



Artículo Científico

Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en dosel y raíz de *Citrus sinensis* en una condición asintomática

Gustavo Mora-Aguilera^{*1}, Gerardo Acevedo-Sánchez¹, Verónica Martínez-Bustamante¹, Viridiana López-Bautista¹, Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa², Pedro Robles-García³. ¹Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF), ²Fruticultura, Colegio de Posgraduados, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco CP. 56264, Estado de México. ³SENASICA-DGSV. Av. Insurgentes Sur 489, Hipódromo, Cuauhtémoc, CP. 06100, CDMX.

*Autor de Correspondencia:
Gustavo Mora-Aguilera
morag@colpos.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
20 Junio, 2025
Aceptado:
20 Diciembre, 2025
Publicado:
27 Diciembre, 2025
Adelantada 2026

Cita:
Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Martínez-Bustamante V, López-Bautista V, Gutiérrez-Espinosa MA y Robles-García P. 2026. Distribución de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en dosel y raíz de *Citrus sinensis* en una condición asintomática. Revista Mexicana de Fitopatología 44(1): 109. <https://doi.org/10.18781/R.ME.X.FIT.2506-2>

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. El presente estudio analizó por primera vez la condición asintomática inducida por CLas en *Citrus sinensis* / *C. aurantium* a partir de primeros reportes en la región Centro Golfo de México. El objetivo fue analizar con un enfoque mecanístico la concentración espacio-temporal de CLas a nivel planta en condición de huertos comerciales para demostrar la posible implicación de un prolongado periodo de incubación (PI) en la expresión asintomática de HLB.

Materiales y Métodos. Se confinaron dos de tres árboles (A1-A3) (>30 años) de naranjo dulce Valencia asintomáticos positivos a CLas, identificados mediante protocolos oficiales de diagnóstico en San José Acateno, Puebla. En los árboles A2 y A3 se marcaron 13 y 16 ramas secundarias, con un total de 112 y 108 muestras follaje/colecta, respectivamente (total 1540 muestras), obtenidas de la parte distal y proximal de cada rama. Se realizaron siete muestreos mensuales de material vegetal entre mayo-diciembre. A nivel raíz se muestrearon tres categorías por diámetro/función y por combinación de seis sectores distales del tronco (0-280 cm) por 4 de profundidad (0 x 110 cm) con un total de 111 muestras. La extracción de ADN se realizó con CTAB 2 % y cuantificación por qPCR (oligos, HLBp/HLBas).

Resultados. En dosel, la incidencia/ramas en A3 fue 52.2 % (Ct = 22.7 – 34.9) y A2 47.8 % (Ct = 23.4 – 35) sin diferencia estadística ($p = 0.48$). La carga de inóculo fue 1.6 (± 1.3) log-CLas, equivalente a 109 copias/reacción en 100 mL (rango en número de copias 6.3 a 68 870.7). CLas no fue diferente entre muestras distales (1.6 log) y proximales (1.5 log) ($p = 0.33$). Se encontró fluctuación temporal entre junio – octubre de muestras positivas (37 – 87, $p < 0.0001$) y de concentración de CLas (1.6 - 3.5 log-CLas, $p > 0.72$). La distribución de CLas por rama tuvo efecto temporal ($p = 0.0001$) y por sectores ($p = 0.07$) evidenciando alta movilidad y estacionalidad. La concentración máxima (Y_{max}) se encontró asociada al sector medio-superior del dosel, y de alta movilidad hacia sectores inferior y superior en $Y_{inicial}$ y Y_{final} . En raíz, se encontró 38.7 % de positividad. La detectabilidad de CLas fue homogénea entre los tipos de raíz ($p < 0.0001$) pero variable en concentración ($p = 0.04$). El 47.6, 15.4 y 38.7 % de incidencia en raíz se asoció con 38.3, 43.4 y 9.5 promedio de copias CLas para *soporte*, *conducción* y *absorción*, respectivamente ($p = 0.0001$). Dos secciones de mayor intensidad-concentración de CLas (80 – 144 copias) se asociaron a raíz en zona media de goteo (160 - 240 cm) y estratos de profundidad medios (50 - 80 cm).

Conclusión. CLas se detectó significativa y consistentemente en tejido vegetal y raíz durante todo el periodo experimental, pero a concentraciones fluctuantes, no incrementales, y análoga entre árboles A2 y A3. La amplia distribución en dosel-raíz sugiere un efecto crónico sistémico. En consecuencia, el periodo de incubación no determina la condición asintomática en el sistema productivo naranjo dulce/naranjo agrio investigado. Otros factores, p.e. inherentes a la variabilidad del patógeno, podrían estar implicados. Estos resultados contribuyen a optimizar un sistema de vigilancia-monitoreo considerando estacionalidad, zona-rama, sector-dosel y tipo de tejido, con mayor probabilidad de detección de CLas aun en una eventual condición asintomática y generan nuevas perspectivas de manejo de CLas. Este es el primer trabajo que analiza PI mecanísticamente, a nivel dosel – raíz, las detecciones iniciales de HLB-asintomático en México en árboles productivos adultos de Valencia *C. sinensis* / *C. aurantium* en condiciones de campo.

Palabras clave: CLas, HLB, Carga inóculo, Naranjo dulce, Naranjo Agrio



INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing o HLB causado por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) se detectó en Yucatán, México en julio 2009. Actualmente, está presente en más de 351 municipios de prácticamente todos los estados productores comerciales de cítricos (<https://goo.su/qwSbCa> - 2025, www.gob.mx -; SENASICA, 2022). Durante la fase inicial del proceso epidémico (2009-2014), dos escenarios predominaron: 1) en el Pacífico con alta intensidad, prevalencia y carga inóculo en vector-planta asociado a huertos comerciales predominantemente *Citrus aurantifolia*, y 2) en la Península de Yucatán con moderada-baja intensidad, prevalencia y carga inóculo vector-planta en traspatios de *Citrus latifolia* (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Flores-Sánchez *et al.*, 2015). Sin embargo, en la fase de dispersión regional e intrarregional del vector y la enfermedad (2015-2018), escenarios epidémicos diferenciales respecto a incidencia y endemicidad se presentaron en condiciones regionales específicas de producción, manejo, clima, entre otras, p.e., Centro-Golfo con cítricos dulces en áreas comerciales y de traspatios (*C. sinensis*, *C. reticulata*, entre otras) o Noreste con huertos comerciales de alta producción-rendimiento en *C. sinensis* y *C. reticulata*.

En México, resultados e indicadores epidemiológicos publicados sobre dispersión intra-parcelaria o regional del complejo CLas- *Diaphorina citri* (Dc) (Gottwald *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2005; 2013a; Esquivel-Chávez, 2011), tasas epidémicas temporales (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2005; 2013a; Robles-González *et al.*, 2013; Esquivel-Chávez, 2011), escenarios de dispersión regional (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Robles-González *et al.*, 2013), entre otros, se emplearon para establecer estrategias oficiales de muestreo, monitoreo, delimitación y control de brotes a través de Áreas Regionales de Control de Dc (ARCOs) bajo condición sintomática (Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Bassanezi *et al.*, 2013a; DGSV-SENASICA, 2010).

Un novel escenario se presentó en México a partir de la detección de cinco muestras vegetales CLas-positivas de *C. sinensis* procedentes de árboles asintomáticos en huertos comerciales de Acateno, Puebla (SENASICA, 2012; 2015). No se observó expresión de los síntomas característicos de HLB en condiciones de México como aclaramiento de nervaduras, moteado difuso o amarillamiento tenue generalizado (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Interesantemente, esta condición prevaleció hasta diciembre 2015 (2.5 años), mayor a lo reportado en una condición asintomática asociada al *periodo de incubación* de CLas (Canale *et al.*, 2020; Lopes *et al.*, 2009).

En este contexto, la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) adscrita al Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) en México solicitó al Laboratorio de Análisis de Riesgo Epidemiológico Fitosanitario (CP-LANREF) el confinamiento de dos árboles de *Citrus sinensis* positivos a CLas y el desarrollo de líneas de investigación para explicar la condición asintomática. El presente estudio analiza una de cinco hipótesis investigadas simultáneamente para explicar la situación asintomática inducida por CLas en *Citrus sinensis* / *C. aurantium* en el Centro-Golfo de México. El objetivo fue analizar la concentración espacio-temporal de CLas a nivel planta en condición comercial para demostrar la posible implicación de un prolongado *periodo de incubación* en la condición asintomática de HLB, bajo la premisa de que la concentración bacteriana debía ser incremental y exhibir gradualmente una infección crónica-sistémica a través de un periodo de infección-incubación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Confinamiento de plantas asintomáticas. En diciembre de 2013, se confinaron dos árboles (A2 y A3) de naranja dulce Valencia (*Citrus sinensis*) positivos a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) confirmados mediante protocolo RT-PCR, para estudiar la condición asintomática del patógeno en cítricos dulces. Se emplearon estructuras metálicas de 8 x 8 x 8 m (largo x ancho x alto) protegidas con doble malla antiáfidos siguiendo especificaciones definidas por la DGSV-CNRF (Figura 1A). El propósito fue evitar reinfecciones vía vector y la dispersión del aislado de CLas detectado. Para cada estructura se colocó una puerta con candado para acceso restringido por investigadores y personal oficial. Se instalaron dos dataloggers HOBO u23 Pro v2 para registro de variables de temperatura (°C) y humedad relativa (HR) dentro y fuera de la estructura de confinamiento de cada árbol (Figura 1B). Adicionalmente, se instaló una estación climática Davis® (Vantage Pro 2 Plus) para medición de precipitación, evapotranspiración, radiación solar y otras variables complementarias (Figura 1C). Durante el experimento se eliminaron malezas mecánicamente y no se aplicaron agroquímicos. El riego fue de temporal.



Figura 1. Estructura de Confinamiento por árbol, HLB-asintomático qPCR CLas positivo, de naranja Valencia *Citrus sinensis* / *C. aurantium*. **A.** Estructura metálica de confinamiento (8 x 8 x 8 m) con malla antiáfidos. Las estructuras incluyeron una puerta de acceso restringido mediante llaves; **B.** Sensor HOBO U23 Pro V2 de temperatura (°C) y humedad relativa (HR), programado para mediciones a intervalos de 30 min dentro del área confinada; **C.** Estación climática Davis Vantage para medición de variables climáticas complementarias como precipitación, velocidad y dirección de viento, evapotranspiración, etc.

Selección y muestreo de tejido vegetal. Un total de 13 y 16 ramas primarias se marcaron en árboles A2 y A3, respectivamente (Figura 2A). La enumeración de ramas se realizó en sentido de las manecillas del reloj en dirección Oeste-Este (Figura 2B). Por rama primaria, fueron seleccionadas y marcadas ramas secundarias específicamente para colecta de muestras de tejido foliar. Debido al periodo de establecimiento del experimento fuera de flujos vegetativos principales, las ramas secundarias se seleccionaron directamente por la disponibilidad de tejido vegetal óptimo para análisis molecular. Las muestras de tejido vegetal se colectaron de la región distal y proximal (Figura 2C). Para muestras distales, se identificó el crecimiento vegetativo reciente y se tomó un foliolo del brote, y para muestras proximales se colectó una hoja del brote vegetativo del ciclo previo. Todas las muestras se

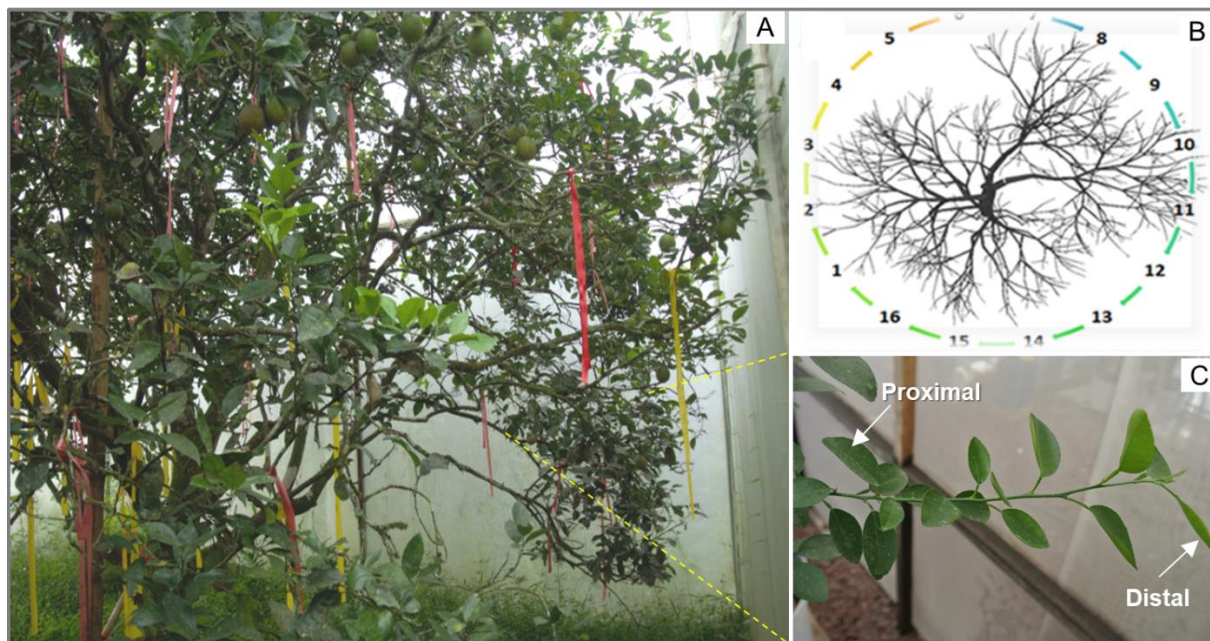


Figura 2. A. Árbol Valencia *C. sinensis* / *C. aurantium* HLB-asintomático CLas-positivo confinado en jaulas con malla antiáfidos. Los listones rojos y amarillos muestran la selección y marcaje de ramas primarias (rojo) y secundarias (amarillo) para muestreo mensual en sección proximal o distal de mayo a diciembre. B. Ejemplificación de método para la numeración de ramas en el orden de las manecillas de reloj. C. Estructura de una rama de cítricos para selección de hojas proximales y distales. Se colectaron un total de 1 540 muestras / árboles A2 y A3.

etiquetaron y se conservaron en frío en campo y laboratorio. Para análisis molecular se empleó la nervadura central foliar. Los muestreos se realizaron mensuales entre mayo y diciembre, 2014. Se analizaron un total de 1 540 muestras por qPCR.

Muestreo de raíces. Para el muestreo de raíces se marcó sobre la superficie del suelo un triángulo de 55° a partir del tronco, dividiendo cinco secciones cada 40 cm (Figura 3A-B). Posteriormente, se excavaron 20 cm de profundidad para el primer estrato A (0 a 20 cm), mientras que para los tres siguientes estratos se cavaron 30 cm de profundidad (B = 20 - 50 cm, C = 50 - 80 cm, D = 80 - 110 cm) (Figura 3C-D). Por estrato, se colectaron muestras de raíz clasificadas por su estructura-función de *soporte* (S), *conducción* (C) y *absorción* (AB). En cada sección-estrato, la tierra fue cernida para separar la raíz total. Las muestras se almacenaron en bolsas de polipapel y almacenadas en una hielera. En el laboratorio cada muestra fue lavada con agua para retirar residuos de tierra. Las muestras de raíz se separaron en la clasificación definida previamente (S, C y AB), se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % durante 1 min. Posteriormente, se enjuagaron dos veces con agua destilada. En raíces de *conducción* y *soporte*, se tomó la corteza (floema) la cual fue molida con nitrógeno líquido en un mortero. Las raíces de *absorción* fueron molidas usando el tejido total disponible. Por cada sección-estrato al menos tres submuestras fueron analizadas por qPCR con un total de 111.

Análisis molecular, diagnóstico y cuantificación de CLas. La extracción de ADN total de muestras vegetales y raíz se realizó con el método CTAB 2 % con buffer salino a partir de 100 mg de material vegetal y raíz. La cuantificación por qPCR se realizó en StepOne™ (Applied Biosystems®, Foster City, CA) con el método de curva estándar, utilizando los oligos HLBp (5'- GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG -3'), HLBas (5'- TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG -3') y la sonda tipo Taqman (5'- AGA CGG GTG AGT AAC

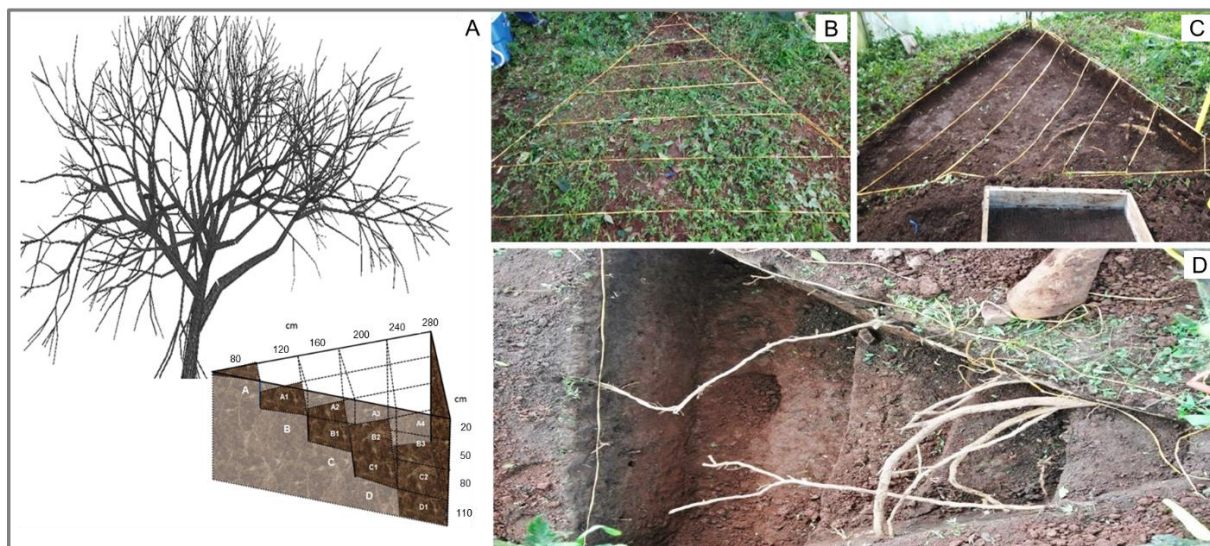


Figura 3. Sistema de muestreo 3D-seccional para la colecta de raíz en árbol A3, HLB-asintomático qPCR positivo, de *C. sinensis* / *C. aurantium*. **A.** Diseño utilizado para colecta de raíz considerando la distancia proximal al tronco y hasta zona de goteo (0 - 280 cm) y cuatro profundidades (0 - 110 cm). **B.** Diseño y marcado de los estratos de excavación. **C.** Delimitación de la zona de excavación y cernido de tierra de los distintos estratos. **D.** Estratos excavados y muestreados para la selección de muestras de tres tipos de raíz para cuantificación de CLas por qPCR. Un total de 24 bloques de suelo fueron muestreadas (6 x 4) y 111 muestras qPCR-analizadas.

GCG -3') (Li *et al.*, 2006). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95 °C por 3 min, 40 ciclos de 95 °C por 5 s; 59 °C por 40 s y 59 °C por 35 s. Las muestras que reportaron 8 a 35 ciclos de termociclaje (*Ct* por sus siglas en inglés de *Cycle threshold*) rebasando el umbral de fluorescencia óptimo, fueron consideradas *positivas*. Las muestras con *Ct* >35 se consideraron *negativas*.

Para la cuantificación del número de copias genómicas de CLas en las muestras, se generó una curva de calibración externa. Se utilizó el fragmento del gen 16S rDNA clonado en un plásmido (PGEM-T ® Promega®), el cual se purificó y cuantificó por uv-espectrofotometría (Nanodrop 1000) con diluciones seriales; éstas se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica para estimar la concentración de CLas, $y = 41.95 - 3.37 (\text{Log Starting Quantity})$ ($r^2=1$, eficiencia 97.9 %), $y = Ct$, que calcula el número de copias del gen 16S ADNr. Para reducir efecto de variabilidad y con fines de comparación de la concentración de ADN se realizó una dilución a 20 ng μL^{-1} .

Parametrización y análisis epidemiológico. Los resultados de qPCR se integraron en una matriz epidemiológica temporal. Se construyeron curvas epidémicas de CLas usando la cuantificación de copias CLas (*Q*) y el número de muestras positivas con respecto a intervalos mensuales de tiempo. Por curva epidémica de CLas se parametrizaron tres ventanas de ocurrencia, el Y_i como el inicio del muestreo ($t = 0$), caracterizado por periodo de estrés hídrico *pre*-lluvias; el Y_{max} como el periodo de mayor carga de inóculo en planta; y Y_f como fase final de la curva epidémica de CLas.

La parametrización se realizó por árbol, rama y región distal o proximal de colecta. Mapas vectoriales geoespaciales de *Q* y $\log(Q)$ interpoladas por ventana de ocurrencia epidémica (Y_i , Y_{max} y Y_f) y por estructura de raíz (*soporte*, *conducción* y *absorción*) se procesaron y analizaron en Golden Surfer® v10. Análisis estadísticos ANOVA y comparación de medias por Tukey ($p = 0.05$) se realizaron en SAS 9.4.

RESULTADOS

Detección y cuantificación de CLas en dosel. Se realizaron siete colectas mensuales entre mayo y diciembre, 2014. Un total de 1540 muestras se analizaron por qPCR, 784 del árbol 2 (A2) y 756 del árbol 3 (A3) (Cuadro 1). El 41.9 % (646 positivas) de total de muestras analizadas fueron positivas a CLas con umbral de $Ct = 22.7 - 35$. La positividad no tuvo diferencias estadísticas entre árbol ($p = 0.48$), A3 obtuvo 52.2 % (337 positivas, $Ct = 22.7 - 34.9$) y A2 47.8 % (309 positivas, $Ct = 23.4 - 35$). A nivel intra-rama de colecta, la positividad en muestras distales fue ligeramente mayor con 50.9 % (329) respecto a muestras proximales que tuvieron 49.1 % de incidencia (317). La positividad de CLas en zona distal de rama no fue diferente en los árboles confinados (A2 = 164; A3 = 165) ($p = 0.97$). En zona proximal de la rama, A3 tuvo mayor número de muestras positivas (173) que zona distal (164) ($p = 0.48$). En A2, el comportamiento de incidencia fue menor pero similar en tendencia (distal = 165; proximal = 144) ($p = 0.42$). La incidencia relativa de CLas por árbol fue mayor en A3 con 49.5 % en comparación con 39.4 % de A2 ($p = 0.68$). Por zona de colecta, A2 tuvo positividad de 53.4 y 46.6 % distal y proximal, respectivamente. La incidencia en A3 fue mayor en la zona proximal con 51.3 vs. 48.7 % en distal (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación del número de muestras positivas por qPCR en siete muestreos mensuales realizados en árboles HLB-asintomáticos de Valencia *C. sinensis* (A2 y A3) durante mayo – diciembre y distribución de carga de inóculo (CLas) por sección proximal y distal de ramas seleccionadas y marcadas para monitoreo bacteriano.

Fecha Colecta	Muestras positivas ^x (Log[Q CLas]) ^y		Número de muestras positivas por sector de rama (Log[Q CLas])			
			Distal		Proximal	
	A2	A3	A2	A3	A2	A3
27 may.	3 (0.5 ± 0.8)	12 (1.0 ± 1.2)	9 (1.2 ± 1.3)	0 (0.4 ± 0.8)	3 (0.5 ± 0.8)	3 (0.8 ± 0.9)
27 jun.	71 (2.0 ± 1.3)	87 (2.6 ± 0.8)	45 (2.7 ± 0.8)	38 (2.3 ± 1.1)	33 (1.8 ± 1.4)	42 (2.6 ± 0.8)
25 jul.	65 (2.0 ± 1.4)	73 (2.8 ± 1.8)	33 (0.5 ± 0.8)	36 (2.2 ± 1.4)	29 (1.7 ± 1.4)	40 (2.8 ± 1.8)
31 ago.	36 (0.5 ± 0.8)	78 (2.4 ± 1.2)	35 (2.2 ± 1.1)	19 (1.4 ± 0.8)	17 (1.2 ± 0.9)	43 (2.6 ± 1.3)
02 oct.	75 (2.0 ± 1.3)	45 (1.5 ± 1.1)	17 (1.4 ± 1.2)	39 (2.3 ± 1.3)	36 (1.7 ± 1.3)	28 (1.7 ± 0.1)
06 nov.	54 (1.3 ± 0.7)	29 (1.3 ± 0.8)	19 (1.5 ± 0.7)	31 (1.4 ± 0.7)	23 (1.2 ± 0.7)	10 (1.1 ± 0.8)
10 dic.	5 (0.3 ± 0.6)	13 (0.9 ± 0.7)	6 (0.9 ± 0.8)	2 (0.3 ± 0.6)	3 (0.3 ± 0.6)	7 (0.9 ± 0.7)
Total	309 (1.3 ± 1.2) (39.4 %)	337 (1.8 ± 1.4) (44.5 %)	165 (1.5 ± 1.3) (53.4 %)	164 (1.8 ± 1.3) (48.7 %)	144 (1.2 ± 1.2) (46.6 %)	173 (1.8 ± 1.4) (51.3 %)
A2+A3	646 (1.6 ± 1.3) (41.9 %)		329 (1.6 ± 1.3) (50.9 %)		317 (1.5 ± 1.3) (49.1 %)	

^xMuestras totales por fecha: 112 árbol A2 y 108 árbol A3. Total = 1540 muestras en el periodo experimental.

^yNúmero promedio de copias log-CLas ± desviación estándar.

La carga de inóculo estimada por el promedio de copias de CLas para 646 muestras positivas fue 1.6 (±1.3) *log*, equivalente a 109 copias/reacción de 100 mL (rango en número de copias 6.3 a 68 870.7). Los resultados mostraron que CLas no fue estadísticamente diferente ($p = 0.33$) entre muestras positivas de la zona distal (1.6 *log*-CLas) respecto de proximal (1.5 *log*-CLas). Por árbol, A3 mostró significativamente ($p < 0.00001$) mayor carga de inóculo 1.8 (±1.3) *log*-CLas, pero sin diferencia entre zona proximal y distal (1.8 *log*-CLas; $p = 0.8$). El A2 tuvo menor carga de inóculo 1.3 (±1.2) *log*-CLas respecto a A3 ($p < 0.00001$). En muestras de la zona distal, se observó mayor carga de inóculo 1.5 (±1.3) *log*-CLas que la proximal con 1.2 (±1.2) *log*-CLas ($p = 0.04$) (Cuadro 1).

Fluctuación temporal de CLas en dosel. En general, el periodo de mayor incidencia estadísticamente significativa fue entre junio – octubre con 37 – 87 muestras positivas ($p < 0.0001$), acumulando 82 % (530) del total de muestras positivas. En A2, con excepción de

agosto donde se detectaron 36 muestras (17.7 %), el rango de muestras positivas fue 54 – 75 entre junio – noviembre acumulando 94 % del total ($p = 0.02$) (Figura 4). Las muestras positivas en mayo (3) y diciembre (5) se asociaron a periodos de baja ocurrencia ($p = 0.88$). En contraste, el A3 tuvo entre julio – agosto el periodo más inductivo ($p = 0.0003$) con promedio mensual de 73 – 87 muestras positivas, acumulando 70.1 % del total. En este árbol, octubre – diciembre fue un periodo de decrecimiento constante ($p > 0.05$) en la detección de muestras positivas pasando de 45 a 13, respectivamente. En A3, mayo y diciembre fueron nuevamente los periodos significativamente menos inductivos y con menor incidencia de muestras positivas ($p = 0.95$) (Figura 4A). La fluctuación de CLas no mostró diferencias contrastantes entre árboles ($p = 0.5$) o periodos de colecta ($p > 0.72$), ubicándose entre 1.6 y 3.5 log-CLas, para meses mayo (A2) y julio (A3).

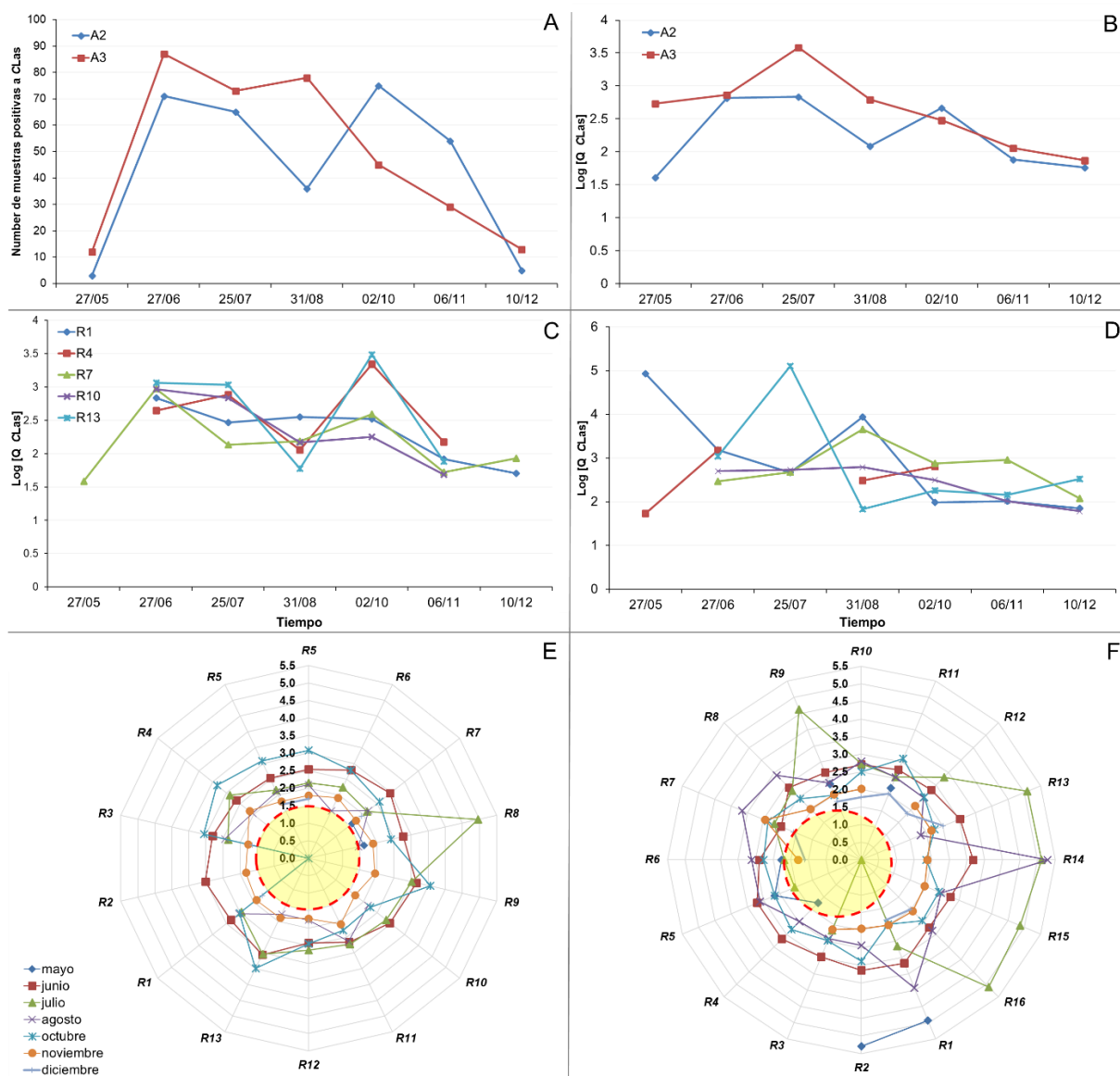


Figura 4. A. Número de muestras qPCR CLas positivas por árbol (A2 y A3) detectadas en siete fechas de muestreo mensuales de Valencia *C. sinensis* / *C. aurantium* HLB-asintomáticos. B. Fluctuación temporal de la concentración bacteriana en 21 ramas totales de los árboles A2 y A3. C-D. Fluctuación temporal de CLas a nivel de rama. Se muestra el ejemplo de 5/13 ramas para A2 (C) y 5/16 para A3 (D). E-F. Fluctuación temporal de CLas por rama y árbol A2 (E) y A3 (F). Círculo punteado en rojo muestra el umbral (log-CLas) mínimo para cuantificación de copias de CLas en muestras positivas.

A2 tuvo concentración de 1.6 – 2.8 log-CLas, con mayor concentración (2.1 – 2.8 log-CLas, $p = 0.02$) asociada al periodo de mayor detectabilidad de muestras positivas (junio – octubre). En A3, la carga de inóculo fue 1.8 – 3.5 log-CLas, mayor con respecto a A2 ($p = 0.07$), y con un pico principal en julio equivalente a 3.5 log. La carga de inóculo tuvo tendencia decreciente similar a la positividad, reduciendo carga de CLas de 2.7 a 1.8 entre octubre y diciembre (Figura 4B).

La mayor variabilidad en la fluctuación de CLas en dosel se encontró a nivel de rama (R) y zona de colecta proximal-distal (Cuadro 1 y Figura 4). En general, A2 mostró homogeneidad en la distribución de CLas por rama con diferencias significativas marginales ($p = 0.07$), con rango de 1.5 (mayo, R7) y 2.8 (octubre, R13). En ramas R4 y R13 ocurrió en el ‘pico’ significativamente de mayor carga de inóculo de 3.4 log ($p < 0.02$), diametralmente opuestas en el dosel. El resto de las ramas tuvo tendencia decremental de CLas entre agosto – diciembre ($p = 0.0001$) (Figura 4C). En A3, aunque evidenció alta variabilidad en la fluctuación de CLas en dosel de *C. sinensis*, no fue significativamente diferente a nivel de ramas ($p = 0.15$). Las ramas variaron de concentración de CLas entre 1.7 log (mayo, R4) y 5.1 log (julio, R13). La carga de inóculo en ramas de A3 fue significativamente mayor ($p = 0.0001$) entre mayo – agosto con 2.4 – 5.1 log-CLas, y entre septiembre – diciembre menor y estable con 1.7 – 2.9 log-CLas (Figura 4D).

Respecto a la fluctuación temporal en periodo de mayor positividad a nivel de rama, A2 mostró mayor homogeneidad en la distribución de CLas ($p = 0.07$). A excepción de la R8 en julio (4.9 log-CLas) y R1 en octubre (0 log-CLas), el resto de las ramas tuvo comportamiento homogéneo. La intensidad de carga bacteriana fue variable por periodos de colecta, junio (2.4 – 3.1 log), julio (2.1 – 4.9 log) y octubre (2.2 – 3.6 log) se detectó la mayor carga de inóculo ($p = 0.0001$) (Figura 4E). En A3, la fluctuación temporal de CLas por rama fue asimétrica, variable y con mayor concentración respecto al A2 ($p = 0.002$). En general, en A3 la carga bacteriana en julio fue significativamente alta, fluctuante y concentrada en R9 (4.6 log) y el sector de R13 – R16 con 4.9 – 5.1 log ($p = 0.0001$). Un mes después, en agosto fue mayor en R1 (3.9 log-CLas), R7 – R8 (3.4 – 3.6 log-CLas) y R14 (5.3 log-CLas) ($p = 0.0001$). El resto de las ramas tuvo una distribución de CLas constante y homogénea, respectivamente (Figura 4F).

Distribución y direccionalidad espacial de CLas en dosel en tres momentos epidémicos. El análisis de la fluctuación temporal en muestras positivas de carga bacteriana de CLas en tres momentos epidémicos (Y_i , Y_{max} y Y_f), permitió identificar un proceso asincrónico de Y_{max} y una distribución heterogénea a nivel de dosel entre A2 y A3 (Figura 5). Por momento epidémico, en Y_i (mayo) la distribución del número de copias de CLas se concentró en el tercio medio e inferior del dosel en A2 (0.08 – 47.2 copias) y A3 (6.8 – 38 842 copias). La simulación *intra* dosel mostró direccionalidad-dispersión de CLas sureste-noroeste con la mayor carga de inóculo (21 187 – 38 842 copias), mientras la movilidad bacteriana en el resto del dosel fue menor y aleatoria (6.8 – 21 187 copias) (Figura 5A). En A2, la carga de inóculo con mayor intensidad se ubicó en el centro del tercio-medio del dosel con direccionalidad noreste-suroeste (20 – 47.2 copias), y en el resto del dosel osciló entre 0.08 – 19.9 copias de CLas (Figura 5B). El Y_{max} para A2 y A3 ocurrió en octubre y julio, respectivamente, posterior al inicio de lluvias (382.2 mm acumulados). La carga de inóculo mantuvo tendencia mayor en A3 (216 – 216 767 copias) con respecto al A2 (9.2 – 4 239 copias) (Figura 5C-D). Durante este momento epidémico, la mayor concentración y distribución de CLas se ubicó principalmente en el tercio medio-superior del dosel de A3 (65 889 – 216 767 copias) y A2 (1 416 – 4 239 copias).

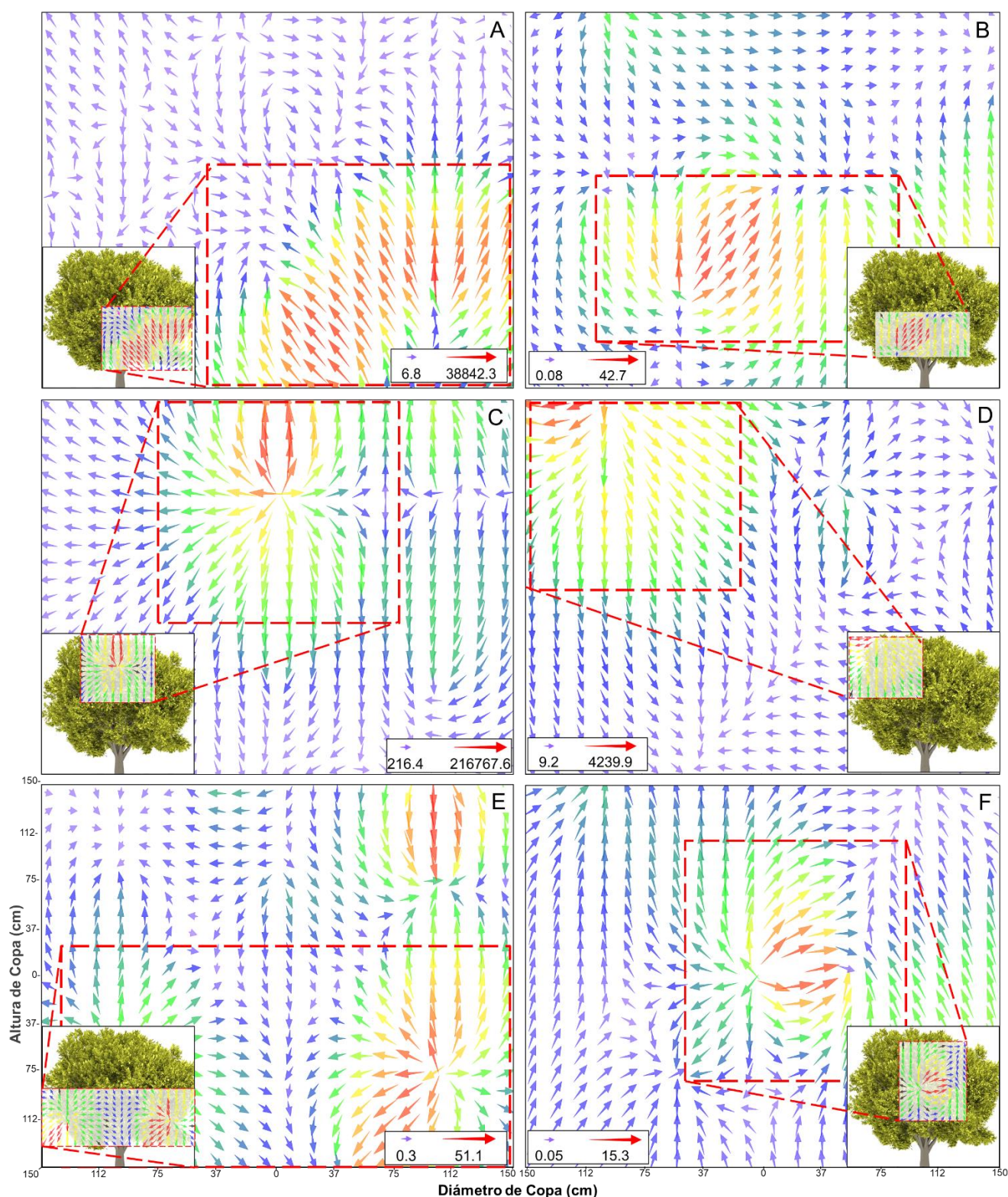


Figura 5. Distribución y movimiento espacial de CLAs en dosel de árboles HLB-asintomáticos Valencia *C. sinensis* / *C. aurantium*. A, C, y E. Mapa de interpolación vectorial que representa la carga bacteriana y la direccionalidad para tres momentos epidémicos: Y_i (mayo), Y_{max} (julio) e Y_f (diciembre), respectivamente, en árbol A3; y B, D, y F para el árbol A2. El tamaño y color de los vectores muestran la tendencia espacial y direccional de carga de inóculo. En cuadros inferiores, el número de copias se relaciona con el tamaño y el color de las flechas como medida de referencia. La direccionalidad del vector simula el movimiento bacteriano en dosel. Los recuadros punteados resaltan mayor concentración espacial de CLAs.

En A3, la movilidad de CLas fue multidireccional con predominancia en carga de inóculo este-oeste (Figura 5C). En A2, el efecto en la direccionalidad de la mayor concentración de CLas fue principalmente sur-este (Figura 5D). La finalización del ciclo epidémico (Y_f) ocurrió en diciembre en A2 (0.05 – 15.3 copias) y A3 (0.3 – 51.1 copias) (Figura 5F). Con menor carga bacteriana, Y_f mostró concordancia en la distribución de CLas con respecto a los sectores de mayor inóculo en Y_i . En A3, los tercios inferior-superior mostraron distribución multidireccional en el dosel con tendencia sur-noreste en el inferior (15.5 – 51.1 copias) y este-oeste en superior (19.6 – 49.3 copias) (Figura 5E). Por el contrario, en A2 la mayor concentración de CLas (5.9 – 15.3 copias) se asoció al tercio medio, directamente vinculado con carga de inóculo en Y_i , mientras que la direccional en el sector de mayor concentración tuvo tendencia este-oeste. En el resto del dosel la carga de inóculo (0.05 – 5.8 copias) presentó una tendencia aleatoria con distribución multidireccional en el dosel (Figura 5E).

Detección y cuantificación espacial de CLas en raíz. Se analizaron por qPCR 111 muestras totales de raíz divididas en *soporte* (30), *conducción* (42) y *absorción* (39), para cuatro estratos de profundidad de suelo (cm) y seis estratos en la zona de goteo del dosel de *Citrus sinensis*. La positividad de CLas en muestras de raíz fue de 38.7 % con umbrales de $C_t = 32.7 - 35$, mientras que el comportamiento por tipo de *soporte*, *conducción* y *absorción* fue 47.6, 15.4 y 38.7 %, respectivamente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número y porcentaje de muestras positivas en árbol A3 a *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *C. sinensis* / *C. aurantium* respecto al tipo de raíz, cuatro profundidades de suelo y seis distancias a partir de tronco.

Tipo raíz	Profundidad (cm)	Distancia a partir de tronco (cm)						Total	% ^x	% ^y	% ^z
		80	120	160	200	240	280				
Absorción (n=39)	20	0/3	0/3	.	0/3	0/3	0/3	0/15	0	0	0
	50	.	0/3	.	0/3	0/3	.	0/9	0	0	0
	80	.	.	0/3	0/3	.	0/3	0/9	0	0	0
	110	.	.	.	3/3	.	3/3	6/6	100	13.9	5.4
Conducción (n=42)	20	1/3	1/3	1/3	0/3	3/3	2/3	8/18	44.4	18.6	7.2
	50	.	2/3	3/3	3/3	0/3	.	8/12	66.7	18.6	7.2
	80	.	.	2/3	1/3	.	0/3	3/9	33.3	6.9	2.7
	110	.	.	.	1/3	.	.	1/3	33.3	2.3	0.1
Soporte (n=30)	20	2/3	1/3	.	1/3	4/6	.	8/15	53.3	18.6	7.2
	50	.	3/3	.	.	2/3	.	5/6	83.3	11.6	4.5
	80	.	.	.	1/3	.	0/3	1/6	16.6	2.3	0.1
	110	.	.	.	3/3	.	.	3/3	100	6.9	2.7
Total		3/9	7/18	6/12	13/33	9/21	5/18	43/111	-	100	38.7
%^v		2.7	6.3	5.4	11.7	8.1	4.5	38.7			
%^w		33.3	38.9	50.0	39.4	42.9	27.8	100			

^vIncidencia de muestras positivas de CLas a diferentes distancias del tronco relativa al total de muestras analizadas ($n = 111$).

^wIncidencia de muestras positivas de CLas a partir de diferentes distancias del tronco relativa al subtotal de muestras positivas ($n = 43$).

^xIncidencia de CLas en muestras por estratos de profundidad y tipo de raíz. ^yIncidencia de muestras positivas de CLas por estratos de profundidad y tipo de raíz relativa al total de muestras analizadas ($n = 111$). ^zIncidencia de muestras positivas de CLas por estratos de profundidad y tipo de raíz relativa al subtotal de muestras positivas ($n = 43$). Color representa positividad de muestras, siendo verde negativo y rojo la máxima detección.

Respecto a la positividad relativa por estrato de profundidad, raíces de *soporte* y *absorción* a 110 cm tuvieron 100 % de incidencia (9/9). En raíces de *soporte* y *conducción*, 44.4 – 83.7 % de incidencia relativa se encontró a 20 y 40 cm de profundidad, lo cual corresponde a 4.5 – 7.2 % de las muestras totales analizadas ($n = 111$) y 11.6 – 18.6 % de muestras positivas ($n = 43$) (Cuadro 2). La mayor incidencia en muestras colectadas respecto a la distancia del tronco fue 58.1 % principalmente asociada a la zona entre 80 y 120 cm. En general, a 80 - 220 cm se encontró un gradiente de positividad decreciente de

55.6 a 26.7 % y un incremento a 77.8 % en 280 cm del tronco asociado específicamente a una profundidad de 20 cm. En términos relativos, a 80 y 120 cm de distancia del tronco se registró la mayor incidencia con 55.6 y 47.6 %, respectivamente (Cuadro 2).

Con relación a la concentración y distribución de CLas por tipo de raíz, en *soporte* y *conducción* se encontró mayor concentración 38.3 (± 47.5) y 43.4 (± 24.4) copias, respectivamente, estadísticamente diferente ($p < 0.0001$) con respecto a raíces de *absorción* (9.5 ± 7.2 copias CLas) (Figura 6A). La carga bacteriana de CLas entre 80 – 120 cm de distancia de tronco fue estable (22.6 – 33.7 copias), mientras que 160 – 280 cm evidenció un gradiente decremental de 42.9 a 10.8 copias ($p < 0.0001$) (Figura 6B).

En muestras analizadas por profundidad, el gradiente fue incremental significativamente mayor ($p = 0.04$) de 20 a 110 cm en concentración bacteriana y variabilidad 45.2 – 82.8 copias (Figura 6C). Integrando los tres factores, en general raíces de *conducción* fueron de mayor incidencia (Cuadro 2) y concentración de CLas de 1.3 – 84.3 copias, principalmente entre 20 – 40 cm del tronco principal ($p = 0.01$) y 80 – 160 cm de profundidad ($p > 0.05$) (Figura 6D). En raíces de *absorción*, CLas estuvo asociada a 110 cm del tronco en combinación con 80 – 120 cm de profundidad con 39.8 – 64.1 copias ($p > 0.05$). En el caso de raíces de *soporte* tuvieron un comportamiento variable con 3.2 – 144.5 copias, donde una muestra colectada a 110 cm de la zona de goteo de *C. sinensis* y 80 cm de profundidad se encontró la concentración estadísticamente más alta con 144.5 copias CLas ($p = 0.001$) (Figura 6D).

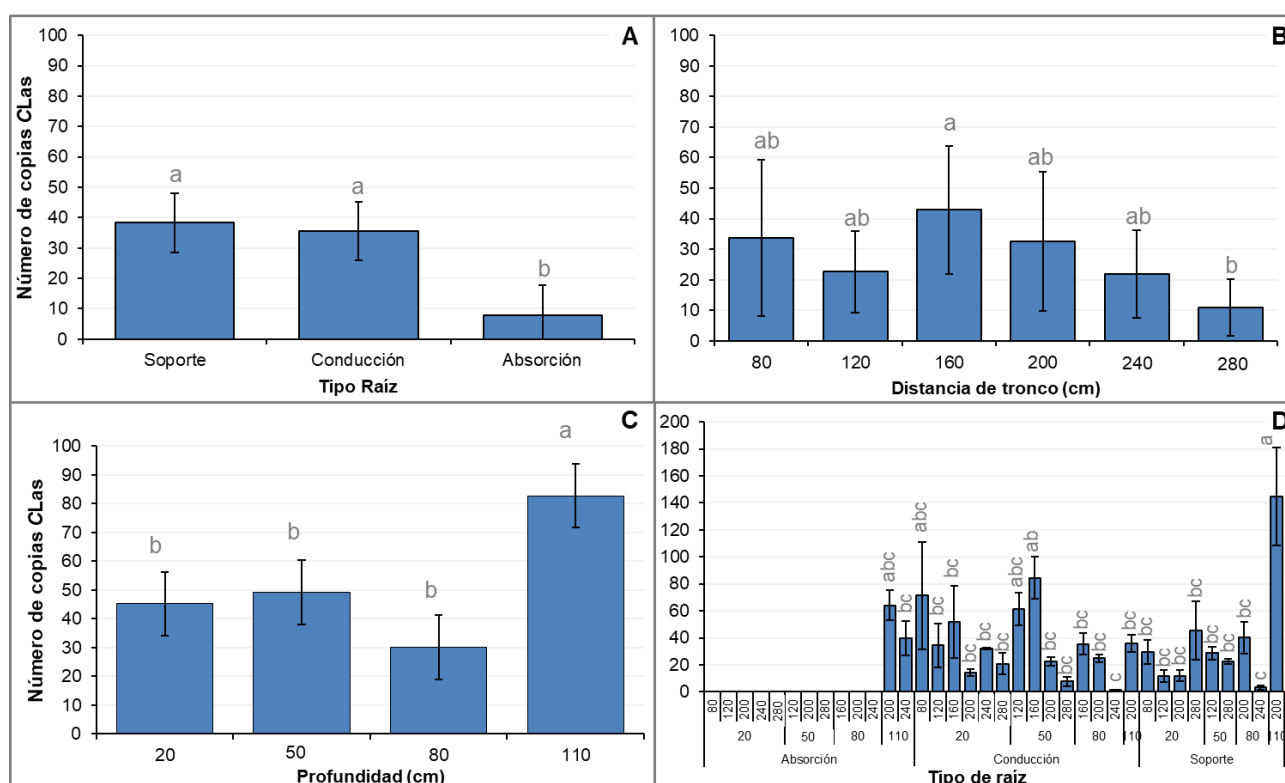


Figura 6. A. Cuantificación de CLas por tipo de raíz: *soporte*, *conducción* y *absorción* en árbol A3 HLB-asintomático *C. sinensis* / *C. aurantium*. B. Cuantificación de CLas en seis distancias seccionales del tronco entre 80 y 240 cm. C. Cuantificación de CLas en cuatro profundidades seccionales de suelo entre 20 – 110 cm. D. Cuantificación de CLas integrando los tres factores tipo de raíz, distancia y profundidad. Barras de desviación estándar con letras distintas fueron estadísticamente diferentes mediante ANOVA y comparación de medias Tukey ($p = 0.05$).

Simulación espacial geoestadística de CLas. La concentración de CLas en el sistema raíz mostró diversos escenarios de distribución y movilidad estimado a través del modelo tridimensional de muestreo (Figura 3 y 7). En general, se evidenciaron dos secciones de mayor intensidad y concentración de carga de inóculo (80 – 144 copias), asociadas a la zona media de goteo (140-220 cm) y estratos de profundidad medios (40-80 cm) (Figura 7A). El modelo de interpolación geoestadística evidenció el gradiente de mayor intensidad (144 copias) entre secciones de raíces de *conducción* en la zona media de goteo del dosel. Un segundo gradiente de alta intensidad (> 80 copias CLas) se ubicó en zona de raíces de *absorción* (Figura 7A).

La simulación de movilidad de CLas mediante el análisis geoestadístico *Grid Vector Map* mostró que las dos secciones de concentración bacteriana se asociaron a patrones de movilidad diferenciados por el tipo de raíz colonizada. La primera, entre 140 – 160 cm a partir del eje principal y 20 – 65 cm de profundidad, asociada a incidencia en raíces de *conducción* ($d = 6.38$ mm). En esta sección el patrón de movilidad con mayor carga de inóculo (tamaño y color-rojo del vector) fue hacia distancia de tronco entre 160 – 200 cm

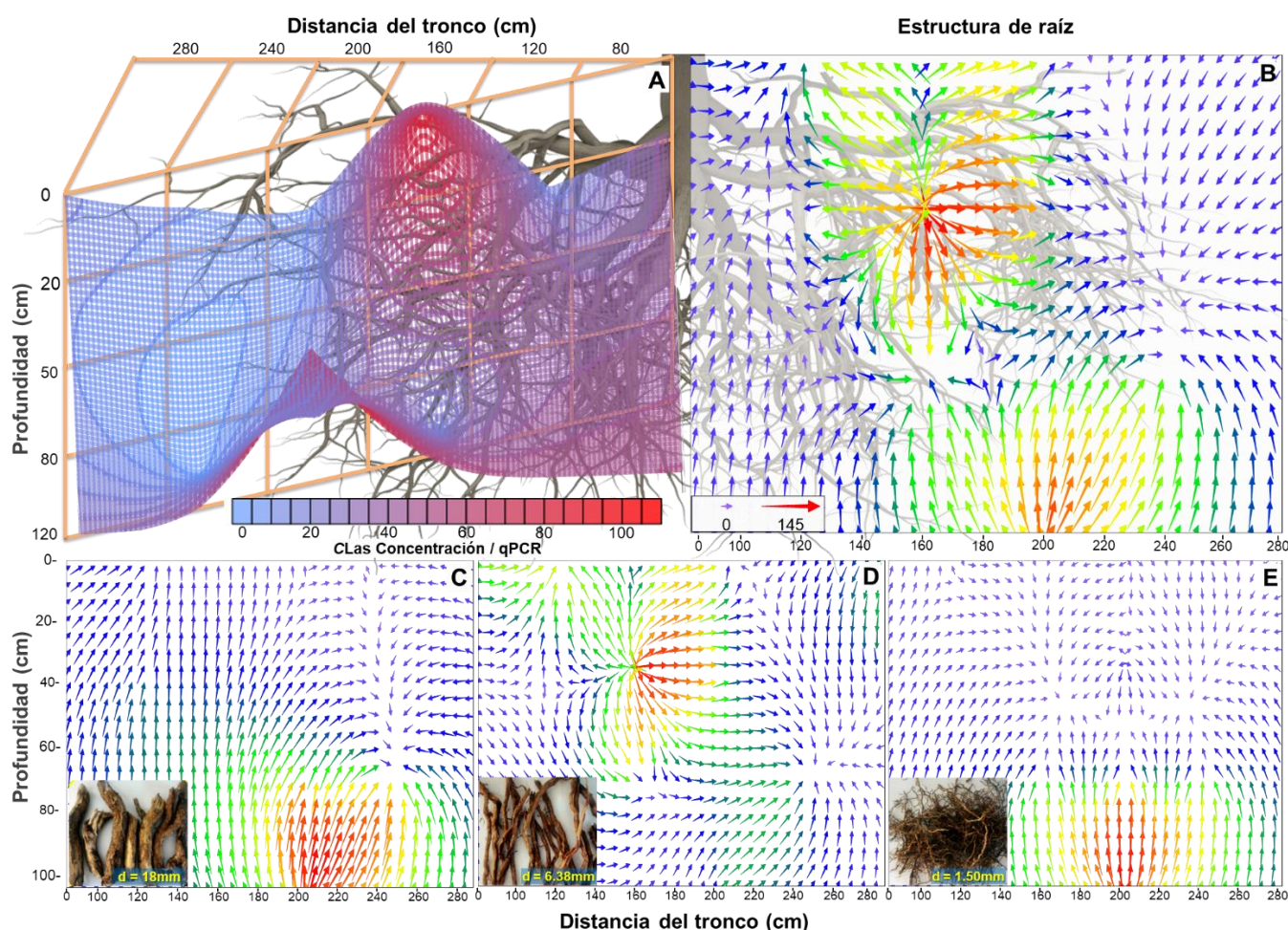


Figura 7. A. Análisis geoestadístico 3D wireframe de la cuantificación de CLas asociado a un sistema de muestreo 3D-seccional en raíces de *soporte* ($d = 18$ mm), *conducción* ($d = 6.3$ mm) y *absorción* ($d = 1.5$ mm) en árbol A3 Valencia *C. sinensis* / *C. aurantium*. **B-E.** Análisis geoestadístico *Grid Vector Map* para representar la movilidad de la carga bacteriana de CLas en muestras de raíces totales (B), *soporte* (C), *conducción* (D) y *absorción* (E). Los vectores muestran en tamaño y color la carga de inóculo por región del tipo de raíz analizada. La direccionalidad y magnitud (tamaño) del vector simula la movilización e intensidad de movilidad de CLas a nivel de la estructura de raíz. En el cuadro inferior (B), el número de copias de bacterias se relaciona con el tamaño y el color de flechas como medida de referencia.

y profundización de suelo 40 – 60 cm. La segunda, entre 180 – 240 cm y 80 -110 cm, respectivamente, asociada a raíces de *soporte* ($d = 18$ mm) y de *absorción* ($d = 1.5$ mm) con patrón de movilidad ascendente desde estratos de profundidad de suelo en 110 cm hacia 20-40 cm (Figura 7B).

La incidencia en raíces de *soporte* mostró gradiente decreciente de CLas (30 – 118 copias) a profundidad mayor de 40 cm hacia zona de 220 cm respecto al tronco de *C. sinensis*. La mayor carga e intensidad de CLas (90 – 114 copias) estuvo asociada a 70 – 110 cm de profundidad y 200 – 250 cm de distancia del tronco (Figura 7C). La carga de CLas en raíces de *conducción* mostraron patrones de movilidad variables y aleatorios a nivel de estratos y profundidad, sugiriendo mayor capacidad de movilidad y menor restrictividad por amplia distribución en la estructura radicular. El gradiente de carga bacteriana (30 – 71 copias) para raíces de *conducción* se asoció principalmente entre 20 – 60 cm profundidad y 80 – 160 cm de distancia de tronco, con una extensión de menor intensidad y carga de inóculo (20 – 25 copias) entre 80 – 100 y 200 – 240 cm (Figura 7D). En raíces de *absorción*, la mayor carga de inóculo y capacidad de movilidad se asoció a estratos de profundidad de suelo entre 80 – 110 y 80 – 280 cm de distancia del tronco, sorpresivo ya que las raíces de *absorción* tienen en general mayor predominancia en la superficie y periferia del sistema radicular. La mayor carga de inóculo (31 – 70 copias) se concentró a 160 – 240 cm de distancia. El patrón de movilidad tuvo direccionalidad ascendente con predominancia a partir de 110 cm hacia el estrato 60 cm de profundidad. Con menor carga bacteriana (5 – 18 copias), se evidenció patrón de dispersión periférico convergiendo en la zona media de profundidad y de distancia del tronco (Figura 7E).

DISCUSIÓN

La hipótesis de la condición asintomática de HLB asociada a un prolongado *periodo de incubación* (PI) en respuesta a infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) en árboles de naranja Valencia (*C. sinensis* / *C. aurantium*), con edad superior a 30 años en huertos comerciales del Centro Golfo de México, se analizó mediante la concentración y distribución espacio-temporal de la bacteria en tejido del dosel y tres tipos de raíz en condiciones de confinamiento. Durante siete colectas mensuales y un total de 1 540 muestras analizadas no se reportaron síntomas visuales a pesar de 39.4 – 49.5 % de muestras qPCR positivas detectadas con una distribución relativamente generalizada en dosel y en ramas proximales (50.9 %) y distales (49.1 %). La ausencia de síntomas por al menos 7 meses contrasta con la incubación de CLas por dos a cinco meses en plantas de 1.5 años de *C. sinensis* / *C. limonia* después de infección inducida con *Diaphorina citri* infectiva (Canale *et al.*, 2020). No obstante, la incubación asociada a una condición presintomática de HLB es variable en cítricos, y se ha reportado de meses a años, dependiendo de la densidad poblacional del vector, carga de inóculo, edad de planta, injerto / portainjerto, detección en huertos comerciales o traspatios, entre otros factores epidemiológicos (Gottwald *et al.*, 2010). Sin embargo, varios de estos reportes han sido estimaciones empíricas o sin un sustento experimental.

En este trabajo, el *periodo de incubación* se refiere al tiempo que transcurre entre una infección exitosa vía *D. citri* y la expresión de los primeros síntomas visibles de HLB. En este caso, debido el novel experimento desarrollado para una condición asintomática natural en campo, la infección no pudo ser controlada y por tanto se desconoce el tiempo-0. Sin embargo, la premisa fue que la concentración bacteriana debía ser incremental y exhibir gradualmente una colonización crónica-sistémica dosel-raíz en caso de que la condición asintomática fuera transitoria y se explicara por un prolongado *periodo de*

incubación. El objetivo no fue estimar el *periodo de incubación*, pero si analizar este evento como causal de un retraso en la expresión de síntomas.

Síntomas visibles iniciales característicos en follaje, posteriores a la infección de CLas, también son variables en función de especie citrícola, condiciones climáticas, carga-fuente de inóculo y otros factores (Canale *et al.*, 2020; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2009). En una condición HLB crónica-asintomática, el criterio de síntoma no es un parámetro de referencia para determinar *PI*, principalmente cuando se ha demostrado en condiciones de dispersión natural, en huertos comerciales, alta concentración bacteriana (1×10^9 copias) y bajos umbrales de adquisición de CLas por *D. citri* (2 694 copias (G. Mora, No publicado). Complementariamente, el *PI* es parte del proceso de patogénesis *sensu* Vanderplank, concebido para infecciones locales con síntoma-signo visible (p.e. fungosas), no sistémicas como corresponde a CLas. En consecuencia, el *periodo de latencia (PL)* en CLas, entendido clásicamente como el *tiempo* que requiere un patógeno para producir nuevo inóculo a partir del primer síntoma visible en planta, se ha inferido indirectamente con la capacidad de *D. citri* para adquirir CLas e infectar nuevas plantas, resultando en periodos inferiores hasta de 1-mes respecto a *PI* (Canale *et al.*, 2020). Esto implica que *PL* no es sucesivo y sincrónico con *PI sensu* Vanderplank y que la comprensión de la patogénesis en infecciones sistémicas requiere otro marco histológico-mecanístico (Esquivel-Chávez, 2016; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). En esta investigación *PI* fue inferido a través de la dinámica de inóculo, *i.e.* multiplicación y distribución en el hospedero.

Aunque estas restricciones metodológicas y biológicas evidencian la complejidad para explicar mediante *PI* la condición HLB-asintomática, un aspecto crítico es determinar si la dinámica espacio-tiempo de la concentración bacteriana puede determinar una condición asintomática crónica, *i.e.* permanente, o transitoria a una eventual expresión de síntomas visibles. Por ejemplo, la intensidad en la expresión sintomática de HLB, y consecuentemente de la concentración, se ha asociado a variables ambientales (Temperatura y HR) y migración de la bacteria hacia la raíz (Bassanezi *et al.* 2013b). La concentración de CLas en regiones cálidas de San Pablo, Brasil, se relacionó con temperatura y HR alta (Lopes *et al.*, 2009). En S.J. Acateno, la mayor incidencia de muestras (37 – 87 positivos) y concentración de CLas (2.1 – 3.5 log) estuvo asociado a variación térmica importante de 19.1 – 27.6 °C ($\bar{x} = 24.4 \pm 3.0$) y moderada a alta humedad 74.4 – 98.7 HR ($\bar{x} = 89.2 \pm 9.9$). Por el contrario, en la fase de disminución de CLas estuvo principalmente asociado con menor rango de temperaturas de 12.1 – 23.6 °C ($\bar{x} = 19.1 \pm 2.6$) que con humedad (79.7 – 98.9 HR, $\bar{x} = 92.0 \pm 7.5$).

En general, a nivel de árbol se observó efecto temporal de CLas en dosel ($p < 0.0001$) teniendo las muestras de verano significativamente mayor concentración (2.1 – 3.5 log-CLas) comparado con primavera y otoño-invierno (≤ 1.8 log-CLas). Notar, sin embargo, que temperaturas en S.J. Acateno no son extremas y el efecto de verano puede ser inverso en otras latitudes. Otros trabajos han reportado diferencias entre estaciones, validando la fluctuación estacional de la bacteria en condiciones de huertos comerciales sintomáticos (Sauer *et al.*, 2015). Esto indica que la temperatura está implicada en cambios de concentración de CLas pero no explica un efecto asintomático por *PI*.

La premisa de atribuir la condición asintomática a *PI* prolongado, inferido por carga de inóculo incremental en tiempo y espacio dosel-raíz también se descartó en esta investigación. La concentración de CLas fue fluctuante en el rango de 1.5 – 3.5 log de copias/reacción 100 mL durante el periodo de evaluación (rango = 6.3 - 68 870.7 copias).

Estudios de CLas mediante infección controlada en plantas jóvenes de *C. sinensis* Pera sugieren estabilidad en detectabilidad visual con aproximadamente en $5 \log$ células g^{-1} , 40 días después de la inoculación y un umbral mínimo de $2.6 \log$ ($2.6 - 3.6 \log$ CLas) para expresión de síntomas en brotes nuevos, 24 días después de inoculación (Cui *et al.*, 2022; Alves *et al.*, 2021). Aunque en este trabajo los resultados superaron ese umbral durante al menos dos periodos mensuales continuos y hasta cuatro discontinuos, la condición asintomática se mantuvo.

A nivel sector-rama o sector-dosel, la concentración de CLas tuvo diferencias estadísticas ($p = 0.07$). Las ramas mostraron carga de inóculo heterogéneas entre sectores alcanzando hasta $2.4 - 5.1 \log$ -CLas. Este efecto ha sido registrado en Brasil en árboles adultos en campo en distintos cultivares de *C. sinensis* con variaciones contrastantes de Ct's en cuadrantes del dosel (Sauer *et al.*, 2015), evidenciando alta variabilidad de la bacteria *intra*-planta y la necesidad de estudios adicionales sobre los procesos de infección y colonización de CLas en planta (Raiol-Junior *et al.*, 2020), sobre todo en condiciones de huertos comerciales.

La parametrización epidémica de carga de inóculo (Y_i , Y_{max} y Y_f) a partir de las curvas de concentración de CLas validó la fluctuación temporal de la bacteria, no incremental ni gradual sobre dosel, fortaleciendo el nulo o bajo efecto de PI en la condición HLB-asintomático. La mayor positividad y concentración de CLas (Y_{max}) se encontró asociada al sector medio-superior del dosel. El inóculo en la fase inicial (Y_i) y final epidémica (Y_f) mostró movilidad hacia sectores inferior e inferior-superior, respectivamente. El efecto de mayor concentración en sector medio-superior puede estar asociada la emisión de brotes y renovación de tejido (Raiol-Junior *et al.*, 2020), los cuales pueden ser reservorios asintomáticos de la bacteria y fuente de adquisición - dispersión por medio del insecto-vector. Lee y colaboradores (2015) simularon que en aproximadamente un año hasta 12 000 individuos de *D. citri* / árbol pueden ser infectivos (Lee *et al.*, 2015).

A nivel de reconocimiento, la expresión temporal y espacial de *efectores* de CLas (p.e., CLIBASIA_03875, CLIBASIA_04800, CLIBASIA_05640, etc.) también debe considerarse en la colonización temprana, supresión de genes de tolerancia y la supervivencia de largo plazo, potencialmente involucrados en una condición asintomática o presintomática (Shi *et al.*, 2019).

La condición asintomática asociada al movimiento de CLas hacia la raíz es un factor biológico y epidemiológico de relevancia (Bassanezi *et al.* 2013b). Estudios recientes han documentado movimiento de CLas hacia tejidos de raíz y foliares recién desarrollados (Raiol-Junior *et al.*, 2020). Sin embargo, el factor raíz ha sido poco estudiado directamente en campo por priorizar el diagnóstico visual-síntoma, por métodos genómicos PCR, y la dificultad del muestreo en raíz debido a su estructura compleja en *Citrus* spp. (Alves *et al.*, 2021).

La detección de CLas en raíz de plantas jóvenes puede preceder una condición no detectable y asintomática en follaje, y que puede ser hasta tres veces más eficiente que en hojas (Xie *et al.*, 2021; Braswell *et al.*, 2020; Raiol-Junior *et al.*, 2020; Graham *et al.*, 2014; Johnson *et al.*, 2013). No fue el caso en estos resultados favoreciendo la idea que PI no está implicado mecanísticamente. En general, CLas tuvo una distribución generalizada en dosel - raíz. La probabilidad de detectar CLas en raíces vs. tejido no fue estadísticamente diferente (38.7 vs. 41.9 %, $p < 0.05$), pero si hubo diferencias en la carga de inóculo ($p = 0.0001$) con $9 - 43.4$ respecto a $6.3 - 68\ 870.7$ copias en tejido foliar asintomático. También hubo efecto del tipo de raíz con 47.6 , 15.4 y 38.7 % de muestras positivas de un total de

111, y 38.3, 43.4 y 9.5 copias promedio de CLas para raíces de *soporte*, *conducción* y *absorción*, respectivamente ($p < 0.0001$). Por el contrario, Raiol-Junior y colaboradores (2020), los cuales trabajaron en condiciones controladas con plantas de 60 cm de Pera *C. sinensis* / *C. volkameriana*, las raíces jóvenes (*absorción*) tuvieron la mayor carga bacteriana después de poda en raíz.

Es importante remarcar que los resultados de la dinámica de CLas es inherente a la interacción inóculo inicial - planta sin influencia de fuentes externas de inóculo ya que eventos de reinfección vía *D. citri*, y eventual transmisión de otras variantes CLas asociadas con mayor agresividad (G. Mora, No publicado), se eliminó mediante el confinamiento de árboles.

Otros factores, como el efecto densidad vector, variante de CLas y combinación injerto / portainjerto no pude ser obviado en estudios de una condición asintomática. Por ejemplo, en S.J. Acateno, Puebla se registraron bajas poblaciones de *D. citri* con 2.9 – 3.2 insectos promedio / trampa pegajosa amarilla en los periodos con mayor detección de muestras positivas en dosel, significativamente menor a regiones de alta densidad, como en Tecmán, Colima con 18.3 – 56.1, y Martínez de la Torre, Veracruz 5.4 – 7.9 *D. citri* promedio / trampa (SIMDIA, 2022). Análogamente, condiciones crónico - endémicas desde 2010 en México (Mora-Aguilera *et al.*, 2014), la carga bacteriana ha sido muy alta superando las 2.5×10^7 copias de CLas en *C. aurantifolia* / *Macrophylla* o *Volkameriana* en Colima o Michoacán (De la Rosa, 2016), contra un rango de 6.3 - 68 870.7 copias en este trabajo.

Otra consideración en condición presintomática es la modificación estructural del floema en tejido infectado p.e., acumulación almidón, engrosamiento de la pared celular, expresión de genes de calosa y proteínas (p.e., CALLOSE SYNTHASE7 y PHLOEM PROTEIN2), resultando en el taponamiento diferencial de haces vasculares según tipo de cítrico / portainjerto más que a carga de inóculo o movimiento intra-planta de CLas (Cavichioli *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2021; Achor *et al.*, 2020). Este comportamiento se reportó en parénquima en empalizada y esponjoso de tejido sintomático de *C. aurantifolia* en comparación con *C. sinensis*. En particular el área y anchura de floema en tejido asintomático de plantas infectadas fue 1.9 veces menor en naranjo dulce (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Estos resultados proporcionan evidencia de que *PI* no explica la condición asintomática de CLas en el entorno productivo de S.J. Acateno. Adicionalmente, refuerza la importancia de diseñar estrategias para establecer sistemas eficientes de vigilancia-monitoreo para detección de CLas en condiciones asintomáticas crónicas o transitorias. Así mismo, generan nuevas perspectivas de manejo con base en la comprensión genética de la interacción planta-patógeno e implicaciones epidémicas. Este es el primer trabajo que analiza *PI* mecanísticamente, a nivel dosel – raíz, las detecciones iniciales de HLB-asintomático en México en árboles productivos adultos de Valencia *C. sinensis* / *C. aurantium* en condición de campo.

CONCLUSIONES

Este trabajo es parte de una amplia investigación conducida por el grupo CP-LANREF, enfocada a analizar por primera vez la condición asintomática de HLB en Valencia Naranja dulce / N. agrio. Específicamente, este trabajo demostró que un *periodo de incubación* prolongado no determina la condición asintomática con base en la variación espacio-

temporal de la concentración de *Candidatus Liberibacter asiaticus* a nivel dosel - raíz planta.

La condición positiva asintomática de CLas se mantuvo a través de siete evaluaciones mensuales de tejido aéreo y una evaluación exhaustiva de raíz. La concentración fue fluctuante, no incremental, con diferencias estadísticas según estacionalidad o tipo de raíz. La distribución relativamente homogénea de CLas en dosel del árbol y la presencia de esta bacteria en raíces de *soporte*, *conducción* y *absorción* sugiere una infección crónica de mediano-largo plazo, por lo que la ausencia de síntomas visibles puede tener otras causas de tipo fisiológico, histológico o genético inherente al patógeno. Adicionalmente, la eventual ocurrencia de síntomas en árboles asintomáticos debe considerar la reinfección de variantes y cambios en la estructura poblacional del patógeno. Estos resultados contribuyen a fortalecer estrategias de sistemas de vigilancia-monitoreo por estacionalidad, sectores dosel-rama y tipo de tejido con mayor probabilidad de detección aun en condición asintomática y generan nuevas perspectivas de manejo de CLas.

Limitaciones

Este trabajo se realizó durante siete meses en árboles de Naranja dulce / N. agrio comerciales de edad superior a 30 años de la región Centro-Golfo de México. Se desconoce el efecto de otras condiciones productivas y climáticas en una eventual condición asintomática de HLB.

Conflicto de interés. No implicados en este trabajo.

Financiamiento

A SECIHTI (antes CONACYT) por la beca a estudiantes de posgrado y a SENASICA-DGSV por el financiamiento para realizar esta investigación. Al COLPOS por las facilidades financieras y logísticas

Agradecimientos

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Puebla por el apoyo logístico y técnico. A los productores de cítricos de San José Acateno. Puebla por las facilidades para realizar la investigación. A Miguel Trujano Guzmán por su apoyo en muestreo de suelo y enjaulado de árboles. Al equipo CP-LANREF por la entusiasta participación técnica-científica.

Contribución de los autores

GMA, concepción, análisis e interpretación de resultados, redacción final; GAS, análisis estadístico y redacción; VMB y VLB, muestreo y análisis PCR; MAGE, interpretación de resultados y revisión del documento; PRG, concepción y gestión financiera y operativa.

REFERENCIAS

- Achor D, Welker S, Ben-Mahmoud S, Wang C, Folimonova SY, *et al.* 2020. Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement and sieve-pore plugging in Citrus sink cells. *Plant Physiology* 182(2):882–891. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01391>
- Alves MN, Cifuentes-Arenas JC, Raiol-Junior LL, Ferro JA and Peña L. 2021. Early population dynamics of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in susceptible and resistant genotypes after inoculation with infected *Diaphorina citri* feeding on young shoots. *Frontiers in Microbiology* 12: 683923. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.683923>
- Bassanezi RB, Montesino LH, Gimenes-Fernandes N, Yamamoto PT, Gottwald TR, *et al.* 2013a. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of Huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0314-RE>

- Bassanezi RB, Belaquer JJ and Montesino LH. 2013b. Frequency of symptomatic trees removal in small citrus blocks on citrus huanglongbing epidemics. *Crop protection* 52: 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.05.012>
- Bassanezi RB, Busato LA, Bergamin Filho A, Amorim L and Gottwald TR. 2005. Preliminary spatial pattern analysis of huanglongbing in São Paulo, Brazil. Pp: 341–55 *In*: Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA: IOCV. <https://iocv.ucr.edu/publications/proceedings#proceedings-16-2005-conference>
- Braswell WE, Park JW, Stansly PA, Kostyk BC, Louzada ES, *et al.* 2020. Root samples provide early and improved detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Citrus. *Scientific Reports* 10:16982. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74093-x>
- Canale MC, Komada KMA and Lopes JRS. 2020. Latency and incubation of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus after vector inoculation. *Tropical Plant Pathology* 45: 320–326. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00311-1>
- Cavichioli TM, Curtolo M, Cristofani-Yaly M, Rodrigues J and Coletta-Filho HD. 2022. Temporal analysis of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in *Citrandarin* genotypes indicates unstable Infection. *Agronomy* 12(10):2566. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102566>
- Cui X, Zhang J, Liu Y, Luo X, Deng X, *et al.* 2022. Comparison of different grafting methods on the effect of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' transmission. *Fruit Research* 2:15 <https://doi.org/10.48130/FruRes-2022-0015>
- De la Rosa AA. 2016. Distribución de la Carga de Inóculo Regional de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri* en Tres Escenarios Citrícolas de México. Colegio de Postgraduados Montecillo. Tesis MC. 101 p. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/4144>
- Esquivel-Chávez F. 2016. Dinámica de la Concentración Bacteriana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* y su Efecto en la Expresión Sintomática e Histológica en Cítricos Agrios y Dulces e Implicaciones en el Potencial de Inóculo. Colegio de Postgraduados. Tesis DOC. 165 p.
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, *et al.* 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-78. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30225072002>
- Esquivel-Chávez F. 2011. Análisis Histológico y Epidemiológico de Limón Mexicano y Limón Persa Asociados a Síntomas del HLB (Huanglongbing). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco Edo. de México. 56 p.
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Gutiérrez-Espinosa MA, *et al.* 2017. Diffusion model for describing the regional spread of Huanglongbing from first-reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101:1129-1127. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, *et al.* 2015. Yield loss caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Persian lime, in Yucatan Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 33: 195-210. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61242145005>
- Gottwald T, Luo W, Riley T and Parnell S. 2014. Edge effect and Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology* 1: 126-127. <https://doi.org/10.5070/C411024824>
- Gottwald TR. 2010. Current epidemiological understanding of Citrus Huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48: 119-139. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114418>
- Graham JH, Johnson EG, Gottwald TR and Irey MS. 2014. *Candidatus Liberibacter asiaticus* causes damage to citrus fibrous roots before visual decline of Huanglongbing-infected citrus trees. *Journal of Citrus Pathology* 1(1). <http://dx.doi.org/10.5070/C411025122>
- Johnson EG, Wu J, Bright DB and Graham JH. 2013. Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology* 63(2): 290-298. <https://doi.org/10.1111/ppa.12109>
- Lee JA, Halbert SE, Dawson WO, Robertson CJ, Keesling JE, *et al.* 2015. Asymptomatic spread of Huanglongbing and implications for disease control. *Plant Health* 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. *Journal of Microbiological Methods* 66:104-115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Lopes SA, Bertolini E, Frare GF, Martins EC, Wulff NA, *et al.* 2009. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanus*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. *Phytopathology* 99:301–306. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1031-RE>
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JI, Velázquez-Monreal JJ, Flores-Sánchez JL, *et al.* 2014. Current situation and prospects for management of citrus HLB. *Mexican Journal of Phytopathology* 32(2): 108-119. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61243856003>

- Raiol-Junior LL, Cifuentes-Arenas JC, de Carvalho EV, Girardi EA and Lopes SA. 2020. Evidence that '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' moves predominantly toward new tissue growth in Citrus plants. Plant Disease 105:34-42. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0158-RE>
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Orozco-Sánchez M, Medina-Urrutia VM, *et al.* 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su dispersión en el estado de Colima, México. Revista Chapingo Serie Horticultura 19(1): 15-31. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60926253002>.
- Sauer AV, Zanutto CA, Requena NPT, Machado MA, Bock CH, *et al.* 2015. Seasonal variation in populations of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' in citrus trees in Paraná State, Brazil. Plant Disease 99(8): 1125-1132. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-14-0926-RE>
- SENASICA. 2022. Primer Informe Semestral 2022 Campaña de Protección Fitosanitaria para Plagas de los Cítricos. 10 p. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/757852/1er_Informe_semestral_2022_Plagas_de_C_tricos.pdf
- SENASICA. 2015. Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Informe Julio, 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26771>
- SENASICA. 2012. Cambio de estatus fitosanitario de HLB en Veracruz. <https://www.gob.mx/senasica/prensa/cambio-de-estatus-fitosanitario-de-hlb-en-veracruz>
- SENASICA. 2010. Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing. 2ª Edición. Dirección General de Sanidad Vegetal, México. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=9364>.
- Shi Q, Pitino M, Zhang S, Krystel J, Cano LM, *et al.* 2019. Temporal and spatial detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* putative effector transcripts during interaction with Huanglongbing-susceptible, -tolerant, and -resistant citrus hosts. BMC Plant Biology 19:122. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1703-4>
- SIMDIA. 2022. Sistema de Monitoreo de *Diaphorina*. DGSV-SENASICA. <http://www.siafeson.com/simdia/>
- Xie Z, Zhao K, Long J, Zhen L, Zou X, *et al.* 2021. Comparative analysis of Wanjincheng orange leaf and root responses to '*Candidatus liberibacter asiaticus*' infection using leaf-disc grafting. Horticultural Plant Journal 7(5): 401-410. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.01.007>