×10^5 UFC g^{-1} de sustrato a los 368 ddpa (Cuadro 2), el cual fue además estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) al tratamiento QCLas. Cui *et al.* (2018), mencionan que los HMA además de participar en la regulación de las defensas de las plantas pueden también mantener la estabilidad del microecosistema del suelo. Gui *et al.* (2017), reportan aumento en la abundancia de los filos *Actinobacteria* y *Thermoleophilia*, así como un aumento en las etapas tempranas de *Alphaproteobacterias* para posteriormente observar una disminución de estas mismas en muestras de sustrato forestal inoculadas con *F. mosseae*. Reportando por otra parte la disminución de la abundancia de *Acidobacterias* y *Gammaproteobacterias*, en todos los muestreos realizados.

La inoculación con *B. subtilis* presentó una dinámica poblacional similar al tratamiento inoculado con el HMA, con conteos de 3.40, 4.83 y 3×10^6 UFC g^{-1}

de sustrato a los 70, 140 y 210 ddpa respectivamente. Denotando una disminución a los 280 y 368 ddpa (Cuadro 2). El aumento en el conteo de UFC en los tres primeros muestreos fue un efecto esperado, ya que *B. subtilis* se inoculó de manera mensual (Cuadro 2). Con respecto a la disminución de la población subsecuente, se ha reportado que *B. subtilis* tiene una excelente habilidad de colonización radicular, produce antibiosis, lisis celular, competencia por espacio y nutrientes (Wang *et al.*, 2018), generando competencia con las bacterias de la rizósfera.

La dinámica de población de hongos filamentosos totales (Cuadro 3) mostró un comportamiento similar en los tres tratamientos infectados con CLas. La inoculación de *F. mosseae* y *B. subtilis* generó una estabilidad en el conteo de UFC de hongos filamentosos, manteniendo el conteo de UFC entre un intervalo de $1 - 1.77 \times 10^3$ UFC g^{-1} de sustrato, presentando solamente en un muestreo diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$) (280 ddpa). El tratamiento infectado con CLas (CLasQ) mostró un comportamiento similar a los tratamientos inoculados con los microorganismos benéficos. Siendo en la mayoría de los tratamientos estadísticamente iguales (Cuadro 3).

Efecto de CLas en las Poblaciones de Bacterias y Hongos Filamentosos Totales en Árboles de Limón

En contraste con las plantas que crecen en condiciones de asepsia en el laboratorio, las plantas sanas en la naturaleza, forman asociaciones con comunidades microbianas benéficas o incluso interacciones con microorganismos fitopatógenos pertenecientes a diversos reinos (Hacquard *et al.*, 2017). Para conocer

Cuadro 3. Dinámica poblacional de hongos filamentosos totales después de la primera aplicación de microorganismos benéficos en árboles de limón mexicano bajo condiciones de invernadero.**Table 3. Population dynamics of total filamentous fungi after the first application of beneficial microorganisms in Mexican lime trees under greenhouse conditions.**

Tratamiento	Días después de la primera aplicación (10^3 UFC g^{-1} sustrato)				
	70	140	210	280	368
FmCLas	1.27a	1.00a	1.47a	1.03a	1.33a
BsCLas	1.63a	1.00a	1.07a	1.77b	1.77a
QCLas	1.87a	3.67b	1.00a	1.77b	3.93ab
Q	2.13a	1.50a	1.03a	1.83b	5.27b

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Different letters in the same column indicate significant differences, according to the Tukey's test ($P \leq 0.05$).

como CLas influye sobre la dinámica de población de microorganismos presentes en la rizosfera de plantas de limón, observando solo los resultados para los tratamientos QCLas y Q, se muestra que al comparar el tratamiento infectado (QCLas) con el tratamiento sin infectar (Q), la dinámica poblacional de bacterias totales es modificada (Cuadro 2). A 70 ddpa, el conteo de UFC entre el tratamiento Q y QCLas no muestra diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre sí, pero si a los tratamientos inoculados con microorganismos benéficos (Cuadro 2). Los tratamientos Q y QCLas a 140, 210, 280 y 368 ddpa muestran diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre sí, siendo para el tratamiento Q el conteo de UFC mayor en tres de cuatro muestreos (Cuadro 2). Además, en 3 de los 4 muestreos el conteo de UFC fue mayor en el tratamiento Q. A partir de 210 ddpa el conteo de UFC g^{-1} de sustrato para el tratamiento QCLas disminuyó, en contraste al tratamiento Q que incluso el conteo de UFC va en aumento. Indicando que, posiblemente CLas inhibe el crecimiento de microorganismos presentes en la rizósfera, aunque, se debe tener en cuenta que CLas es un fitopatógeno que se aloja en el floema de los cítricos. A 368 ddpa el tratamiento Q mostró el mayor conteo de UFC con respecto a los tres tratamientos infectados con CLas (Cuadro 2). Hacquard *et al.* (2017) mencionan que organismos patógenos adaptados a sus hospederos pueden manipular el sistema inmune de la planta para su propio beneficio, pero también en formas que tienen consecuencias para otros microorganismos. Agler *et al.* (2016), observaron que el patógeno oomiceto perteneciente al género *Albugo*, tiene efectos en la colonización de bacterias epifitas y endófitas, disminuyendo la diversidad

de las α -bacterias y estabilizando la diversidad de las β -bacterias. Por otra parte, Wang *et al.* (2017) mencionan que CLas causa cambios dramáticos en el metabolismo y el sistema regulatorio de los cítricos, afectando la composición de los exudados radicales e indirectamente la microbiota de la rizósfera. CLas también afecta el sistema de defensa de los cítricos que en consecuencia impacta en la microbiota de la rizósfera (Wang y Trivedi, 2013). La abundancia del microbioma de la rizósfera de plantas de cítricos infectadas con CLas es menor en comparación con el de plantas de cítricos sanas, así mismo se ve afectado la composición taxonómica disminuyendo la abundancia de los géneros *Burkholderia* y *Pseudomonas* y aumenta la proporción de *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Bacillus* (Trivedi *et al.*, 2012).

En contraste, el conteo de hongos filamentosos totales (Cuadro 3) que solamente en el muestreo realizado a 140 ddpa se observó un conteo mayor en las UFC g^{-1} de sustrato correspondiente al tratamiento QCLas con respecto al tratamiento Q. Pudiendo decir que la infección de limón con CLas, no induce cambios en la dinámica de población en la rizósfera de hongos filamentosos. Cabe resaltar que el conteo de hongos filamentosos aumentó a 368 ddpa con respecto a los muestreos anteriores, efecto contrario a la población de bacterias totales, la cual va decreciendo con el tiempo.

Influencia de la Nutrición Orgánica en las Poblaciones de Bacterias y Hongos Filamentosos Totales en Plantas de Limón Infectadas con CLas

Con el fin de evaluar el efecto de la nutrición orgánica en la dinámica de microorganismos de

la rizósfera en limón infectado con CLAs se incluyeron dos tratamientos a los que se les varió la nutrición de química a orgánica. Los resultados demostraron que para el caso de las bacterias totales a 71 ddpa no existe diferencia estadística (Tukey, $P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Figura 2). A 140 ddpa el conteo de bacterias totales aumentó significativamente llegando a tener hasta 1.35×10^7 UFC g^{-1} de sustrato para el tratamiento QCLas y un mínimo de 2.57×10^6 UFC g^{-1} de sustrato para el tratamiento O (Figura 2). No obstante, a partir de 210 ddpa se aprecia un decremento en el conteo de UFC de bacterias totales, teniendo a 368 ddpa un conteo máximo de 2.67×10^6 UFC g^{-1} de sustrato para el tratamiento Q (Figura 2). En el conteo de UFC de los hongos filamentosos totales se observa un decremento a 70 ddpa en los tratamientos que recibieron nutrición orgánica y un aumento en las UFC en los tratamientos que recibieron nutrición química en comparación con las UFC del sustrato inicial; sin embargo, no mostraron diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre ellos (Figura 3). El comportamiento de la dinámica de población de los hongos filamentosos totales con nutrición orgánica se puede considerar estable, ya que su población se mantuvo entre 1000 y 2000 UFC g^{-1} de

sustrato (Figura 3). En contraste con los tratamientos con nutrición química cuya población fue de 1000 UFC g^{-1} de sustrato a un poco más de 5000 UFC g^{-1} de sustrato a 368 ddpa, mostrando una tendencia al aumento de la población de hongos filamentosos tanto para el tratamiento QCLas y Q (Figura 3).

Las poblaciones de bacterias se mantuvieron en un intervalo de 10^5 a 10^6 UFC g^{-1} de sustrato (Figura 2). Siendo reportado por Calvo *et al.* (2008) un conteo de bacterias totales en un intervalo de 10^7 y 10^8 UFC g^{-1} de sustrato en muestras de rizósfera de cultivo de papa. Bolaños *et al.* (2013) reportaron conteos de bacterias totales de 10^6 UFC g^{-1} de sustrato en muestras de rizósfera de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) con riego y sin riego, cultivada en campo abierto. En cuanto a los hongos filamentosos estos se mantuvieron en un intervalo de 10^3 UFC g^{-1} de sustrato (Figura 3). Calvo *et al.* (2008) reportaron conteos de hongos filamentosos en un intervalo de 10^4 a 10^5 UFC g^{-1} de sustrato. Bolaños *et al.* (2013) reportaron conteos de hongos totales de 10^3 UFC g^{-1} de sustrato en parcelas con riego y de 10^4 UFC g^{-1} de sustrato en parcelas sin riego. En general se observa una disminución de la carga bacteriana total en los tratamientos de plantas

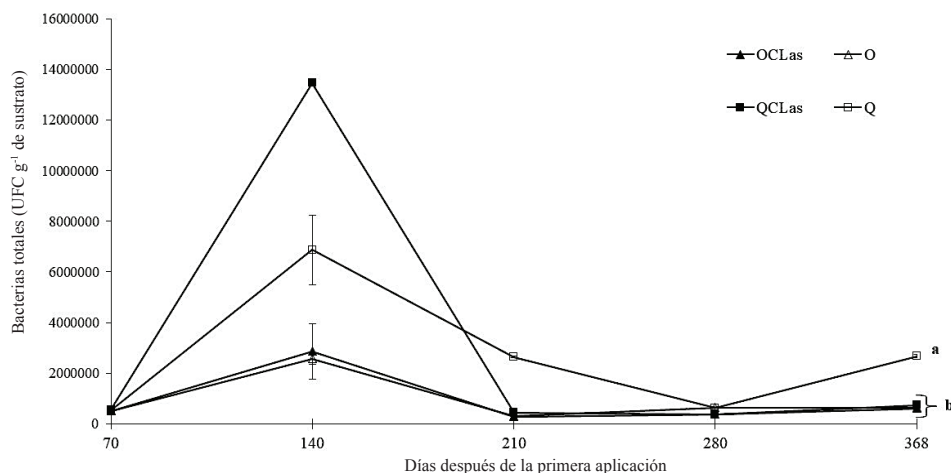


Figura 2. Dinámica de las poblaciones bacterianas totales después de la primera aplicación de nutrición orgánica en árboles de limón mexicano bajo condiciones de invernadero. Fertilización orgánica (O), química (Q), CLas = inoculación con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Las barras en cada punto de muestreo indican \pm error estándar. Letras distintas al final del experimento indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Figure 2. Population dynamics of total bacteria after the first application of organic nutrition in Mexican lime trees under greenhouse conditions. Organic fertilization (O), chemical (Q), CLas = inoculation with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Bars in each sampling point indicate \pm standard error. Different letters at the end of the experiment indicate significant differences, according to the Tukey's test ($P \leq 0.05$).

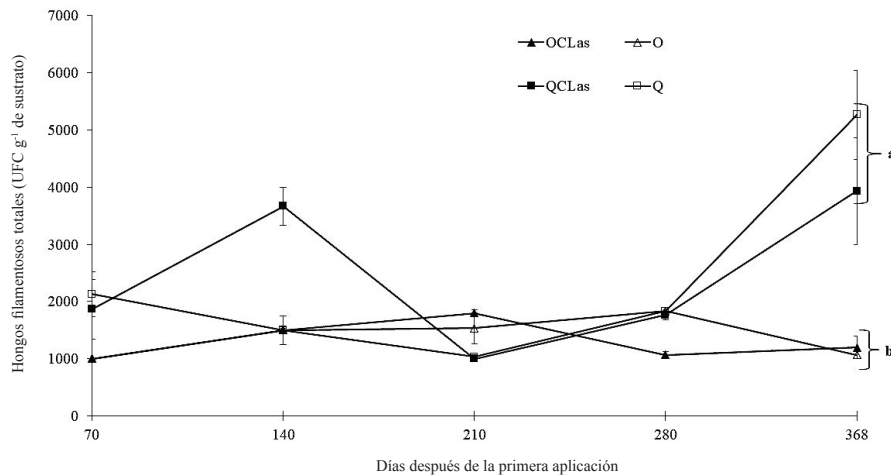


Figura 3. Dinámica de poblaciones de hongos filamentosos totales después de la primera aplicación de nutrición orgánica en árboles de limón mexicano bajo condiciones de invernadero. Fertilización orgánica (O), química (Q), CLas = inoculación con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Las barras en cada punto de muestreo indican \pm error estándar. Letras distintas al final del experimento indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Figure 3. Population dynamics of total filamentous fungi after the first application of organic nutrition in Mexican lime trees under greenhouse conditions. Organic fertilization (O), chemical (Q), CLas = inoculation with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Bars in each sampling point indicate \pm standard error. Different letters at the end of the experiment indicate significant differences, according to the Tukey's test ($P \leq 0.05$).

de limón infectadas con CLas. Sin embargo, esta disminución fue notoria también para las plantas sanas, es decir, para aquellas que no fueron infectadas. El fenómeno anterior se puede justificar debido a la alta competencia entre los microorganismos que se desarrolla en la rizósfera por adquirir los nutrientes encontrados en los exudados radicales (Yagüe y Gutiérrez-Correa, 1982). Además, los exudados radicales funcionan como atrayentes y repelentes químicos en la rizósfera y su zona de influencia regulando las comunidades microbianas del suelo (Torres-Guerrero *et al.*, 2013). Lo que deja abierto el análisis de los exudados radicales en plantas de limón infectadas con CLas y su influencia en la dinámica poblacional bacterias y hongos filamentosos. El crecimiento en la población de microorganismos en el suelo puede estar influenciado por varios factores desde la materia orgánica disponible para su crecimiento hasta cambios de pH por cuestiones biológicas y bioquímicas. Sin embargo, la inoculación con los microorganismos benéficos como *Funneliformis mosseae* y *Bacillus subtilis* no aumentaron las poblaciones de bacterias totales. Sino al contrario, estas disminuían conforme avanzaba la enfermedad.

CONCLUSIONES

Con el comportamiento observado entre las poblaciones de bacterias y hongos filamentosos totales, en muestras de sustrato de plantas de limón mexicano infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), se encontró que la aplicación de microorganismos benéficos como *Funneliformis mosseae* y *Bacillus subtilis* aumentan las poblaciones de bacterias y hongos filamentosos totales en plantas infectadas con CLas y las mantienen estables hasta 210 días después de iniciado el experimento. La aplicación de nutrición orgánica no influye en la dinámica de población de bacterias totales en plantas de limón mexicano infectadas con CLas; en cambio, la aplicación de nutrición orgánica mantiene estables las poblaciones de hongos filamentosos a lo largo del tiempo tanto en el tratamiento infectado como el tratamiento sin CLas. La aplicación de microorganismos benéficos y la nutrición orgánica hacen sinergia en la estabilización de hongos filamentosos totales en plantas de limón mexicano infectadas con CLas. Se encontraron diferencias estadísticas en el tratamiento infectado con CLas y que recibió nutrición química en comparación

con el tratamiento sin infectar, lo que demuestra que la infección con CLas en plantas de limón influye negativamente en el desarrollo poblacional de bacterias totales presentes en la rizósfera.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al proyecto: Efecto de distintos bioprotectores en el desarrollo de HLB en limón mexicano del estado de Michoacán: 2012-03-193066 de Fondo Mixto de Fomento Científico y Tecnológico CONACYT-Gobierno del Estado de Michoacán. La Dra. Evangelina Esmeralda Quiñones-Aguilar fue codirectora de la tesis de Christian Salvador Mendoza Hernández.

LITERATURA CITADA

- Agler, M., J. Ruhe, S. Kroll, C. Morhenn, S. Kim, D. Weigel, and E. Kemen. 2016. Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation. *PLoS Biol* 14: 1-31. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002352>.
- Andrade-Torres, A. 2010. Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos. *Ciencia* 61: 84-90.
- Armenta-Cárdenas, I., J. E. Ortiz-Enríquez, A. Vega-Verdugo y J. M. Ramírez-Díaz. 2010. Presencia de *Diaphorina citri* en el valle de Guaymas-Empalme, Sonora. 2007-2010. pp. 8-12. In: CONACYT-SAGARPA. 1^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México-2010. Monterrey, Nuevo León, México. <https://sites.google.com/site/diaphorina/simposioh1b1>. (Consulta: enero 30, 2019).
- Bolaños, C., M. Estrada, H. Orellana y G. Bernal. 2013. Influencia del riego en la dinámica poblacional de grupos funcionales de microorganismos asociados a la rizósfera de tres materiales tenera de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). pp. 73-80. In: Asociación Nacional de Cultivadores de Palma Africana, Ancupa (eds.). Investigaciones en palma aceitera: Recopilación de estudios, conocimientos y productividad desarrollados por el CIPAL. ANCUPA. Ecuador. doi: <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1972.9360>.
- Calvo V., P., L. R. Meneses y D. Zúñiga D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecol. Aplic.* 7: 141-148. doi: <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v7i1-2.369>.
- Camacho, A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. 2009. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. Facultad de Química, UNAM. México, D. F.
- Camargo-Ricalde, S., N. M. Montaña, C. J. de la Rosa-Mera y S. A. Montaña Arias. 2012. Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo. *Rev. Digital Univ.* 13: 1-19. <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/index.html>.
- Cui, J. Q., H. B. Sun, M. B. Sun, R. T. Liang, W. G. Jie, and B. Y. Cai. 2018. Effects of *Funneliformis mosseae* on root metabolites and rhizosphere soil properties to continuously-metop soybean in th potted-experiments. *Int. J. Mol. Sci.* 19: E2160. doi: 10.3390/ijms19082160.
- De-Bashan, L. E., G. Holguin, B. R. Glick y Y. Bashan. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. pp. 161-215. In: R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón. (ed.). Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna. Control biológico y planta-microorganismo. Trillas. México, D. F. ISBN: 9789682478109 9682478103.
- González F., H. y N. Fuentes. 2017. Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Cienc. Agríc.* 34: 17-31. doi: <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173401.60>.
- González-Sánchez, R. F. y R. S. Echevarria. 2003. Caracterización de las cadenas prioritarias e identificación de las demandas tecnológicas: cadena de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle). Coordinación general de vinculación dirección general de estudios estratégicos y la Facultad de Economía, Colima. (eds.). Programa estratégico de investigación y transferencia de tecnología en el estado de Colima. Universidad de Colima y Fundación Produce Colima, A.C. Colima, México. http://siic.uco.mx/Archivos_prov%5CDiagnostico%20Limon.pdf. (Consulta: marzo 15, 2019).
- Gui, H., W. Purahong, K. D. Hyde, J. Xu, and P. E. Mortimer. 2017. The arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* alters bacterial communities in subtropical forest soils during litter decomposition. *Front. Microbiol.* 8: 1120. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01120>.
- Hacquard, S., S. Spaepen, R. Garrido-Oter, and P. Schulze-Lefert. 2017. Interplay between innate immunity and the plant microbiota. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55: 565-589. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035623.
- Hernández-Cuevas, L., S. Castillo-Argüero, P. Guadarrama-Chávez, Y. Martínez-Orea, M. A. Romero-Romero e I. Sánchez-Gallén. 2003. Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel. UNAM. México, D.F. ISBN: 9703204317, 9789703204311.
- Jagoueix, S., J. M. Bove, and M. Garnier. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the Proteobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 379-86.
- Kim, J. S., U. S. Sagaram, J. K. Burns, J. L. Li, and N. Wang. 2008. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50-57. doi: 10.1094/PHYTO-99-1-0050.
- Loredo-Ostí, C., L. López-Reyes y D. Espinosa-Victoria. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana* 22: 225-239.
- Lou, B. H, X. L. Zhao, Y. Q. Song, X. J. Bai, C. L. Deng, and G. P. Chen. 2012. "*Candidatus Liberibacter asiaticus*", associated with citrus huanglongbing, infects pollen, seed coat and endosperm of pummelo in China. *J. Plant Pathol.* 93: 703-705. doi: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.072>.
- NOM-021-RECNAT-2000 (Norma Oficial Mexicana). 2002. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. SEMARNAT. México, D. F. http://diariooficial.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=717582&fecha=31/12/2002 (Consulta: marzo 10, 2019).
- Ramírez Gil, J. G., D. A. Castañeda-Sánchez y J. G. Morales-Osorio. 2013. Dinámica microbiana del suelo asociada a diferentes estrategias de manejo de *Phytophthora cinnamomi* Rands en aguacate. *Rev. Ceres* 60: 811-819. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2013000600009>.

- Robles-González, M. M., J. J. Velázquez-Monreal, M. A. Manzanilla-Ramírez, M. Orozco-Santos, R. Flores-Virgen y V. M. Medina-Urrutia. 2010. Síntomas del huanglongbing en limón mexicano. Primeras observaciones. 021 068. *In*: 1^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México-2010 CONACYT-SAGARPA. Monterrey, Nuevo León, México. <https://sites.google.com/site/diaphorina/simposiohbl1>. (Consulta: enero 30, 2019).
- Sánchez-Borja, M., H. Bravo-Mojica, J. Romero-Nápoles, S. Ramírez-Alarcón y B. López-Martínez. 2010. Biología, ecología y control de *Diaphorina citri* Kuwayama (*Hemiptera Psyllidae*) 006 026. *In*: 1^{er} Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México-2010 CONACYT-SAGARPA. Monterrey, Nuevo León, México. <https://sites.google.com/site/diaphorina/simposiohbl1>. (Consulta: enero 30, 2019).
- Santillano-Cázares, J., L. G. Roque-Díaz, F. Núñez-Ramírez, R. L. Grijalva-Contreras, F. Robles-Contreras, R. Macías-Duarte, I. Escobosa-García y V. Cárdenas-Salazar. 2019. La fertilidad del suelo afecta el crecimiento, nutrición y rendimiento de algodón cultivado en dos sistemas de riego y diferentes dosis de nitrógeno. *Terra Latinoamericana* 37: 7-14. doi: <https://doi.org/10.28940/terra.v37i1.304>.
- Sarabia-Ochoa, M., R. Madrigal-Pedraza, M. Martínez-Trujillo y Y. Carreón-Abud. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas* 12: 65-71.
- Shen, W., J. M. Cevallos-Cevallos, U. Nunes da Rocha, H. A. Arevalo, P. A. Stansly, P. D. Roberts, and A. H. C. van Bruggen. 2013. Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus Liberibacter Ct* values in citrus trees infected with Huanglongbing. *Eur. J. Plant Pathol.* 137: 727-742. doi: 10.1007/s10658-013-0283-7.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2019. Avance de siembras y cosechas: Resumen nacional por cultivo. Obtenido de Reportes: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do. (Consulta: enero 30, 2019).
- StatPoint Inc. 2005. StatGraphics Centurion XV version 15.02.06. Warrenton, VA, USA. www.statgraphics.com
- Torres-Guerrero, C., J. D. Etchevers B., M. H. Fuentes-Ponce, B. Govaerts, F. de León-González y J. M. Herrera. 2013. Influencia de las raíces sobre la agregación del suelo. *Terra Latinoamericana* 31: 71-84.
- Trinidad-Cruz, J. R., E. E. Quiñones-Aguilar, G. Rincón-Enríquez, L. López-Pérez y L. V. Hernández-Cuevas. 2017. Mycorrhization of *Agave cupreata*: biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. *Rev. Mex. Fitopatol.* 35: 151-169. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1607-5.
- Trivedi, P., Z. He, J. D. Van Nostrand, G. Albrigo, J. Zhou, and N. Wang. 2012. Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities associated with citrus rhizosphere. *ISME J.* 6: 363-383. doi: 10.1038/ISMEJ.2011.100.
- Wang, N. and P. Trivedi. 2013. Citrus huanglongbing: A newly relevant disease presents unprecedented challenges. *Phytopathology* 103: 652-665. doi: 10.1094/PHYTO-12-12-0331-RVW.
- Wang, N., L. L. Stelinski, K. S. Pelz-Stelinski, J. H. Granham, and Y. Zhang. 2017. Tale of the huanglongbing disease pyramid in the context of the citrus microbiome. *Phytopathology* 107: 380-387. doi: 10.1094/PHYTO-12-16-0426-RVW.
- Wang, X. Q., D. L. Zhao, L. L. Shen, C. L. Jing, and C. S. Zhang. 2018. Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. pp. 225-250. *In*: V. S. Meena (ed.). *Role of rhizospheric microbes in soil: Volume 1: Stress management and agricultural sustainability*. Springer. New York, NY, USA. doi: 10.1007/978-981-10-8402-7_9.
- Yagüe, N. y M. Gutiérrez-Correa. 1982. Dinámica poblacional de las bacterias del ciclo del nitrógeno en los suelos de las lomas de Lachay. *Zonas Áridas* 1: 75-80.
- Zhang, Y. P., J. K. Uyemoto, and B. C. Kirkpatrick. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J. Virol. Methods* 71: 45-50.