



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

USO DE SILICIO E INDUCTORES DE RESISTENCIA EN RELACIÓN A HUANGLONGBING (HLB) EN LIMÓN PERSA (*Citrus latifolia*) Y LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*)

Tesis

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biosistemática y
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Presenta

Elizabeth Fernández Rivera

Zapopan, Jalisco

Octubre 2015



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

USO DE SILICIO E INDUCTORES DE RESISTENCIA EN
RELACIÓN A HUANGLONGBING (HLB) EN LIMÓN PERSA
(*Citrus latifolia*) Y LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*)

Tesis

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de
Recursos Naturales y Agrícolas

Presenta

Elizabeth Fernández Rivera

Director

Dr. Víctor Manuel Medina Urrutia

Co-Director

Dr. Gil Virgen Calleros

Zapopan, Jalisco

Octubre de 2015



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

USO DE SILICIO E INDUCTORES DE RESISTENCIA EN RELACIÓN A HUANGLONGBING (HLB)
EN LIMÓN PERSA (*Citrus latifolia*) Y LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*)



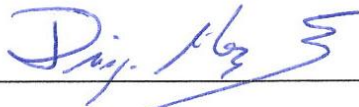


Por

Elizabeth Fernández Rivera

Elizabeth F.R.

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos
Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

 _____	<u>30/09/15</u>
Dr. Víctor Manuel Medina Urrutia Director de Tesis e integrante del jurado	Fecha
 _____	<u>30/09/15</u>
Dr. Gil Virgen Calleros Co-Director de Tesis e integrante del jurado	Fecha
 _____	<u>30/09/15</u>
Dr. Diego Raymundo González Eguiarte Asesor del Comité Particular e integrante del jurado	Fecha
 _____	<u>30/09/15</u>
Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández Asesor del Comité Particular e integrante del jurado	Fecha
 _____	<u>30/09/15</u>
Dr. Eduardo Salcedo Pérez Integrante del jurado	Fecha

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Agrícola y en el Laboratorio de Marcadores Moleculares, en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, ubicado en Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac, Zapopán, Jal, México, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Medina Urrutia y Co-dirección del Dr. Gil Virgen Calleros y la asesoría del Dr. Diego González Eguiarte y la Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández El presente trabajo formó parte de los Proyectos: **“Comportamiento agronómico de árboles de Limón Persa (*Citrus latifolia*) infectados por HLB”** y del proyecto **“Transmisión de HLB en Limón Persa y control con nutrientes minerales, inductores de defensa y antibióticos”**. Los cuales son financiados por FORDECYT.

RESUMEN

USO DE SILICIO E INDUCTORES DE RESISTENCIA EN RELACIÓN A HUANGLONGBING (HLB) EN LIMÓN PERSA (*Citrus latifolia* Tanaka) Y LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia* Christm Swingle)

Elizabeth Fernández Rivera

Director Víctor Manuel Medina Urrutia Co-Director Gil Virgen Calleros

Actualmente el 100% de los predios de Limón Mexicano en Colima y 40% en Limón Persa en Jalisco presentan síntomas de daño por el HLB de los cítricos. Para evitar el colapso de la citricultura en esos regímenes, se requiere urgentemente alternativas de manejo que permitan prolongar la vida productiva de las plantaciones. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de los fertilizantes convencionales solos o en combinación con Silicio así como el empleo de inductores de resistencia sobre la incidencia y severidad de HLB y rendimiento. Se evaluaron concentraciones de fertilizantes convencionales más la adición de silicio en Limón Persa y diferentes concentraciones de silicio en Limón Mexicano. Para determinar el avance de HLB, utilizando una escala de daño que considera niveles desde 1 a 6, donde 1 = sano y 6 = planta muerta. Estudios que se corroboraron mediante PCR's, así pues se determinó el rendimiento, y calidad, así como cambios fisiológicos en la planta. Los resultados mostraron que en los tratamientos silicio-selenio en ambos cultivos obtuvieron incrementos en cosecha de hasta el 100% y la calidad se elevó de manera significativa. Lo cual se puede concluir que el uso de silicio incrementó el rendimiento, redujo la severidad y retrasó el desarrollo de la enfermedad, incrementando el tamaño del floema, permitiendo una mejor asimilación de nutrientes por parte de la planta.

DEDICATORIA

A mi madre: Berenice Rivera Alcalá, por su esfuerzo máximo para cumplir mis metas, por sus consejos, por su ejemplo, su apoyo incondicional para llegar hasta donde estoy porque a pesar de todo siempre conté con su ayuda y por todo el amor que me ha demostrado todos estos años. Te quiero mamá.

A mi hermana: Brenda Fernández, por todas las experiencias compartidas así como su apoyo incondicional.

A Mi abuelita Rosario Alcalá, a mi tía abuela Margarita Alcalá que siempre han sido un pilar fundamental para la construcción de mi familia y mi formación profesional.

A mi tío Santiago Sánchez, quien siempre ha estado muy cerca para apoyarme y brindarme los mejores consejos en el ámbito profesional

A mis tías Martha Rivera, Rosalba Rivera y mi tío Julio Rivera quienes siempre me han apoyado en todos los ámbitos para poder llegar a donde estoy.

A los maestros que influyeron en mí de manera considerable, con sus enseñanzas, consejos, apoyo y dirección. Creando en mí una persona de crecimiento, con ideales prósperos que quizá contribuyeron a trazar mi rumbo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta donde estoy, por ser mi fortaleza en momento de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad de Guadalajara por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

Al Dr. Gil Virgen Calleros por permitirme integrarme en sus proyectos, por compartir su experiencia, así como sus conocimientos, por su ejemplo de empeño, dedicación y pasión en su trabajo para la obtención de nuevos conocimientos y por su paciencia al dirigir esta tesis.

Al Dr. Víctor Manuel Medina Urrutia, por compartir sus conocimientos así como sus experiencias adquiridas, así como sus asesorías en el proceso de la investigación.

A la Dra. Carla Sánchez por permitirme integrarme en su laboratorio y colaborar intensamente en la realización de este proyecto.

Al Dr. Diego González porque siempre estuvo al pendiente en cada proceso académico de la maestría así como su tiempo dedicado para el desarrollo de este trabajo. Así como al Dr. Eduardo Salcedo por la paciencia en la asesoría de esta tesis.

Al Dr. Lawrence Datnoff y la Dra. Brenda Tubaña por abrirme las puertas de su país, estado y laboratorio y permitirme obtener sus conocimientos así como sus experiencias adquiridas, brindándome la oportunidad de interactuar con más personas involucradas en investigaciones relacionadas.

Un agradecimiento especial a la Dra. Lucila Méndez Morán y al Dr. Pedro Castruita Domínguez, por acogerme en su laboratorio y colaborar en la realización de este proyecto con la facilitación de sus equipos, así como su tiempo y paciencia para brindarme conocimientos.

A todos los que de alguna manera hicieron posible este trabajo: Aldo Lomas, Jesús Valencia, Néstor Orozco y David Sánchez, por acompañarme siempre a realizar los experimentos en campo a pesar de todas las adversidades; Karen Malanco, Carmen Espitia, Marisela Sandoval, por apoyarme en los experimentos de área molecular así como apoyo incondicional en todos los ámbitos, mil gracias amigas.

A toda mi familia que siempre estuvo al pendiente de mí. y todas las personas que han creído en mí y que con cariño me han alentado a seguir adelante.

A todas mis amigas de la universidad, principalmente por brindarme sus palabras de aliento para seguir adelante. María de Jesús Quezada, Mariela Orozco, Osiris Serrano y Mónica Limón.

A Elizabeth Martínez y Abdíl Zamora por ser buenas amigas y estar ahí cuando más la necesito; por compartirme sus experiencias y brindarme todo su apoyo.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Página
RESUMEN	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE DEL CONTENIDO	IV
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE CUADROS	IX
1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
2. ANTECEDENTES	- 4 -
2.1 Importancia económica de los cítricos	- 4 -
2.1.1 Descripción botánica de las especies de Limón	- 4 -
2.2 Principales enfermedades que afectan a los cítricos	- 6 -
2.3 Huanglongbing de los cítricos (HLB)	- 6 -
2.3.1 Síntomas del HLB en cítricos	- 7 -
2.3.2 Etiología	- 9 -
2.3.3 Epidemiología	- 9 -
2.3.4 Distribución mundial y nacional de la enfermedad	- 11 -
2.3.5 Transmisión del HLB	- 13 -
2.4 Manejo de HLB	- 14 -
2.4.1 Control Biológico y Químico del vector	- 14 -
2.4.2 Control químico de <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	- 15 -
2.5 Control cultural de enfermedades	- 15 -
2.5.1 Nutrición Mineral	- 16 -
2.6 Silicio	- 17 -
2.6.1 Mecanismo de acción	- 17 -
2.6.2 Beneficios del silicio	- 18 -
2.7 Inductores de Resistencia	- 20 -
2.7.1 Defensa de las plantas a patógenos	- 20 -
2.7.1.1 Defensas preformadas	- 21 -

2.7.1.2 Defensas Inducidas	- 21 -
2.7.2 Inducción de resistencia	- 22 -
3. JUSTIFICACIÓN.....	- 24 -
4. HIPÓTESIS.....	- 25 -
5. OBJETIVOS	- 26 -
5.1 Objetivo general.....	- 26 -
5.2 Objetivos específicos	- 26 -
6. MATERIALES Y MÉTODOS	- 27 -
6.1. Experimento 1. Efecto de la fertilización convencional y adición de silicio.....	- 27 -
6.1.1 Sitio Experimental Clima, localidad y características de suelo.	- 27 -
6.1.2 Materiales	- 29 -
6.1.3 Diseño de la investigación.....	- 30 -
6.1.3.1 Tratamientos en Limón Persa	- 30 -
6.1.3.2 Tratamientos en Limón Mexicano	- 31 -
6.1.4 Variables evaluadas.....	- 31 -
6.1.4.1 Índices de severidad de HLB	- 31 -
6.1.4.2 Diagnóstico de HLB en árboles de Limón.	- 32 -
6.1.4.2.1 PCR	- 32 -
6.1.4.3 Determinación de silicio en tejido foliar de árboles de Limón Persa.	- 34 -
6.1.4.4 Análisis foliar de árboles de Limón Persa.....	- 34 -
6.1.4.5 Determinación de Rendimiento en campo de Limón Persa	- 35 -
6.1.4.6 Determinación de rendimiento en campo de Limón Mexicano.....	- 35 -
6.1.4.6.1 Crecimiento del árbol.....	- 35 -
6.1.4.7 Calidad interna de frutos en Limón Persa.	- 36 -
6.1.4.8 Contenido de Clorofila en hojas de Limón Persa y Mexicano	- 37 -
6.1.5 Análisis estadísticos	- 39 -
6.1.5.1 Limón Persa.....	- 39 -
6.1.5.2 Limón Mexicano.....	- 39 -
6.2 Experimento 2. Aplicación de Inductores de resistencia en dos etapas y dos condiciones en Limón Persa	- 40 -
6.2.1 Manejo del experimento.....	- 40 -

6.2.1.1 Árboles de seis años establecidos en condiciones de campo.....	- 40 -
6.2.1.2 Árboles de seis meses bajo condiciones de invernadero	- 40 -
6.2.2 Diseño de la investigación	- 41 -
6.2.2.1 Tratamientos de inductores de resistencia en árboles de 6 años en campo.....	- 41 -
6.2.2.2 Tratamientos de inductores de resistencia en árboles de 6 meses en invernadero.....	- 41 -
6.2.3 Variables evaluadas.....	- 41 -
6.2.4 Análisis Estadísticos.....	- 42 -
6.2.4.1 Limón Persa de seis años establecido en campo.	- 42 -
6.2.4.2 Limón Persa de seis meses establecido en invernadero.	- 42 -
7. RESULTADOS	- 43 -
7.1. Experimento 1. Efecto de la fertilización convencional y adición de silicio.....	- 43 -
7.1.1 Índices de síntomas de HLB en el follaje en Limón Persa.....	- 43 -
7.1.2 Diagnóstico molecular de HLB en árboles de Limón Persa	- 44 -
7.1.3 Determinación de silicio de tejido foliar en Limón.....	- 46 -
7.1.4 Contenido de macro y micronutrientes en las hojas de Limón Persa.....	- 47 -
7.1.5 Efectos de los tratamientos de fertilización en el rendimiento y calidad externa de fruta de Limón Persa.	- 49 -
7.1.6 Efecto de tratamientos de fertilizantes en la calidad interna de frutos.	- 51 -
7.1.7 Contenido de Clorofila en hojas de Limón Persa.....	- 52 -
7.1.8 Condición del tejido e histología de hojas conservadas en refrigeración.	- 53 -
7.1.9 Limón Mexicano	- 55 -
7.1.9.1 Índices de HLB en el follaje de Limón Mexicano.	- 55 -
7.1.9.2 Determinación de Rendimiento.....	- 56 -
7.1.9.3 Contenido de Clorofila en hojas de Limón Mexicano.....	- 57 -
7.2. Experimento 2. Efecto en la aplicación de inductores de resistencia en árboles de Limón Persa con/sin síntomas de HLB en campo.	- 58 -
7.2.1 Índices de HLB en follaje en árboles de Limón Persa en condiciones de campo- 58 -	
7.2.2 Aplicación de inductores de resistencia para el control de HLB en condiciones de invernadero.	- 59 -
7.2.2.1 Inducción de expresión de síntomas de HLB en hojas.....	- 59 -

7.2.2.2 Incidencia de HLB a partir de la expresión de la enfermedad.....	- 60 -
8. DISCUSIÓN	- 63 -
9. CONCLUSIONES	- 69 -
10. LITERATURA CONSULTADA	- 70 -
Apéndice 1.....	- 77 -
Apéndice 2.....	- 80 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas característicos de HLB en Hojas de dos especies de Limón	8 -
Figura 2. Síntomas de HLB en árboles con daño severo A) Limón Persa B) Limón Mexicano.....	9 -
Figura 3. Distribución de la bacteria <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> en especies de cítricos. Tomado de Li, <i>et al.</i> , 2009.....	10 -
Figura 4. Distribución mundial de HLB en cítricos. Tomado de SAGARPA,2012.....	12 -
Figura 5. Distribución del HLB en México. Tomado de SENASICA, 2014.....	13 -
Figura 6. Técnica empleada para la toma de datos de clorofila en árboles de Limón.	38 -
Figura 7. Gel de agarosa al 2% de PCR anidado mostrando la presencia de la bacteria <i>Ca. L. asiaticus</i> en árboles de Limón Persa con distintos tratamientos.	46 -
Figura 8. Apariencia e Histología de hojas de Limón Persa después de 30 días de refrigeración A) Hojas de árboles testigo B) Hojas de árboles de Limón tratados con fertilizante y silicio, C) Nótese el floema más reducido en hojas testigo. D) Tamaño del Floema de hojas de Limón contratamiento fertilizante y silicio.	54 -
Figura 9. Dinámica de severidad de HLB en Hojas de árboles de Limón Mexicano tratados con fertilización convencional y aplicación de silicio en diferentes dosis.	55 -
Figura 10. Severidad de HLB en Limón Persa en condiciones de invernadero aplicado con diferentes inductores de resistencia antes y después de inoculado mediante injerto.	61 -
Figura 11. Porcentaje de árboles aplicados con diferentes inductores de resistencia antes y después de inoculados mediante injerto que expresan síntomas de HLB en los distintos días de evaluación. .-	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de los suelos donde se realizaron los experimentos de Limón Persa en Jalisco y Limón Mexicano en Colima. Predio "La Difunta" San Martín Hidalgo (SMH) Jal., y "Santa Marta" Cofradía de Hidalgo (CH), Tecomán, Col., 2013.	29 -
Cuadro 2. Tratamientos de fertilización en Limón Persa en San Martín Hidalgo, Jal.	30 -
Cuadro 3. Dosis de fertilización convencional y silicio aplicados a árboles de Limón Mexicano (Tecomán, Colima).	31 -
Cuadro 4. Escala de daño para la evaluación de la severidad en Limón causada por HLB.....	32 -
Cuadro 5. Productos empleados en Limón Persa para Inducir resistencia al HLB en árboles establecidos en campo.	41 -
Cuadro 6. Inductores de resistencia aplicados en árboles de Limón Persa previamente inoculados con HLB bajo condiciones de invernadero.	41 -
Cuadro 7. Índice de severidad de HLB en Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilización (San Martín, 2012-2014).	44 -
Cuadro 8. Porcentaje de incidencia de HLB en árboles de Limón Persa que recibieron distintos tratamientos de fertilización. HLB determinado en laboratorio mediante la técnica de PCR.	45 -
Cuadro 9. Contenido (%) de silicio en hojas de árboles de Limón Persa con diferentes dosis de fertilizante durante un periodo de 35 días.	47 -
Cuadro 10. Contenido de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) de hojas de árbol de Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilización, San Martín Hidalgo, Jal., 2014.	48 -
Cuadro 11. Contenido de Manganeseo (Mn), Zinc (Zn) y Hierro (Fe) de hojas de árbol de Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilización. San Martín Hidalgo, Jal., 2014.	49 -
Cuadro 12. Rendimiento de árboles de Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilizante, Marzo, 2013.	49 -
Cuadro 13. Rendimiento de árboles de Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilizantes. Abril, 2013.	50 -
Cuadro 14. Rendimiento de Limón Pera obtenido de diferentes tratamientos de fertilizantes. Mayo, 2014.	51 -
Cuadro 15. Evaluación de las variables de Calidad Interna.	52 -
Cuadro 16. Contenido de Clorofila en hojas de Limón Persa (Unidades spad) sometidas a distintos tratamientos de fertilizante en tres épocas.	53 -
Cuadro 17. Rendimiento de árboles de Limón Mexicano con diferentes tratamientos de silicio.	56 -
Cuadro 18. Contenido de Clorofila (Unidades Spad) en hojas de árboles de Limón Mexicano con tratamientos de fertilización convencional y silicio.	57 -
Cuadro 19. Severidad de HLB en árboles de Limón Persa con Inductores de resistencia en condiciones de campo.	58 -
Cuadro 20. Severidad de HLB en plantas de Limón Persa tratadas con Inductores de Resistencia 10 días antes y 10 días después de la inoculación de yemas infectadas bajo condiciones de invernadero, 2014.	60 -

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial los cítricos se cultivan en más de cien países de los cinco continentes, por lo que constituyen el grupo de frutales más importante. El grupo de cítrico que incluye las especies de naranjas, limones, mandarinas y limas abarcan una franja geográfica que se extiende 40⁰ de latitud norte y sur del Ecuador. Sin embargo, la mayor parte de la producción cítrica se localiza dentro de 30⁰ latitud norte y sur del Ecuador. La India ocupa el primer lugar de producción de limas y limones con 2,629,200 toneladas, que representan un 19% de la producción total. A este país le sigue México con 1,891,400 toneladas, lo que constituye el 14% del total y en el sitio tercero esta Argentina con 1,113,380 toneladas, lo cual equivale al 8% de la producción mundial (FAOSTAT,2012).

En México el Limón Persa (*Citrus latifolia*), se cultiva bajo condiciones de clima tropical en diversas regiones del Golfo de México tales como Veracruz, Yucatán y Tabasco. Esta especie también se cultiva en regiones tropicales y subtropicales de la costa del pacífico, con un aceptable nivel tecnológico, preferentemente en los estados de Colima, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Oaxaca (Peters, 2002). La superficie total cultivable en México es de alrededor de 75, 691 108 has, las cuales producen aproximadamente 861,163.19 toneladas anuales (SIAP, 2014).

En el estado de Jalisco la superficie de Limón Persa se incrementó notablemente en los últimos seis años y a la fecha se reportan 8,500 has plantadas en varios municipios principalmente con el clima subtropical (CESAVEJAL, 2014). El rendimiento anual se estima en alrededor de 24,000 toneladas, con una derrama económica aproximada de 144 millones de pesos. Esta agroindustria genera una gran cantidad de empleos para diversas actividades en campo, en empaadoras, la industria, transporte, etc., de la cual dependen cerca de 6,000 empleos directos e indirectos (SAGARPA, 2012). También el Limón Mexicano *Citrus aurantifolia* Christm (Swingle), juega un papel muy importante en México. Los principales estados productores de estas especies son Colima, Michoacán, Oaxaca y Guerrero, localizados en las costas del pacífico Mexicano. Colima con 25,014

has, produce el 45% de la producción nacional distribuidas principalmente en los municipios de Tecomán, Armería, Manzanillo y Coquimatlan.

Sin embargo estas especies se encuentran amenazadas por diferentes enfermedades siendo la más importante el HLB de los cítricos. El Huanglongbing (HLB) también conocido como “citrus greening”, es considerada la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial (Bové, 2006). Se ha estimado que alrededor de 200 millones de árboles se han visto afectados por HLB en 40 países de Asia, África, Oceanía y en el Norte y Sur de países de América (García-Dearderes, 2009). El agente causal del HLB en México es la bacteria denominada *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Esta enfermedad ha ocasionado disminución de la producción en la mayoría de especies de los cítricos, debido a la severidad de los síntomas en el follaje y la rapidez de dispersión (Bové, 2006). Está claro que no solo afecta al sector productivo, sino que pone en riesgo la economía de las familias que dependen de los cultivos en diversas actividades en entorno a la citricultura.

El agente causal del HLB es una α -proteobacteria, gram-negativa, no cultivable y en plantas su crecimiento se limita al floema; esta enfermedad es transmitida por un insecto conocido como por psílido asiático, una vez que el árbol se infecta, la enfermedad avanza rápidamente haciendo incosteable la producción (Bové, 2010), por lo que es de gran importancia buscar alternativas para controlar al patógeno y prolongar la vida productiva del árbol. En etapas iniciales de su detección en México, el SENASICA implemento una estrategia de control de HLB basado en el establecimiento de plantaciones con árboles certificados libres de la enfermedad y el control químico de los psílicos. En años previos dicha institución recomendó la eliminación de árboles para reducir las fuentes de inóculo, sin embargo esta norma no ha resultado efectiva, debido a que tanto en Limón Mexicano como Limón Persa, la enfermedad se disemina con gran rapidez y no da tiempo de mantener un ritmo de saneamiento que sea sustentable. (SENASICA, 2011).

En el presente trabajo consideró importante que además de contener el avance del vector, y establecer plantaciones con planta certificada, también debe incluirse alternativas de manejo de las plantaciones con énfasis en la nutrición para fortalecer la condición fitosanitaria de los árboles y evitar el colapso a corto plazo de las plantaciones. A la fecha, la mayoría de los estudios de nutrición en cítricos se han enfocado a incrementar la producción y calidad de fruta. Sin embargo, se requiere el empleo de una nutrición más

completa y balanceada para inducir mayor resistencia de los árboles ante el HLB y extender la vida productiva de las plantaciones.

Estudios previos señalan que la aplicación de fertilizantes foliares (microelementos) y a suelo (macroelementos) permite lograr una reducción de la expresión de síntomas de HLB hasta un 40% en mandarina (Pustika *et al.*, 2008). Con ello se extiende la vida y producción de los árboles. Estudios recientes indican que el uso de silicio induce respuestas bioquímicas ante el ataque la presencia de un patógeno, desencadenando respuestas como la activación de metabolitos secundarios (Epstein, 2009), de genes de resistencia para modificaciones fisiológicas (Wydra, 2012).

Los reportes del efecto de los fertilizantes en los árboles de cítricos son contradictorios en relación con la enfermedad HLB y la producción. En Florida Gottwald, *et al.*, (2012), encontraron que la fertilización convencional no reduce la severidad de HLB en naranja “Valencia”. No obstante los resultados anteriores fueron obtenidos en regiones con distinto clima y suelo, con diferentes especies de cítricos, por lo que se justifica la realización de trabajos de fertilización que permitan obtener resultados adecuados a las especies y condiciones de las regiones limoneras de México. Los reportes de fertilización en Limón Persa y Mexicano son escasos y los que se tienen disponibles, fueron desarrollados en periodos previos al establecimiento endémico del HLB en regiones de Jalisco y colima. Así, existen recomendaciones del uso de minerales convencionales para su aplicación en formas de fertilización en Limón Persa (Curti-Diaz *et al.*, 2000) y Limón Mexicano (Medina-Urrutia *et al.*, 2001). A la fecha no se conocen trabajos sobre los efectos de silicio en ninguna de estas dos especies de Limón. No obstante Datnoff, (2007), al aplicar silicio en diferentes cultivos de ciclo corto, demostró claramente el beneficio de éste mineral en la inducción a tolerancia a enfermedades, causadas por hongos. Además Wydra, (2012) reportó que al realizar aplicaciones de silicio en plantas de tomate con presencia de enfermedades causadas por bacterias, se obtuvo mayor rendimiento y vida post-cosecha del fruto que en plantas testigo.

En el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de la fertilización en combinación con silicio en árboles de Limón Persa y Limón Mexicano enfermos con HLB

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia económica de los cítricos

La mayoría de los cítricos son nativos de las regiones tropicales y subtropicales de Asia y el Archipiélago malayo. La introducción de los cítricos a América fue realizada por los españoles en el año 1493 en Haití.

A nivel mundial, México ocupa el quinto lugar en producción de los cítricos FAOSTAT (2010), se cultivan alrededor de 560,145.63 has., los estados con mayor producción son Veracruz, Michoacán, Tamaulipas, Colima y San Luis Potosí (SIAP, 2012). La mayor parte de la superficie cítrica se encuentra bajo sistema ejidal y comunal con un total de 67 mil productores, distribuidos en 23 estados de la república, lo que genera una derrama económica de más de 10,200 millones de pesos anuales (Sánchez *et al.*, 2011). En México, se cultivan tres especies de cítricos considerados como limones por el carácter ácido de su jugo: Limón Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) y Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm (Swingle)) y el Limón Italiano (*citrus limon* (Burn)). Botánicamente los dos primeros están clasificados como limas ácidas.

Por su superficie y producción el Limón Mexicano ocupa el segundo lugar en importancia después de la naranja, le sigue el Limón Persa que ocupa el tercer lugar. En la costa del Golfo los estados de Veracruz, Tabasco y Yucatán producen la mayor producción del país de Limón Persa, mientras que la principal zona productora de Limón Mexicano se ubica en la costa del pacífico en los estados de Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Oaxaca donde se concentra más del 80% en la producción nacional (SAGARPA, 2012).

2.1.1 Descripción botánica de las especies de Limón

- Limón Persa

Taxonómicamente el Limón Persa se clasifica con el nombre científico: *Citrus latifolia* Tanaka, Familia: Rutuceae, Subfamilia: Aurantiaideae, Tribu: Citreae, Sub tribu: Citrinas, Sub género: Eucitrus, Especie: *Citrus latifolia*.

El Limón Persa se caracteriza por desarrollar un árbol pequeño el cual crece hasta una altura de 6 a 7 metros. Se prefiere mantener los árboles pequeños mediante podas. La copa es redonda, densa y simétrica. El tallo es corto, con ramas encorvadas hacia el suelo; las ramas más nuevas tienen una orientación vertical, pero al crecer y sostener la carga de los frutos, se doblan gradualmente hacia abajo hasta ponerse horizontales. Las ramas jóvenes en un mismo árbol pueden no ser espinosas o tener espinas pequeñas gruesas de 7 mm de largo. La floración del Limón Persa se presenta a lo largo de todo el año y la flor presenta 5 pétalos (ocasionalmente 4) de color blanco. Los estambres son numerosos y soldados en un anillo, del cual se desarrollan las anteras de color blanco que contienen el polen viable. El pistilo es aproximadamente de 12 mm de largo, con un ovario verde y un estigma amarillo. La propagación vegetativa de la planta se realiza mediante injertos sobre portainjertos seleccionados de acuerdo al tipo de suelo. Por su buena producción y por la carencia de semillas en los frutos y esta especie ha tenido buena aceptación en el mercado, lo cual ha promovido su expansión en diferentes regiones del país. (González, 2011)

- Limón Mexicano

Botánicamente el Limón Mexicano al igual que el Limón Persa es en una lima ácida de fruto pequeño. Representa a la especie *aurantifolia* dentro del género *Citrus* y se ubica taxonómicamente en la Familia: Rutuceae, Subfamilia: Aurantoodeae, Tribu: Citreas, Sub tribu: Citrinas, Sub género: Eucitrus.

De acuerdo con Hodgson (1967) en comparación con los otros cítricos, los árboles de Limón Mexicano, son de vigor y tamaño medio, desarrollo arbustivo con varios tallos delgados e irregulares, ramas densamente armadas con pequeñas espinas puntiagudas. El follaje es denso, consistente y de hojas color verde pálido, de forma lanceolado o elíptica-ovada, punta generalmente obtusa, base redondeada bordes y pecíolos ligeramente alados. Estudios realizados por Medina *et al*, (1993) para conocer la biología floral del Limón,

indican que la inflorescencias se producen en racimos de dos a siete flores en las axilas de las hojas, rara vez aparecen solitarias. Las flores son pequeñas, blancas, de cáliz copulado con 4 a 5 lóbulos. Es posible encontrar flores en el árbol la mayor parte del año, pero las floraciones principales ocurren en dos a tres flujos masivos según la región y el manejo agronómico (Medina *et al.*, 1993).

2.2 Principales enfermedades que afectan a los cítricos.

Las enfermedades constituyen una amenaza para los cítricos, ya que pueden afectar al follaje, las cuales inciden en la producción y calidad de los frutos e inclusive hasta llegar a la pérdida total del árbol. Entre las principales enfermedades que afectan a las especies cítricos como Limón Persa y Mexicano son: la Gomosis de los cítricos (*Phytophthora parasitica*) que ocasiona daños a la raíz y la muerte de los árboles; Antracnosis (*Colletotrichum acuttatum*) la cual ocasiona la caída de flores y frutos pequeños en ambas especies y quemaduras en el follaje en limón Mexicano; la presencia de virus y viroides que afectan follaje y producción, siendo más susceptible la especie de Limón Persa a viroides. Ambas especies son susceptibles tanto al virus de la tristeza de los cítricos (VTC), como al Huanglongbing (HLB). Esta última es sin duda actualmente la más importante.

2.3 Huanglongbing de los cítricos (HLB)

El HLB también conocido como enfermedad de los brotes amarillos, se considera como la más devastadora de los cítricos. En los últimos diez años se reporta como más grave que el virus de la tristeza y representa una gran amenaza para las regiones citrícolas a nivel mundial (Velázquez, 2011; Alberch y Bowman, 2012), ya que no existe ningún tipo de cura para los árboles infectados por esta bacteria (Bové, 2006).

De acuerdo con Melnicoe *et al.*, (2006), el HLB se originó en China donde fue detectada en la provincia de Guandong en 1919 (Bové, 2006). En 1920 se reportó en Taiwán y las Islas Filipinas y posteriormente en Sudáfrica en 1929 (Melnicoe *et al.*, 2006). En las regiones citrícolas donde esta enfermedad se ha establecido de manera endémica, los

árboles se ven afectados disminuyendo su producción, así como la calidad de la fruta, por lo tanto el cultivo se torna incosteable (Bové, 2010). El manejo de HLB es difícil y costoso, y no hay una solución inmediata, ya que las infecciones asintomáticas son comunes a lo largo del año, y se producen síntomas sólo en etapas posteriores a la infección, añadiendo un periodo de latencia antes de que los síntomas sean visibles en plantas infectadas, por lo que resulta preponderante buscar alternativas para controlar al patógeno y prolongar la vida productiva del árbol.

2.3.1 Síntomas del HLB en cítricos

Los síntomas del HLB se expresan en distinta forma en las diferentes especies, variedades y edad de la planta (SAGARPA, 2012). Además, de acuerdo con Gottwald (2007), los síntomas se pueden confundir con otras enfermedades y con las deficiencias de elementos nutricionales en el follaje. De acuerdo con Esquivel-Chávez *et al.*, (2010), los síntomas más característicos en las hojas incluyen el punteado clorótico, manchas angulares asimétricas, moteado difuso, aclaramiento y engrosamiento de la nervadura central, lo que en su conjunto ocasiona un amarillamiento generalizado del dosel del árbol. En la Figura 1, se muestra hojas de árboles de Limón Persa y Limón Mexicano con síntomas típicos de HLB.



Figura 1. Síntomas característicos de HLB en Hojas de dos especies de Limón

Los brotes y hojas se tornan de color amarillo, aunque al parecer su tamaño y forma no se ven afectados (Fundecitrus, 2009). Conforme la enfermedad se disemina por el árbol, las hojas presentan moteado, y aclaramiento de las venas laterales al cruce con las venas secundarias limitadas por la vena principal y tienden a caer.

En el caso de los cítricos dulces (naranjas, toronjas, mandarinas) los frutos maduran de manera irregular con un amarillamiento a partir de la base del pedúnculo. El tamaño puede ser pequeño o regular según la etapa de infección y el fruto se distorsiona y adquiere una forma asimétrica, con los gajos de tamaño irregular, las semillas abortan y no se desarrollan de manera normal (Bové, 2006; Brlansky *et al.*, 2009).

Los árboles infectados presentan un color amarillo cuando la enfermedad se encuentra en un nivel avanzado, el tamaño en árboles jóvenes pueden permanecer pequeños hasta su muerte, su forma es irregular, con ramas y hojas enfermas. En la Figura 2 se muestran árboles de las dos especies de cítricos ácidos (Limón Persa y Limón Mexicano) con un grado severo de la enfermedad.



Figura 2. Síntomas de HLB en árboles con daño severo A) Limón Persa B) Limón Mexicano

2.3.2 Etiología

El HLB es una enfermedad causada por una bacteria α -proteobacteria llamada “*Candidatus Liberibacter spp.*” Esta, es un bacilo gram negativo, la cual es difícil cultivar *in vitro*. Esta bacteria se desplaza por los tubos cribosos del floema, limitando el flujo de fotosintatos a través de esta vía (Bové, 2010). Actualmente se conocen tres diferentes especies *Candidatus Liberibacter asiaticus*, distribuido en el continente asiático, *Candidatus Liberibacter americanus* registrada en Brasil y *Candidatus Liberibacter africanus*, registrado en África. En México solo se ha reportado la presencia de *Ca. L. asiaticus*. Con ausencia de las restantes (Bové, 2010).

2.3.3 Epidemiología

El control de esta bacteria es complicado o casi nulo, por lo que afecta la vida útil de las plantas jóvenes y adultas en todas las especies del género *Citrus*, incluyendo a los híbridos de cítricos con otros géneros diferentes (Mangussi, 2008). Los conductos del floema se ven bloqueados por la acumulación de almidones y deposición de calosa, pérdida

de la estructura interna del cloroplasto que conlleva al amarillamiento. El sistema radicular es afectado con un desarrollo disminuido y el crecimiento de las nuevas raíces puede ser inhibido, dando como resultado un escaso desarrollo de la planta y por consiguiente la muerte del árbol (Esquivel-Chavéz *et al.*, 2010).

Generalmente *Candidatus* L. se desarrolla a una temperatura de 32-35 °C, sin embargo su crecimiento es afectado a temperaturas máximas que alcanzan los 37°C y las mínimas a 27°C, por lo cual, se puede considerar tolerante a una temperatura relativamente alta (Bové *et al.*, 1974; Lopes *et al.*, 2009,) citados por Belasque *et al.*, 2010.

De acuerdo con Li, *et al.*, 2009, la bacteria se distribuye en toda la planta en diferentes concentraciones (Figura 3). La mayor concentración se presenta en las venas centrales de las láminas foliares maduras. En el fruto la mayor acumulación de la bacteria se presenta en las septas y en el eje central del mismo. Las plantas injertadas con tejidos infectados presentan daños con mayor grado de severidad (Li, *et al.*, 2009).

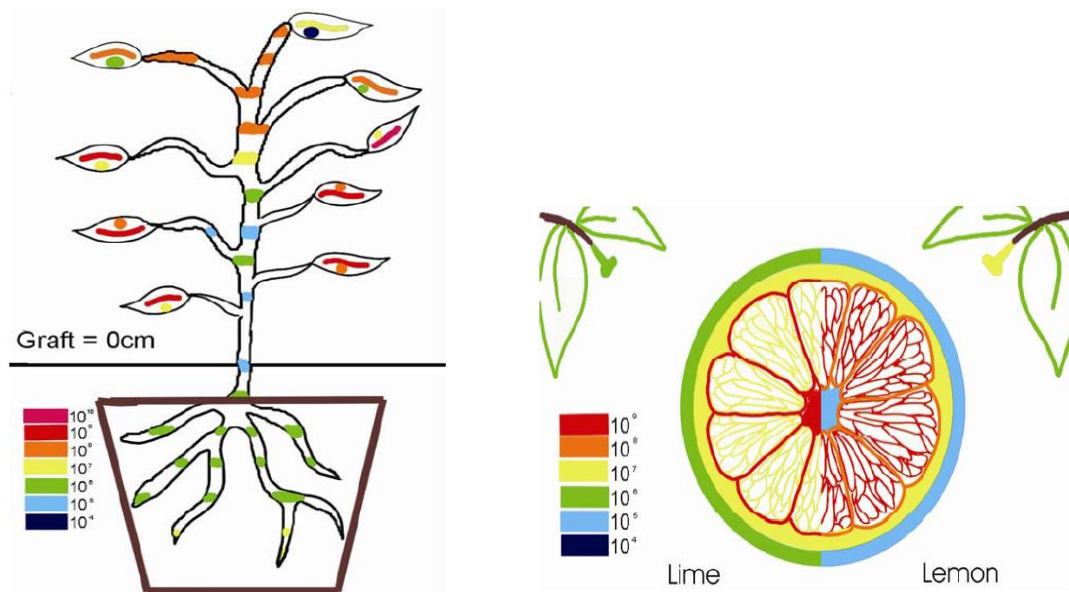


Figura 3. Distribución de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en especies de cítricos. Tomado de Li, *et al.*, 2009

La presencia de la bacteria en el floema de la planta incrementa la acumulación de los niveles de almidón en las hojas, esta condición propicia desbalances en la relación de carbohidratos que se deben mover de las hojas al fruto. El almidón se acumula

excesivamente en las células fotosintéticas así como en el floema y el parénquima vascular en hojas y peciolo. El almidón fue encontrado comúnmente en el parénquima del xilema en los tallos de los árboles infectados, sin embargo, en el caso de los árboles sanos el almidón estuvo presente en las raíces que contienen depósitos sustanciales de almidón en contraste de árboles afectados con HLB los cuales mostraron una deficiencia total del mismo. Las evidencias anteriores sugieren que los cambios sustanciales en la distribución de carbohidratos a través del árbol pueden ser no solamente el resultado de la infección con HLB, ya que el bloqueo por parte de la bacteria no permite el flujo de los fotoasimilados a través de toda la planta, lo que puede ocasionar un rápido deterioro del árbol así como su eventual muerte. El contenido de almidón en las hojas de árboles con HLB puede ser 20 veces mayor que los árboles sanos (Etxeberria, *et al*, 2009). Sin embargo, Koh *et al.*, (2011) descrita en Flores-Sánchez (2011) reportaron la acumulación de calosa en las placas cribosas y alrededor de las unidades de los plasmodesmos (PPUs) conectado a las células acompañantes y elementos cribosos. Estos autores sugieren que la acumulación de calosa alrededor de las PPU, inicia en los cloroplastos antes que el almidón. A través de microscopía electrónica de transmisión también se observó que los PPU con grandes depósitos anormales de calosa fueron más abundantes en muestras infectadas con *Ca. L asiaticus* que en las hojas no infectadas. Con la ayuda de un marcador fluorescente [diacetato carboxifluoresceína (CFDA)], se observó que la formación de calosa alrededor de estas unidades en hojas infectadas, inhibió el flujo simplástico. La fluorescencia en las venas menores suele ser más tenue en hojas infectadas con *Ca. L asiaticus*, indicando que CFDA permanece en el tejido no vascular, este bloqueo perjudica no solo a las células de las plantas sino también de la bacteria, por lo tanto las células de *Ca. L asiaticus* eventualmente pueden llegar a ser inviables en elementos cribosos completamente bloqueados (Trivedi *et al.*, 2009).

2.3.4 Distribución mundial y nacional de la enfermedad

La presencia del HLB en los países productores de cítricos provoca pérdidas económicas importantes. Actualmente el HLB es considerado la enfermedad más

devastadora de los cítricos, la cual ha causado impresionantes pérdidas económicas (OIRSA, 2010; Velázquez, 2011). Los continentes asiático y africano son los más afectados (Figura 4) (OIRSA, 2010).

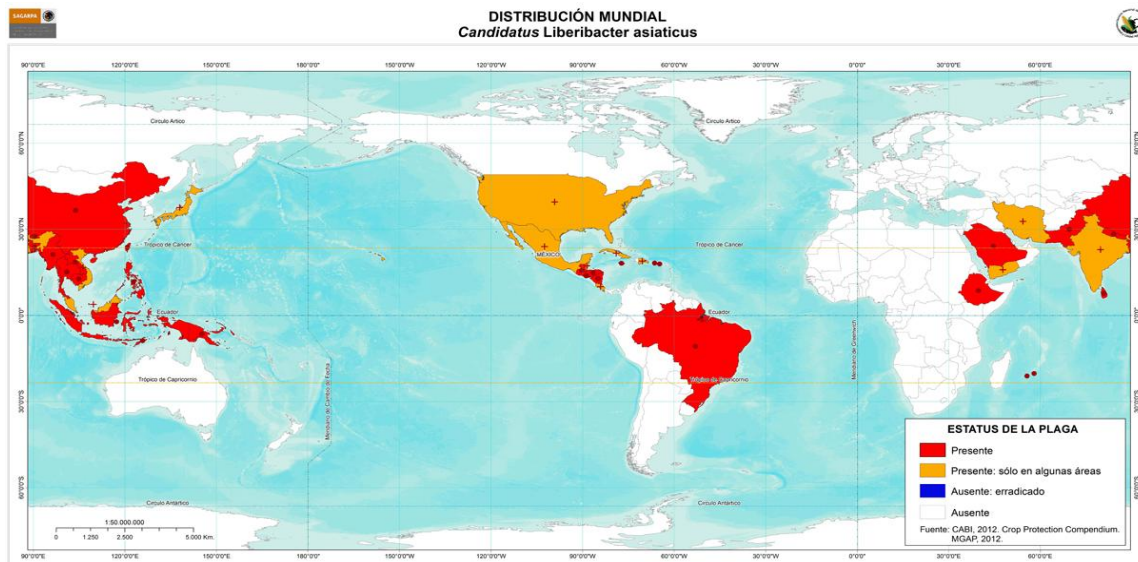


Figura 4. Distribución mundial de HLB en cítricos. Tomado de SAGARPA,2012

En el continente americano esta enfermedad fue descrita por primera vez en Brasil en el 2004 y posteriormente en otras regiones cítricas de Estados Unidos 2005, Cuba 2007, República Dominicana 2008, Belice y México 2009 (García-Darderes, 2009).

En México el HLB se reportó por primera vez el 6 de julio de 2009 en la localidad del Cuyo, Municipio de Tizimin, Yucatán (Hernández *et al.*, 2010). En diciembre del mismo año, fue detectado en 14 municipios de otros 4 estados. En julio de 2010 el HLB se encontró en 26 municipios de 7 estados, y para diciembre ese año se expandió a 71 de 8 estados. En noviembre de 2011, la presencia de esta enfermedad se encontró, en 134 municipios de 13 estados cítricos Yucatán, Quintana Roo, Nayarit, Jalisco Campeche, Colima, Sinaloa, Michoacán, Chiapas, Hidalgo, Baja California Sur, San Luis Potosí, Veracruz. En el estado de Colima es donde la enfermedad ha causado los mayores daños. En el 2012 se reportaron 315 mil árboles con síntomas de HLB en 1595 predios comerciales, con una superficie total de 12,996 has, lo que representa el 60% de la superficie cítrica del estado (Sánchez *et al* 2011; Velázquez 2011).En el 2014 un nuevo

reporte señala que el 100% de las plantaciones de Limón Persa y Limón Mexicano se ven afectadas por el HLB (Robles-González *et al.*, 2014).



Figura 5. Distribución del HLB en México. Tomado de SENASICA, 2014

2.3.5 Transmisión del HLB

La forma más eficiente de transmisión del HLB es a través de insectos vectores, aunque también se transmite al injertar tejido infectado en una planta sana. Khairulmazmi, (2010) observó que al utilizar tejido vegetativo infectados tomados de árboles de mandarina para utilizarlo para injerto, se obtuvieron altos porcentajes de transmisión de HLB, apareciendo los síntomas en periodos cortos con alta incidencia de severidad.

Sin embargo, consistentemente se reporta al psílido asiático (*Diaphorina citri*), como el principal vector transmisor. No obstante, recientemente también se reportó a *Diaphorina communis* como agente transmisor de esta bacteria (Donovan *et al.*, 2011) y a *Trioza erytrae* en el continente africano (Aubert, 1987). En México, *D. citri* es un insecto plaga con categoría cuarentenaria (SAGARPA, 2012). Tiene un periodo de vida corto con un alto grado de fecundidad. Los adultos de este psílido llegan a medir de 3 – 4 mm de

longitud, son de color café moteado recubierto de polvo ceroso, la hembra es capaz de poner hasta 800 huevos durante toda su vida, teniendo una duración en el periodo embrionario de 7-9 días a 15 °C y de 3-5 días a 28°C.

El psílido asiático ocasiona daño directos en los brotes nuevos y en el follaje del árbol como es la deformación y la abscisión de las hojas en bajas infestaciones, mientras que en infestaciones altas puede matar los brotes vegetativos de las plantas en desarrollo (Cortes *et al.*, 2010). El daño indirecto se presenta cuando el insecto transmite el agente causal del HLB, la bacteria *Ca. Liberibacter* que habita en el floema. (Li *et al.*, 2009). Aunque la bacteria se restringe al floema de las rutáceas, tiene la capacidad de multiplicarse en la hemolinfa y las glándulas salivales de los psílicos. Dentro del insecto, la bacteria cruza la pared intestinal hasta llegar a las glándulas salivales, vía hemolinfa en un tiempo de 1 a 3 semanas según la virulencia de la cepa (Orozco, 1995).

En México *D. citri* fue encontrado por el Dr. D.B. Thomas previamente en el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo. Actualmente en México el psílido se ha reportado en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Nayarit, Jalisco, Campeche, Colima, Sinaloa, Michoacán, Veracruz, Morelos, Chiapas, Sonora, Baja California Sur, San Luis Potosí, Hidalgo, Nuevo León y Puebla (Armenta *et al.*, 2010).

2.4 Manejo de HLB

2.4.1 Control Biológico y Químico del vector.

Para controlar la incidencia de HLB se ha recurrido al control biológico de los vectores, para ello se han empleado varios enemigos naturales que actúan como depredadores o parasitoides del psílido asiático. Entre los agentes de control biológico comúnmente utilizados destacan *Tamarixia radiata* así como hongos entomopatógenos. Sin embargo, actualmente el uso de enemigos naturales ha resultado poco efectivo debido a los diferentes factores que limitan su uso en escala comercial (CESAVEJAL-2012).

Existe una diversidad de productos sintéticos y alternativos que ayudan a controlar al insecto entre ellos destaca el grupo de los neonicotinoides como imidacloprid y fenpropatin con los cuales se han obtenido excelentes resultados para el control de *D. citri*. Actualmente SENASICA ha diseñado estrategias de control regional (ARCOS) para lo cual recomienda alternar el uso de insecticidas sintéticos y alternativos para evitar resistencia por parte de la plaga (SAGARPA, 2014).

2.4.2 Control químico de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Para el control de *Ca. Liberibacter*, existen cerca de 40 antibióticos de los cuales solamente 10 se han utilizado comercialmente y de estos solo la estreptomycin y tetraciclina están autorizados para su uso en árboles frutales. Durante los 70's la tetraciclina fue evaluada por inyección dentro del tronco en cítricos afectados por HLB en Sudáfrica, China e Indonesia. El uso de las inyecciones propicio una reducción significativa de la enfermedad en los árboles tratados, sin embargo esta práctica fue discontinuada, debido a que la tetraciclina es solo bacteriostática y no bactericida. Además se requería que el tratamiento fuese anual con inyecciones periódicas con la probabilidad de causar fitotoxicidad (Zhang *et al.*, 2013). Por otro lado, Zhang *et al.*,(2013) evaluaron el nivel de antagonismo de los antibióticos ante la presencia de la bacteria de *Ca. L. asiaticus* (Las), para lo cual midieron el nivel de fitotoxicidad con la aplicación de estos productos. Los autores observaron que la ampicilina sódica, carbenicilina disódica y penicilina G potásica con concentraciones de 100 mg/L, resultaron más eficaces ya que propiciaron una marcada reducción en Las obteniendo un contenido bacteriano menor de 1,000 células/g de tejido. Este resultado importante puede ser considerado como de gran potencial para un empleo futuro en el control de la enfermedad.

2.5 Control cultural de enfermedades

El control cultural consiste en la utilización de las prácticas agrícolas ordinarias, o algunas modificaciones de ellas, con el propósito de contribuir a prevenir plagas y enfermedades fitopatológicas, creando un ambiente menos favorable para su desarrollo, así como su eliminación o disminución de daños. En general no se trata de medidas tomadas de improviso, ante la presencia de la enfermedad, sino que, por el contrario, normalmente se responden a una planificación previa dentro del proceso normal de producción agrícola e incluye medidas como: labores de preparación de suelos, métodos de siembra así como manejo de fertilizantes.

2.5.1 Nutrición Mineral.

La nutrición mineral, es una alternativa importante no solo para favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que se requiere para promover su resistencia a fitopatógenos (Alcántar *et al.*, 2012).

En general, la falta o el exceso de nutrientes pueden alterar la susceptibilidad de la planta a la enfermedad debido cambios metabólicos que ocurren en ella. Además la infección por un patógeno altera la fisiología de planta, particularmente en la incorporación, asimilación y translocación de nutrientes minerales.

Los nutrientes son esenciales en el metabolismo de las plantas y se clasifican según su función específica. En la planta se requieren determinadas concentraciones y momentos de aplicación para el adecuado crecimiento y desarrollo de los cultivos (Kirkby, 2001). Los macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) se requieren en mayor cantidad para el desarrollo de la planta y los micronutrientes en menor cantidad, pero sin embargo todos son esenciales para un buen aprovechamiento y asimilación metabólica de la planta.

Las plantas también toman elementos que no desempeñan ningún papel en su metabolismo, pero que, juegan un papel importante como activadores de defensas ante el

ataque de patógenos o como respuesta para inhibir estrés biótico y abiótico. Debido a esta función se les reconoce como nutrientes benéficos. Los elementos benéficos, han sido motivo de amplias discusiones. Algunos autores llaman así a los elementos que estimulan el crecimiento pero que no son esenciales (Alcántar *et al.*, 2012). A continuación se presenta una breve descripción de algunos de los nutrientes benéficos.

2.6 Silicio

El silicio (Si) es uno de los elementos abundantes en la litósfera ya que forma parte del 40% de todos los minerales comunes (Fassbender, 1975). Aunque el Si no se considera un nutriente esencial para la mayoría de las plantas, existe evidencia que demuestra los efectos benéficos de la nutrición con Si, para favorecer el crecimiento desarrollo y estado sanitario de los cultivos. Estudios sugieren que el Si activa los mecanismos de defensa de la planta, pero el mecanismo exacto de la interacción entre este elemento y las vías bioquímicas de resistencia permanecen sin esclarecer (Diogo y Wydra. 2007).

2.6.1 Mecanismo de acción

El silicio se deposita en forma amorfa en las paredes celulares. Contribuye con las propiedades mecánicas de la pared como son la rigidez y la elasticidad. Muchas especies acumulan concentraciones apreciables de silicio en sus tejidos y mejoran su crecimiento y fertilidad cuando se les suministra cantidades adecuadas del mismo. El Si es depositado como silica hidratada amorfa ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), primeramente en el retículo endoplasmático, pared celular y en los espacios intercelulares. Intracelularmente, se acumula también en células epidérmicas especializadas llamadas células silíceas. Así mismo, forma complejos con polifenoles reforzando la pared celular. Liang Y, et al., (2005), citados por Haing L, (2007), manifiestan que la distribución de silicio dentro de las plantas está ligada a las especies. En plantas no acumuladoras, no hay diferencia en la parte aérea con la parte de la

raíz. En otros casos como en plantas semi-acumuladoras, la raíz acumula niveles más altos de silicio. En plantas acumuladoras de silicio el 90% del elemento se encuentra en la parte de la raíz.

El Si activa genes involucrados en la producción de compuestos secundarios del metabolismo, como los polifenoles y enzimas relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas. Además de la barrera física, debido a la acumulación en la epidermis de las hojas. Por lo tanto, el aumento de Si en tejidos de las plantas hace que la resistencia a un ataque de patógenos fúngicos aumente, debido a la producción adicional de toxinas que pueden actuar como sustancias inhibidoras del patógeno (Epstein, 1999).

El Si puede ser suministrado de diferentes fuentes. Trabajos previos usando silicato de potasio, demostraron que la molécula actúa como "elicitador" o inductor de proteínas de defensa (Wydra, 2010), por lo que hoy en día se ha venido incorporando el uso de silicato de potasio como alternativa para una agricultura sostenible.

Uno de los beneficios del silicato de potasio es generar la resistencia, a mecanismos de defensa tanto físicas como bioquímicas, a través de factores constitutivos, como engrosamiento de cutícula de la pared celular, e inhibidores enzimáticos preformados, que son utilizados para prevenir la colonización de tejidos de la planta por la mayoría de microorganismos y tiende a acumularse en el apoplasto en las paredes de las células epidérmicas, además de reforzar en las plantas, la capacidad de distribución de los carbohidratos requeridos para el crecimiento y producción de cosecha (Epstein, 1994).

2.6.2 Beneficios del silicio

Los efectos producidos por Si en las plantas se han atribuido a: 1) la reducción de la pérdida de agua por transpiración cuticular, lo cual ocurre por la formación de depósitos de este mineral por debajo de la cutícula; 2) disminución del flujo apoplástico y absorción reducida de los minerales tóxicos debido a la formación de depósitos de silicio en la raíz; 3) un incremento en la rigidez de la pared celular (Datnoff, 2007). En el cultivo del arroz, el Si

ha mejorado la respuesta de defensa ante las enfermedades causadas por *Magnaporthe grisea* y *Phytophthora oryzae*; mientras que en cucurbitáceas la aplicación de silicio reduce la severidad del mildiu causado por *Sphaerotheca*, al igual que en tomate contra *P. syringae*, con una baja incidencia y severidad (Datnoff, 2007; Wydra, 2010).

Además de su papel como elemento benéfico en el desarrollo de plantas, el Si mejora la fertilidad del suelo, favorecer la fotosíntesis, mejora las propiedades físicas del suelo y de la eficiencia del uso del agua, alivia el estrés biótico y abiótico, aumenta la tolerancia a la toxicidad de los metales tales como Fe, Mn y Cd, reduce daños por heladas y mejora la resistencia a enfermedades y plagas (Epstein, 1994; Iwasaki *et al*, 2002; Diogo 2004; Diogo y Wydra, 2007).

Diogo y Wydra (2007), reportaron que el Si reduce la incidencia de la enfermedad de la bacteria *Ralstonia solanacearum* que coloniza el xilema, en plantas de geranio, berenjena y tomate. El avance de la sintomatología de la bacteria fue evaluado mediante dos genotipos de geranio ‘Katinka’ y ‘Campina Blue’, los cuales fueron tratados con [+Si+Rs] y se compararon con un testigo [-Si+Rs]. El estudio dio como resultado que ambos genotipos presentaron una disminución en la expresión de síntomas tratada con Si con un porcentaje del 25-35% de reducción en la expresión de síntomas de esta bacteria. Esto permite deducir que el silicio puede reducir la severidad de sintomatología actuando sobre los genes de defensa de las plantas. Análisis genéticos, bioquímicos y moleculares realizados en el trabajo anterior. La parte molecular reveló que hubo una diafonía entre las vías de señalización, las interacciones positivas o negativas resultantes de la supresión o la mejora de la expresión génica, así como la alta y baja regulación de los genes relacionados con la defensa. Por lo tanto, una posible combinación de inductores de resistencia tiene que ser bien estudiada y probada antes de su aplicación en campo para seleccionar los inductores que propician un efecto positivo óptimo.

El aporte de silicio hace que la resistencia de las plantas a las enfermedades se pueda aumentar mediante la formación de barreras mecánicas y/o cambiando las respuestas químicas de la planta al ataque del parásito mediante el aumento de la síntesis de toxinas (fitoalexinas) que pueden actuar como sustancias inhibidoras o repelentes (Lima F, 2010).

2.7 Inductores de Resistencia

Se sabe que las plantas poseen genes que codifican para producir “armas químicas” extremadamente eficientes, que constituyen mecanismos de defensa cuya activación las protege del ataque de microorganismos patógenos (Gómez, 2011). Son moléculas químicas que pueden estimular mecanismos de defensa o asociados con la respuesta de defensas en plantas. Estas moléculas activadoras hacen referencia a un amplio ámbito de compuestos, los cuales pueden ser derivados a partir de plagas, plantas u de otros microorganismos así como de preparados biológicos de origen vegetal o análogos producidos sintéticamente. En relación planta-patógeno, es conveniente hacer la distinción entre moléculas activadoras de origen vegetal, llamadas activadoras endógenas y las de origen parasitario o producidas por un agente físico externo conocidas como activadoras exógenas. En el caso de las primeras, se sabe que las células vegetales poseen una pared celular, la cual presenta 90% de polisacáridos asociados a un 10% de proteínas y esta pared celular puede liberar moléculas activadoras endógenas, responsables de la inducción de mecanismo de defensa en ellas. Mientras que las moléculas activadoras exógenas pueden ser clasificadas en bióticas y abióticas. Las moléculas activadoras exógenas bióticas producidas *in vivo*, son liberadas espontáneamente e los filtrados de cultivo de microorganismos patógenos o no, o pueden ser extraídos de tejido infectado por métodos de infiltración de un tampón que lave los espacios intercelulares, donde ha colonizado previamente el patógeno. En cuanto a las moléculas activadoras exógenas abióticas actualmente, Hay disponible gran cantidad de productos donde se incluyen aquellos semisintéticos. Las moléculas activadoras de inducción de resistencia pertenecen a familias químicas diversas como ácidos grasos, RNA, glicoproteínas pepidos, glicolípidos, lípidos, lipoproteínas, lopolisacáridos, oligosacáridos polisacáridos, entre otros (Romanazzi, *et al.*, 2009).

2.7.1 Defensa de las plantas a patógenos.

Las plantas han desarrollado una gran cantidad de mecanismos de defensa para resistir la colonización por patógenos, mecanismos físicos y bioquímicos los cuales son clasificados en defensas pasivas (preformadas) e inducibles (Durrant y Dong, 2004).

2.7.1.1 Defensas preformadas

También son denominadas constitutivas que son estructuras o sustancias químicas presentes en las plantas antes de la infección del patógeno. Ejemplo de estas defensas morfológicas ceras, cutícula así como firmeza en las células de la epidermis. Por otro lado, las defensas químicas presentes en la planta antes de que se lleven a cabo el reconocimiento. Las plantas secretan una amplia variedad de sustancias como propiedades tóxicas o inhibitorias como fenoles, lignina, taninos, saponinas, antocianinas, flavonoides, glucocinatos, lectinas, glucanasas y quitinasas entre otros (Kliebeinstein, 2004).

2.7.1.2 Defensas Inducidas

Los mecanismos de defensa inducidos se activan solamente como respuesta al ataque del patógeno durante el proceso de infección. La resistencia inducida por agentes bióticos es un mecanismo activo de defensa que involucra cambios en el metabolismo de la planta (Madriz, 2002).

La respuesta hipersensible (RH) se caracteriza por un colapso de las células infectadas dentro de las primeras 24 h de la interacción debido a la variación del flujo iónico, fosforilación y desfosforilación; esta es provocada por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), como son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical súper oxido (O_2), así como la variación del flujo iónico y el incremento de óxido nítrico (NO) como moléculas químicas inducidas en este proceso de defensa. Esta respuesta afecta al patógeno limitándolo al acceso de nutrientes, o bien por la liberación de sustancias inhibitorias para el patógeno (Yoshioka, 2009).

Con respuesta a estas señales se activan diversas rutas metabólicas que dejan a la planta en estado de alarma promoviendo de manera coordinada la producción de otras

moléculas que activan la síntesis de metabolitos secundarios como polifenoles, fenilalanina, amino liasa, enzimas con actividad de degradación como β -1,3 glucanasa, peroxidases, quitinasas, quitosanasas y expresión de genes de defensa (Smith y Boyko, 2007). Los metabolito secundarios de defensa son compuestos organicos en el sistema defensivo de las plantas. Considerando su ruta biosintética que les da origen han sido agrupados en terpenos, alcaloides y fenilpropanoides. Los terpenos son unidades de isopreno como goma, resina que son liberados por la planta con actividad quimiosmótica. Los alcaloides son compuestos nitrogenados por lo general con actividad insecticida (Buchanan *et al.*, 2000). Los fenilpropanoides o también llamados compuestos fenólicos se han relacionado en las actividades de defensas como el endurecimiento de la pared celular, actividad antimicrobiana (furanocumarnas, isoflavonoides y estilbenos), repelentes (taninos) y en procesos de señalización (ácido salicílico) (Taiz y Zeiger, 2006).

Las proteínas relacionadas con patogenicidad (PR) son inducidas en respuesta a la infección por patógenos y muestran alto grado de especificidad a éstos. Su localización y distribución de estas proteínas están relacionadas directamente con la naturaleza de la infección. Otro mecanismo de defensa inducido es, el silenciamiento génico postranscripcional, que actúa tras la invasión de la planta por distintos virus. La planta es capaz de reconocer la presencia de RNA de doble cadena (dsRNA) producto de la replicación viral.

2.7.2 Inducción de resistencia

En la literatura se indican que existen dos formas de resistencia Inducida: la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) y la Resistencia Sistémica Inducida (ISR), Las cuales se distinguen considerando la naturaleza del elicitador y las rutas de activación que las envuelven. Vallad y Goodman (2004) mencionan específicamente algunas características en las que se puede diferenciar SAR: es inducida por ua amplia gama de elicitores bióticos o abióticos, induce proteínas PR, utiliza rutas de señalización que pueden involucrar al ácido salicílico y su señal viaja sistemáticamente a sitiso distales de donde

ocurrió la infección. ISR esta respuesta es potencializada no involucra la síntesis de proteínas PR y la ruta de señalización la realiza a través de jasmonatos y etileno.

La resistencia puede ser potencialmente activada en plantas pre-tratadas con químicos inductores, los cuales parecen actuar como análogos funcionales del ácido salicílico (Gozzo, 2003). Algunos compuestos comerciales utilizados como inductores de defensa en muchos cultivos, son: Harpina, Acibenzolar-s-metil y extractos de *Reynoutria sachalinensis*. Estas sustancias actúan sobre la planta e impiden el establecimiento del patógeno, o bien limitan consecuentemente su actividad en el tejido u órgano infectado. No tienen efecto directo o actividad específica sobre los fitopatógenos. (Yasuda, 2007).

Los inductores abióticos, también denominados inductores químicos. Esta diferencia se basa principalmente en el mecanismo de acción de los inductores, ya mencionado. Aunque en su mayoría son compuestos naturales, de origen biológico, los inductores son sustancias sintetizadas en laboratorio, que se aplican externamente sobre las plantas, inyectadas o asperjadas, siendo una de las formas más comunes de utilización, la aspersion. Su uso fue reportado en numerosas investigaciones, tanto en laboratorio y campo, Su empleo fue mencionado en numerosos cultivos con fines comerciales, como algunas leguminosas y monocotiledóneas, cucurbitáceas, arroz, algodón, banano, papa, tomate, tabaco, cacao, citrus y varios otros. El empleo de estos compuestos inductores de resistencia son utilizados para enfrentar enfermedades tales como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinérea*, *Colletotrichum*, *Puccinia helianthi*, *Sphaerotheca fuliginea*, *Xantomonas axonopodis* (Gómez, 2011). No se conocen reportes sobre el uso de estos inductores para enfrentar el problema de enfermedades en cítricos, particularmente en el HLB.

3. JUSTIFICACIÓN

Con el presente trabajo se generó conocimiento científico y las evidencias necesarias que permitan mejorar las estrategias normativas establecidas por las autoridades para evitar la diseminación del HLB; así como, generar propuestas metodológicas que mejore la tecnología actual empleada para su control y que no ha dado los resultados esperados, principalmente los que permitan convivir con la enfermedad y mantener por más años la vida productiva de los árboles.

Para lo anterior, una alternativa es desarrollar programas de nutrición de base NPK, con aplicaciones foliares de micronutrientes y de Silicio, lo que permita generar resistencia en los árboles y limitar el avance de la enfermedad; además, proponer el empleo de productos que generen respuestas en las plantas a través de la inducción de señales tales como inductores de resistencia. La información generada enriquecerá de manera sustantiva el escaso conocimiento existente sobre el uso de fertilizantes convencionales en Limón Persa y Limón Mexicano.

4. HIPÓTESIS

La fertilización con NPK, complementada con la aplicación foliar de micronutrientes y Silicio, disminuyen la severidad del HLB, favorece el rendimiento y prolonga la vida productiva de los árboles con esta enfermedad en Limón Persa y Limón Mexicano. Además, el uso de inductores de resistencia en Limón Persa genera retraso en el desarrollo de la expresión de los síntomas del HLB.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de diferentes dosis de fertilizantes de NPK y la aplicación foliar de Silicio en Limón Persa y Limón Mexicano en campo; además, determinar rendimiento y calidad de fruto así como evaluar la incidencia de HLB; al mismo tiempo determinar la influencia del uso de inductores de resistencia en árboles de Limón Persa en dos condiciones sobre la incidencia de dicha enfermedad.

5.2 Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de tres dosis de fertilizantes de NPK, con adición de micronutrientes foliares y con aplicación foliar de Silicio sobre el rendimiento y calidad de fruto, así como sobre la incidencia y severidad de HLB y en Limón Persa en condiciones de Campo.
2. Evaluar el efecto de fertilizantes de NPK adicionadas con dos dosis de Silicio, con y sin micronutrientes foliares sobre el rendimiento y calidad de fruto, así como sobre la incidencia y severidad de HLB en Limón Mexicano en condiciones de campo.
3. Determinar el contenido nutrimental foliar, el contenido de clorofila y los cambios anatómicos en el floema por efecto de la aplicación de fertilizantes y de Silicio en Limón Persa y Limón Mexicano bajo condiciones de campo.
4. Evaluar el efecto de la aplicación de Inductores de resistencia en árboles de Limón Persa en campo e invernadero, en la aparición de síntomas de HLB.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Experimento 1. Efecto de la fertilización convencional y adición de silicio

6.1.1 Sitio Experimental Clima, localidad y características de suelo.

- **Sitio 1**

El presente trabajo se realizó en una huerta de Limón Persa en San Martín Hidalgo, Jalisco, con el objeto de comparar el efecto de las aplicaciones de fertilizantes convencionales, así como la mezcla de micronutrientes con la adición de silicio en la incidencia de HLB, contenido de clorofila en la hoja, rendimiento y calidad de la fruta de Limón durante dos años.

El experimento se efectuó en un predio denominado “La Difunta”, el cual está ubicado en el km 1 “Labor de Medina” perteneciente al municipio de San Martín Hidalgo, Jalisco. Las coordenadas del sitio experimental son las siguientes: latitud 20.4667, longitud -103.917. Las condiciones del clima que imperan en la región son: temperatura promedio de 20.9 °C, con temperatura mínima promedio de 13.2° C con altitud de 1270 m y una precipitación de 964.0 mm distribuida en los meses de mayo y octubre.

Los árboles del predio seleccionado fueron de lima persa (*Citrus latifolia*) injertados sobre el patrón Limón volkameriana (*Citrus volkameriana* Panq), a una distancia de 6 x 3 m con una densidad de 372 árboles por ha., sobre camas levantadas unos 30 cm arriba del nivel del suelo y orientadas de norte a sur. Al establecerse el experimento en febrero del 2012 algunos árboles de la huerta presentaban síntomas de daño en las hojas por la presencia de Huanglongbing (HLB).

- **Sitio 2**

Considerando que el HLB representa un problema grave en las plantaciones de limón mexicano, el presente trabajo se desarrolló, con la finalidad de conocer la respuesta de esta especie a tratamientos de fertilización convencional más silicio (con diferentes dosis). El experimento se estableció en un predio de Limón Mexicano de la localidad Cofradía de Hidalgo en el municipio de Tecomán, Colima a 5 km de la cabecera municipal.

El experimento se efectuó en un predio denominado “Santa Marta” el cual se encuentra ubicado en la localidad Cofradía de Hidalgo en el municipio de Tecomán, Colima a 5 km de la cabecera municipal. Las coordenadas del sitio fueron latitud 29.1542, longitud -106.64444. Las condiciones del clima que imperan en la región son: temperatura promedio de 27°C, con temperatura mínima promedio de 22.4° C con altitud 25 m sobre el nivel del mar y precipitaciones de 810 mm distribuida en los meses de mayo y octubre.

La huerta de Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle) seleccionada tenía 3 años de edad. Los árboles se plantaron en un terreno plano a una distancia de 8 x 6 m con 210 árboles por ha. Al establecerse el experimento en agosto del 2013, todos los árboles de la huerta presentaban síntomas de daño en las hojas por la presencia de HLB con un nivel de severidad de 2.5 según la escala de daño descrita en el Cuadro 4.

Cuadro 1. Características de los suelos donde se realizaron los experimentos de Limón Persa en Jalisco y Limón Mexicano en Colima. Predio "La Difunta" San Martín Hidalgo (SMH) Jal., y "Santa Marta" Cofradía de Hidalgo (CH), Tecomán, Col., 2013.

Características físicas/químicas	Estado	
	SMH	CH
	Textura	
Arena	32 %	30 %
Arcilla	44 %	30 %
Limo	24 %	40 %
pH	7.81	8.31
CIC	128 μ S/cm	738 μ S/cm
Materia orgánica	1.00 %	2.20 %
Calcio	19,1 meq/100g	24,9 meq/100g
Nitrógeno	969 mg/Kg	1619 mg/Kg
Magnesio	4,50 meq/100g	4,94 meq/100g
Potasio	0,87 meq/100g	1,53 meq/100g
Sodio	0,75 meq/100g	1,06 meq/100g
Hierro	<8.0 mg/kg	<8,0 mg/kg
Manganeso	7,08 mg/kg	2,24 mg/kg
Cobre	1,29 mg /kg	1,58 mg/kg
Zinc	0,44 mg/kg	0,53 mg/kg

6.1.2 Materiales

En el presente trabajo se emplearon los siguientes materiales: Aplicación de macronutrientes: las dosis de fertilizante se preparó con los siguientes productos Urea, Fosfato diamónico y Cloruro de potasio (N, P y K). Se efectuaron 8 aplicaciones al suelo

por año, en dos periodos febrero-abril y agosto-octubre cada 15 días cuatro veces por periodo, incorporando los productos debajo de la copa, en la zona de goteo.

Para las aplicaciones de micronutrientes al follaje se usó una mezcla de Magnesio, Manganeso, Zinc, Fierro y selenito de sodio más la adición de silicio (silicato de potasio) en algunos tratamientos. Las aspersiones se realizaron con una mochila de motor y una boquilla de cono hueco T-JET. El gasto de agua se calculó mediante calibración *in situ*. La aplicación se dirigió al árbol procurando cubrir todo el follaje. Durante el experimento se llevaron a cabo 8 aplicaciones por año en dos periodos febrero-abril y agosto-octubre

6.1.3 Diseño de la investigación

6.1.3.1 Tratamientos en Limón Persa

Cuadro 2. Tratamientos de fertilización en Limón Persa en San Martin Hidalgo, Jal.

Tratamiento	g/ha			mL/L	Fertilización Foliar *
	N	P	K	Silicio (Si)	
1	21	2	10	0	Si
2	43	4	20	0	Si
3	64	8	30	0	Si
4	43	4	20	2mL	Si
5	0	0	0	0	Si
6	0	0	0	0	No

(*Fertilización Foliar (Mg=0.765mL, Mn=0.66mL, Zn y Cu=1.130mL, Fe=4.54 mL, Na₂SeO₃ =20mg). En los cuadros de resultados siguientes, los tratamientos de fertilización se van a citar como en la primer columna de este cuadro.

6.1.3.2 Tratamientos en Limón Mexicano

Cuadro 3. Dosis de fertilización convencional y silicio aplicados a árboles de Limón Mexicano (Tecomán, Colima).

Tratamiento	gr/árbol			mL/L	Fertilización Foliar *
	N	P	K	Silicio (Si)	
1	12.68	7.72	7.56	5 mL	No
2	12.68	7.72	7.56	5 mL	No
3	12.68	7.72	7.56	10 mL	Si
4	12.68	7.72	7.56	10 mL	Si
5 FF*	0	0	0	0	Si
6 Testigo	0	0	0	0	No

*Fertilización Foliar (Mg=0.765mL, Mn=0.66mL, ZnCu=1.130mL, Fe=4.54 mL, Na₂SeO₃=20mg)

6.1.4 Variables evaluadas

6.1.4.1 Índices de severidad de HLB

El índice de severidad de HLB se determinó con una escala de daño sugerida por Pustika, (2008) para el caso de mandarina. La cual fue modificada y adaptada al Limón, como se muestra en el Cuadro 4. Estos datos se registraron cada 15 días a partir de las aplicaciones de fertilizante de cada periodo.

Cuadro 4. Escala de daño para la evaluación de la severidad en Limón causada por HLB

INDICE DE SEVERIDAD	DESCRIPCIÓN
1	Sano
2	Menos del 20% de las hojas de una Rama con presencia de anchas cloróticas.
3	Menos del 50% de las hojas de una Rama con presencia de manchas cloróticas.
4	Hojas en ramas que presentan clorosis, engrosamiento de la vena.
5	Árbol defoliado
6	Árbol muerto

6.1.4.2 Diagnóstico de HLB en árboles de Limón.

Al inicio del experimento se realizó un muestreo de las hojas de los 54 árboles involucrados en el experimento para confirmar la presencia de HLB vía PCR-anidado.

6.1.4.2.1 PCR

La extracción de ADN se realizó a partir de 0.5 g de tejido foliar (12hojas/árbol), particularmente de la vena central, de acuerdo al protocolo reportado por Murray y Thomposon (1980). Las muestras fueron congeladas con Nitrógeno líquido y se maceraron con la ayuda de un mortero. La muestra se transfirió a un tubo falcón de 15 mL, donde se añadieron 3 mL de una solución de extracción (CTAB, NaCl, PVP-25, TRIS-HCl y EDTA). La muestra en el tubo se agitó en vortex, y 1 mL fue transferido a un tubo de 1.5 mL. Donde se incubó a una temperatura de 65°C durante 30 minutos. Posteriormente el tubo con la muestra se colocó en una centrifuga (Microfuge 22 R), a 3500 rpm por 10 min y

a una temperatura de 4°C. El sobrenadante de la muestra (900 µL) se transfirió a otro tubo de 2 mL, al cual se adicionaron 900 µL de cloroformo: isoamilico (24:1). El producto resultante, se agito en vortex y se centrifugó a 14,000 rpm, durante 5 min. 800 µL del sobrenadante fueron transferidos a un tubo eppendorf de 1.5 mL, donde el ADN se precipitó con 480 µL de Iso-propanol a una temperatura de -20°C durante 30 min. Transcurrido el tiempo se centrifugo por 20 min a 14 000 rpm, y por último, se procedió a lavar 2 veces la pastilla (ADN) con un mL de etanol al 70%. La pastilla se resuspendió en 50 µL de agua inyectable.

La identificación de *Ca. L asiaticus* se realizó mediante la técnica de PCR anidado, en un termociclador Labnet Multigene, amplificando una región del gen ribosomal 16S utilizando los oligonucleótidos **rP1** (5' ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') y **Fd1** (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') para la primera amplificación (Weisburg *et al.*, 199) y los oligonucleótidos específicos para detectar *Candidatus Liberibacter asiaticus* **O11**(5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3') y **O12c** (5' GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3') para la segunda amplificación (Jagoueix *et al.*, 1996).El primer PCR se realizó en un volumen final de reacción de 25µL utilizando concentraciones finales de 1 unidad de Taq polimerasa (PROMEGA), 0.2Mm dNTPs 1X amortiguador para PCR 5X, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.5 µM de cada oligonucleótido y 1µL de ADN. La segunda amplificación se realizó utilizando las mismas condiciones pero incorporando como ADN blanco 1µL del producto de PCR anterior. Las condiciones de amplificación en ambos casos fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización 95°C por 3 minutos; 36 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 y 30 segundos a 72°C, seguidas de una extensión final por 10 min a 72°C. Los amplicones esperados eran de 1200 pb. para ambos PCR respectivamente. En todas las reacciones con los oligonucleótidos específicos (segundo PCR), se incluyó como control positivo la amplificación de ADN plásmidico que contiene un inserto de la región del gen ribosomal 16S de *Ca. L asiaticus*, donada por el Dr. Ramiro González Garza. Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en agarosa al 2% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV (BIORAD).

6.1.4.3 Determinación de silicio en tejido foliar de árboles de Limón Persa.

Para la determinación de la concentración de silicio en los diferentes tratamientos de fertilizante y testigo, se realizaron 8 muestreos en 2014. El muestreo 1 se realizó a las 24h después de la aplicación de silicio y los siete posteriores a los 2, 3, 4, 5, 12, 19 y 35 días respectivamente.

Para la determinación de silicio, previamente fue necesario convertir el tejido vegetal en polvo, el cual fue deshidratado por calor por medio de una estufa con una temperatura de 65⁰C. Posterior a esto se prosiguió con la digestión como a continuación se describe: se utilizaron 100 mg del tejido molido y se colocó en un tubo falcón de 50 mL, en una estufa marca Felisa a una temperatura de 60⁰C durante 15 minutos. Posteriormente a esto se añadieron 5 gotas de alcohol octílico. Se añadieron 2 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Se incubaron a 95⁰C por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se añadieron 4 mL de NaOH al 50%. Posteriormente se volvieron a incubar los tubos en el horno a 95⁰ C por 4 horas. Durante el transcurso de ese tiempo, las muestras se sometieron a una agitación cada 15 min. Enseguida, se añadió un mL de 5 Mm fluoruro de amonio. Luego se añadió agua des ionizada a los tubos para hacer un volumen final de 50 mL. A partir de la digestión se realizó la evaluación de colorimetría como se describe a continuación: se tomaron 2 ml de alícuota y se colocó en tubos falcón de 50 ml, a los que se añadieron 10 ml de ácido acético al 20%, los cuales fueron agitados en vortex por 10 segundos, posterior a esto, se adicionaron 4 ml de 0.26 M molibdato de amonio y se dejaron reposar por 5 min. Se agregaron 2 ml de ácido tartárico agitando los tubos por 10 segundos y se añadieron 2 ml de ANSA, y la incorporación de ácido acético al 20% para aforar a un volumen de 30 mL. Adicionalmente se prepararon soluciones estándar de 0, 0.5, 1, 2, 5 y 10 µg mL para realizar la curva de calibración. Se prosiguió con toma de lectura a 630nm con ayuda de un espectrofotómetro Genesys 10 Bio.

6.1.4.4 Análisis foliar de árboles de Limón Persa

De cada uno de los 54 árboles se tomaron muestras de tejido foliar siguiendo la metodología de muestreo previamente descrita para cítricos (referencia). Las muestras de hojas fueron enviadas al laboratorio AGQ establecido en Guadalajara, donde se determinó el contenido de macronutrientes (N, P) y Micronutrientes (Mg, Zn y Fe) en los diferentes tratamientos. La determinación de los distintos nutrientes se hizo mediante Espectroscopía de plasma ICP-OES.

6.1.4.5 Determinación de Rendimiento en campo de Limón Persa

En campo se registró el rendimiento en base a la cantidad en Kg/árbol en cada uno de los 9 árboles seleccionados tratamiento. En cada cosecha, se evaluaron dos parámetros siendo uno de ellos la cantidad de frutos totales (peso total en Kg por árbol) y el segundo de cantidad de fruta clasificada como de primera, en kilogramos. Esta última variable se registró debido a que la fruta del productor tiene mercado de exportación y para ellos la fruta de primera tiene mayor precio. Los periodos de cosecha abarcaron de marzo- abril 2013 y 2014.

6.1.4.6 Determinación de rendimiento en campo de Limón Mexicano

En campo se registró el rendimiento en base a la cantidad de la fruta por árbol. Para ello se seleccionaron 4 repeticiones con 3 árboles cada una de ellas por tratamiento. En cada cosecha se registró el peso en Kg por árbol. El periodo de cosecha abarco de marzo-abril 2014, para esa fecha habían transcurrido 7 meses después de la primera aplicación de fertilizantes.

6.1.4.6.1 Crecimiento del árbol.

a) Altura y diámetro de la copa del árbol: a los árboles seleccionados se les midió el diámetro y su altura de copa. La altura se registró por medio de un tubo PVC de 3 m graduado en centímetros. El tubo se colocó sobre el piso, junto a la base del tronco y se midió hasta las últimas ramas en la parte alta de la copa. Utilizando esta misma técnica, el diámetro de copa se registró pasando el tubo entre el follaje en la parte media del árbol en sentido horizontal.

b) Volumen de copa: Se determinó mediante las medidas de altura y diámetro del árbol, con la siguiente fórmula: $VC = (2.04) (\text{altura del árbol})^2 (\text{diámetro})$

c) Eficiencia de rendimiento (kg/m^3):

La eficiencia de rendimiento se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$EP = (\text{kg. Árbol})/VC$$

6.1.4.7 Calidad interna de frutos en Limón Persa.

Para la evaluación de calidad interna de fruto se midieron las siguientes variables a) contenido de ácido cítrico, b)pH, y c)grados Brix. Estos parámetros se registraron a partir de frutos conservados en refrigeración a una temperatura de 10 a 12⁰C durante 8 días después de su cosecha. De cada tratamiento se seleccionaron al azar 10 frutos por árbol. Los frutos se clasificaron por tamaño midiendo su longitud y diámetro. La longitud se midió con un vernier de metal de la base del pedúnculo al pezón del fruto, en tanto que para obtener el diámetro se midió la parte ecuatorial del fruto. También se registraron el color y apariencia del fruto. Para cuantificar el contenido de acidez (ácido cítrico), se empleó el método de titulación. A partir del jugo de los frutos seleccionados se extrajeron 6 mL de este aforando con agua destilada a un volumen de 50 ml. Con la ayuda de una bureta se fue añadiendo NaOH, hasta alcanzar un pH de 7.5 para determinar el gasto y poder calcular el porcentaje de ácido cítrico con la siguiente formula.

(Gasto en mL de NaOH) (Normalidad de Hidróxido (factor 6.4)

mL de la muestra

Para determinar el pH y grados Brix se obtuvieron muestras del jugo restante anteriormente mencionado. El pH se midió con instrumento digital HANNA HI8633 y el contenido de grados Brix con un refractómetro digital de bolsillo ATAGO CO., LDT.

6.1.4.8 Contenido de Clorofila en hojas de Limón Persa y Mexicano

Se realizaron determinaciones de clorofila utilizando un Medidor de clorofila – Spad 502 el cual determina la cantidad relativa de clorofila presente mediante la medición de la absorción de luz en la hoja en dos regiones de longitud de onda; en las zonas roja y cercanas a infrarroja. Utilizando estas dos transmisiones el medidor calcula el valor numérico SPAD que es proporcional a la cantidad de clorofila presente en la hoja. En el presente trabajo se muestrearon 8 hojas de cada árbol 54 árboles en Limón Persa y 72 árboles de Limón Mexicano. Las hojas se recolectaron de los cuatros puntos cardinales del árbol teniendo en cuenta que todo se realizó por la parte media del árbol como se muestra en la Figura 6. Las hojas recolectadas fueron hojas maduras, sin daños aparentes.

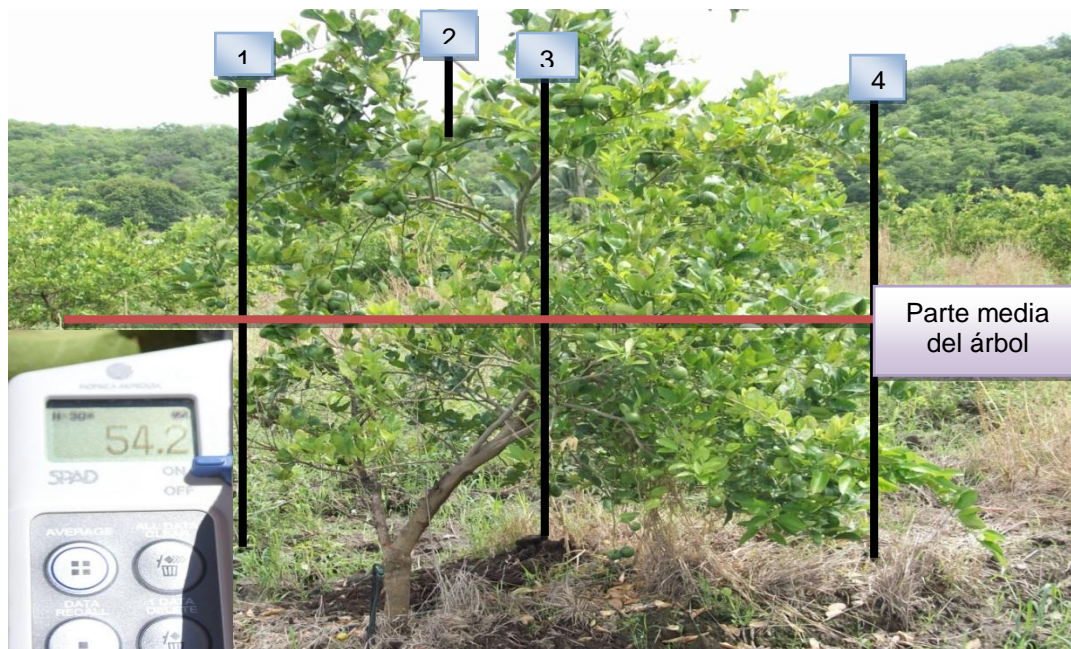


Figura 6. Técnica empleada para la toma de datos de clorofila en árboles de Limón.

6.1.4.9 Condición del tejido e histología de hojas de Limón Persa conservadas en refrigeración.

Para el registro de esta variable se seleccionaron los árboles únicamente de los tratamientos 4 (fertilización 43,4,20 más la adición de micronutrientes y Silicio) y el Testigo, de los cuales se comprobó que estaban involucrados árboles sanos y árboles enfermos. De cada tratamiento, se tomaron 50 hojas maduras de brotes terminales. Las hojas se mantuvieron en refrigeración a 8-10⁰C durante 36 días. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de las venas de las hojas, a fin de determinar el avance de la acumulación de almidón, como resultado de la presencia de la bacteria, y así como para determinar la influencia del tamaño del conducto del floema y la duración en post-cosecha. Se tomaron 3 áreas para tal determinación: la primera correspondió a la zona transición entre el área clorótica y el área verde de las hojas con síntomas de moteado, la segunda de la parte totalmente clorótica y la tercera correspondió al área sana de las hojas. Las muestras fueron preparadas para microscopía de luz, y posteriormente fueron

cuidadosamente diseccionadas con un micrótopo y a su vez montadas en portaobjetos teñidas con azul metileno, observándose en el microscopio a 40 y 100X (Achor *et al.*, 2010).

6.1.5 Análisis estadísticos

6.1.5.1 Limón Persa.

Para el análisis de la mayoría de variables se utilizó un diseño experimental bloques al azar con 6 tratamientos y 9 repeticiones, considerando un árbol como unidad experimental. Para la comparación de promedios se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 95%.

6.1.5.2 Limón Mexicano

Para la evaluación del experimento consistió de un diseño experimental de bloques al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento con una unidad experimental de tres árboles por repetición. En los cuales se realizaron análisis de varianza, para proseguir con una comparación de medias por medio de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

6.2 Experimento 2. Aplicación de Inductores de resistencia en dos etapas y dos condiciones en Limón Persa

6.2.1 Manejo del experimento

6.2.1.1 Árboles de seis años establecidos en condiciones de campo.

Este ensayo se llevó a cabo en una huerta de Limón Persa de San Martín Hidalgo, Jal. Los árboles de seis años de edad establecidos en campo presentaban diferentes niveles de severidad de HLB. Los productos seleccionados se presentan en el Cuadro 5.

Con el objeto de comparar diferentes productos etiquetados como inductores de resistencia en la incidencia de HLB, en árboles de seis años de edad establecidos en campo, este ensayo se llevó a cabo con árboles que presentaban diferentes niveles de severidad de HLB.

6.2.1.2 Árboles de seis meses bajo condiciones de invernadero

En el presente trabajo para inducir la aparición de la enfermedad bajo condiciones de invernadero se indujo mediante injertos como a continuación se describe:

- **Inducción de expresión de síntomas de HLB en hojas de Limón Persa.**

En Invernadero se utilizaron 48 árboles de Limón Persa de un año de edad, libres de HLB. Cada árbol fue injertado con ramas de Limón Persa con yemas provenientes de plantas enfermas (determinadas por PCR). El método de injerto usado fue el de yema en forma de “T” invertida. Los injertos se realizaron en dos etapas; 1) 10 días antes de la aplicación de los tratamientos descritos en el Cuadro 6; 2) 10 días después de que las plantas recibieron los tratamientos inductores de resistencia del Cuadro 6. A partir de la fecha de injertación, se determinó del número de días que transcurrieron hasta que la planta presento síntomas notorios de la enfermedad en cada una de las plantas que recibieron los distintos tratamientos de Inductores de resistencia y minerales

6.2.2 Diseño de la investigación

6.2.2.1 Tratamientos de inductores de resistencia en árboles de 6 años en campo

Cuadro 5. Productos empleados en Limón Persa para Inducir resistencia al HLB en árboles establecidos en campo.

Producto	Ingrediente activo	Dosis/L
1. Testigo	-----	-----
2. Actigard®	Acibenzolar-s-metil	30 mg
3. Regalia maxx®	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	3 mL
4. Messenger®	Harpina	450 mg

6.2.2.2 Tratamientos de inductores de resistencia en árboles de 6 meses en invernadero

Cuadro 6. Inductores de resistencia aplicados en árboles de Limón Persa previamente inoculados con HLB bajo condiciones de invernadero.

No.	Tratamiento	Producto	Ingrediente activo	Dosis/ L
1	Testigo	-----	-----	-----
2	SS	Supasilica + Na ₂ SeO ₃	Silicato de potasio + Na ₂ SeO ₃	1mL/10mg
3	S	Supasilica	Silicato de potasio	1mL
4	A	Actigard®	Acibenzolar-s-metil	15 mg
5	M	Messenger®	Harpina	0.25g
6	R	Regalia maxx®	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	1.5 mL

6.2.3 Variables evaluadas

Las lecturas de la incidencia de HLB se hicieron quincenalmente registrando el número de hojas con síntomas del HLB. El avance de severidad fue evaluado mediante la escala de daño (Cuadro 4), y corroborado mediante la técnica molecular de PCR. Variables descritas en el experimento 1.

6.2.4 Análisis Estadísticos

6.2.4.1 Limón Persa de seis años establecido en campo.

El Diseño experimental utilizado consistió en bloques al azar con 4 tratamientos y 4 repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida de 3 árboles. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

6.2.4.2 Limón Persa de seis meses establecido en invernadero.

Los experimentos en el invernadero se llevaron a cabo en un diseño completamente al azar con arreglo factorial A X B. El factor A estuvo representado por las fechas de injertación y el factor B por los productos inductores de resistencia. La comparación de medias de los tratamientos se hizo mediante la prueba Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

7. RESULTADOS

7.1. Experimento 1. Efecto de la fertilización convencional y adición de silicio

7.1.1 Índices de síntomas de HLB en el follaje en Limón Persa.

De acuerdo con la escala de daño de HLB consignada en el Cuadro 4, el índice de severidad inicial en los árboles de todos los tratamientos fue de 1 (Cuadro 7), sin embargo la enfermedad aumentó de manera progresiva a lo largo de 5 fechas de evaluación, registradas al comienzo del experimento, así como a los 2, 13, 18 y 26 meses después del establecimiento del experimento. El tratamiento 1 tuvo un índice de HLB de 0.7 a los 2 meses; en las dos fechas siguientes se incrementó con valores similares y en la fecha final (26 meses) se incrementó hasta alcanzar un valor de 2.2. Los árboles que recibieron dosis 21-2-10 (T1), y dosis 64-8-30 (T3) y dosis 43-4-20 (T-2, T-4), mostraron una tendencia similar entre ellos y en comparación con los árboles que tuvieron las dosis más bajas. En el caso de los árboles que recibieron la dosis 43-4-20 más la adición de silicio (T-4), mostraron un comportamiento similar al T-2, en el cual no se aplicó silicio, excepto en la última fecha de evaluación (26 meses), cuando el índice de HLB en T-4 fue de 2.1, en tanto que en T-2, el índice de severidad fue de 2.7. También se observa que los árboles que solo recibieron la aplicación de micronutrientes al follaje (T-5), mantuvieron un nivel de severidad final de 2.4. Finalmente en el caso de los árboles testigo que no recibieron fertilización, el índice de HLB mostró una tendencia de incremento constante del índice de severidad de la enfermedad a través del tiempo, alcanzando en la última fecha un valor de 3.6.

El inicio de severidad para todos los tratamientos fue de uno, posteriormente a los 60, 360, 510 días el índice de severidad se incrementó ligeramente en todos los tratamientos. Sin embargo al registrar el índice de severidad en la última fecha (poco más de 2 años), los síntomas de HLB aumentaron en todos los tratamientos. El incremento de severidad de HLB más notable, se registró en el testigo, seguido de los árboles con dosis 43-4-20 y dosis 64-8-30 (T2 y T3).

Cuadro 7. Índice de severidad de HLB en Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilización (San Martín, 2012-2014).

Tratamiento	Severidad inicial	Severidad final
1. 21-2-10 +* FF	1	2.16 **b
2. 43-4-20 + FF	1	2.66 ab
3. 64-8-30 + FF	1	2.50 ab
4. 43-4-20 + FF+ Si	1	2.16 b
5. FF	1	2.38 ab
6. Testigo	1	3.61 a

(*Fertilización Foliar (Mg=0.765mL, Mn=0.66mL, ZnCu=1.130mL, Fe=4.54 mL, Na₂SeO₃=20mg). **Tukey 1.6124 p= 0.5

7.1.2 Diagnóstico molecular de HLB en árboles de Limón Persa

Al realizar los análisis de laboratorio mediante la técnica de PCR previamente descrita, utilizada para corroborar la presencia de HLB en los árboles bajo estudio, se determinó que al inicio del experimento las muestras de los tratamientos resultaron negativas al HLB. Sin embargo, a los 180, se observó que los árboles con los tratamientos con dosis 43-4-20 más adición de silicio (T-4) y dosis 64-8-30 (T-3) y el testigo mostraron el 22, 44 y 22% respectivamente, de incidencia de HLB.

Cuadro 8. Porcentaje de incidencia de HLB en árboles de Limón Persa que recibieron distintos tratamientos de fertilización. HLB determinado en laboratorio mediante la técnica de PCR.

Tratamientos	Fechas				
	Feb-12	Ag-12	May-13	Oct-13	Mar-14
1. 21-2-10 + *FF	0	0	0	22.2	44.4
2. 43-4-20 + FF	0	22.2	22.2	44.4	44.4
3. 64-8-30 + FF	0	44.4	44.4	44.4	44.4
4. 43-4-20 + FF+ Si	0	0	22.2	22.2	44.4
5. FF	0	0	0	22.2	22.2
6. Testigo	0	44.4	66.6	77.7	77.7

*Fertilización Foliar (Mg=0.765mL, Mn=0.66mL, ZnCu=1.130mL, Fe=4.54 mL, Na₂SeO₃=20mg)

En la Figura 7 se presentan los geles de agarosa conteniendo el DNA de las 54 muestras correspondientes a las muestras de hojas de los árboles de Limón Persa realizadas en marzo del 2014. En la parte superior de la Figura se observa que los carriles 10, 11, 12 y 19 presentan positivo a HLB. En la parte media de la Figura las muestras positivas al HLB fueron las muestras 20, 21, 25, 26, 27,28, 29 y 30, 35, 36, 37 y 38. En la parte inferior de la Figura se observa los positivos corresponden a las arboles 40, 41, 42 y 54. Entre los 14 árboles que dieron positivo al HLB, 8 correspondieron al testigo, en tanto que los tratamientos T-1, T-2, T-3 y T-5 tuvieron tres positivos cada uno de ellos y los arboles con menor número de positivos fueron los del tratamiento T-4, con 2 positivos.

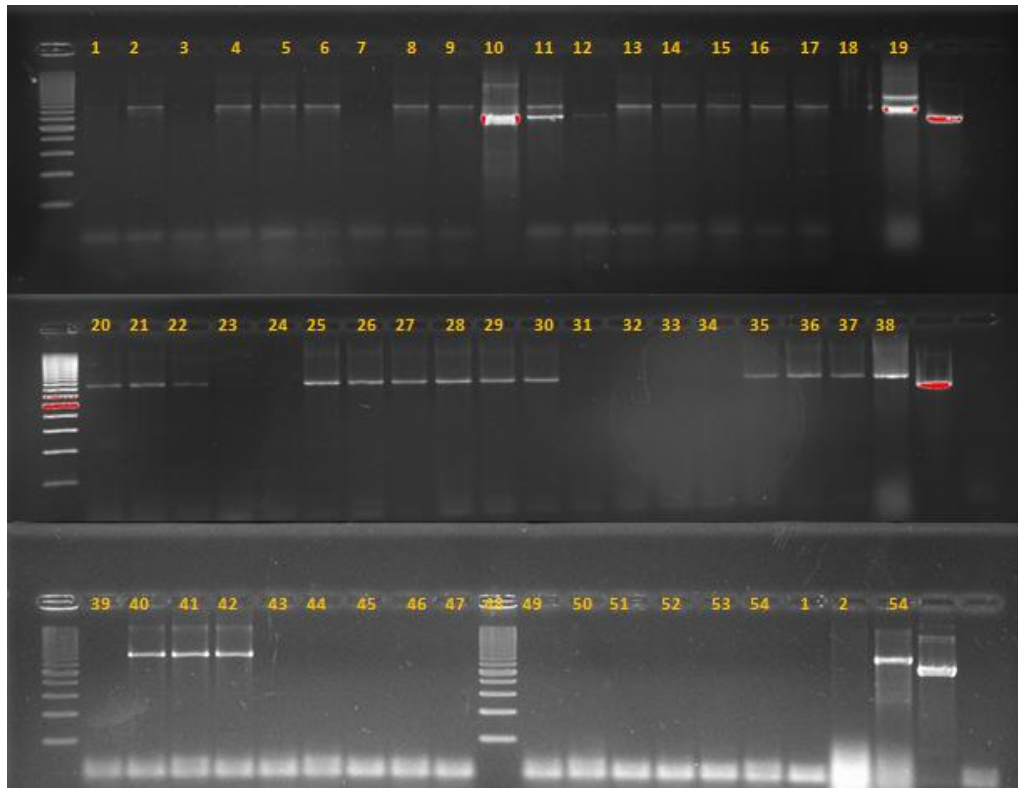


Figura 7. Gel de agarosa al 2% de PCR anidado mostrando la presencia de la bacteria *Ca. L. asiaticus* en árboles de Limón Persa con distintos tratamientos.

7.1.3 Determinación de silicio de tejido foliar en Limón

En el Cuadro 9 se presentan los valores de la concentración de silicio foliar en todos los tratamientos. Se observó un incremento en las concentraciones de este mineral a través del tiempo. Los árboles que se fertilizaron con dosis 43-4-20 más fertilización foliar más silicio (T-4), mostraron un incremento considerable del 53% (0.354), de concentración de Si, en comparación con los demás tratamientos. En contraste el testigo mantuvo las concentraciones más bajas de silicio (0.234), en las hojas durante el tiempo que duró la evaluación.

Cuadro 9. Contenido (%) de silicio en hojas de árboles de Limón Persa con diferentes dosis de fertilizante durante un periodo de 35 días.

Tratamientos	Días					promedio
	1	4	12	19	35	
1. 21-2-10 + FF	0.22	0.36	0.31	0.32	0.26	0.294 ab*
2. 43-4-20 + FF	0.35	0.16	0.40	0.22	0.30	0.286 ab
3. 64-8-30 + FF	0.30	0.34	0.30	0.18	0.30	0.284 ab
4. 43-4-20 + FF+ Si	0.26	0.32	0.29	0.37	0.53	0.354 a
5. FF	0.28	0.42	0.26	0.29	0.29	0.308 ab
6. Testigo	0.29	0.26	0.19	0.26	0.17	0.234 b

*Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (P= 0.05) de acuerdo a DMS= 0.1065.

7.1.4 Contenido de macro y micronutrientes en las hojas de Limón Persa.

Previo a la aplicación de los tratamientos de fertilización, las hojas de los árboles de Limón Persa mostraron valores bajos de Nitrógeno, sin embargo después de las aplicaciones de fertilizante la concentración de N aumentó en todos los tratamientos. Los niveles más altos de N se observaron en los árboles que recibieron dosis 43-4-20 de fertilizante, tanto con la adición de silicio (T-4), como sin la aplicación del mismo (T-2). Cabe señalar que los valores de N foliar en todos los tratamientos después de las aplicaciones se incrementaron notablemente hasta alcanzar niveles muy cercanos al óptimo en los análisis corridos a los 35 días. En cuanto al contenido de P foliar, el resultado fue similar antes y después de la aplicación de los tratamientos (Cuadro 10).

Cuadro 10. Contenido de Nitrógeno (N) y Fósforo (P) de hojas de árbol de Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilización, San Martín Hidalgo, Jal., 2014.

Tratamiento	Tiempo en días			
	N (%)		P (%)	
	1	35	1	35
1. 21-2-10 + FF	1.88	2.35 a*	0.12	0.14 bc*
2. 43-4-0 + FF	1.88	2.49 a	0.12	0.15 ab
3. 64-8-30 + FF	1.90	2.38 a	0.14	0.13 c
4. 43-4-20 + FF+ Si	1.88	2.50 a	0.14	0.14 bc
5. FF	1.88	2.10 b	0.16	0.16 a
6. Testigo	1.90	1.99 ab	0.16	0.15 ab

*Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (P= 0.05).

Se realizaron análisis nutrimentales de tejido foliar, con énfasis en los minerales como Mn, Fe y Zn los cuales se ven afectados por el HLB. En el Cuadro 11 se puede observar que todos los tratamientos mostraron un incremento en el contenido foliar de los micronutrientes en el segundo muestreo realizado a los 35 días. Las comparaciones se hicieron a base de los resultados obtenidos del último muestreo comparándolos con la cantidad que el tratamiento control presento en esa misma fecha. Para el caso de la concentración de Mn, los arboles del tratamiento T-1, mostraron un incremento de 49 ppm, el T-2 de 35 ppm, el T-3 fue de 83 ppm, y el T-5, 79 ppm. Pero el mayor incremento de Mn foliar, se observó en los arboles del tratamiento T-4, con 111 ppm.

En el caso del contenido de Zn en el follaje, también se presentaron incrementos en la última etapa de evaluación: en los arboles del T-1, el Zn presentó un incremento de 26 ppm, el T-2 mostró un decremento en comparación con el testigo de 5 ppm, el T-3, se incrementó hasta llegar a 31 ppm, el T-4 mostró un incremento de 49 ppm, el T-5 presentó un incremento mayor a los demás tratamientos, con 159 ppm y el testigo mostro una concentración de 39 ppm.

En el caso de Fe, el T-1 presentó un incremento hasta llegar a 61 ppm, el incremento en el T-2 alcanzó 23ppm, el T-3 con 172 ppm, el T-4 presenta un incremento de 171 ppm, el T-5 de 214 ppm. En cambio el testigo mostró una concentración de este mineral de 143 ppm.

Cuadro 11. Contenido de Manganeso (Mn), Zinc (Zn) y Hierro (Fe) de hojas de árbol de Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilización. San Martín Hidalgo, Jal., 2014.

Tratamiento	Tiempo en días					
	Mn(ppm)		Zn(ppm)		Fe(ppm)	
	1	35	1	35	1	35
1. 21-2-10+ FF	85	108 bc*	44	65 b*	160	204 b*
2. 43-4-20 + FF	56	94 cd	49	34 b	161	166 b
3. 64-8-30 + FF	118	142 ab	42	70 b	136	315 a
4. 43-4-20 + FF+ Si	64	160 a	33	88 ab	139	314 a
5. FF	60	138 ab	32	198 a	131	357 a
6. Testigo	40	59 d	30	39 b	181	143 b

Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (P= 0.05) de acuerdo a DMS.

7.1.5 Efectos de los tratamientos de fertilización en el rendimiento y calidad externa de fruta de Limón Persa.

En el Cuadro 12 se muestra que todos los tratamientos de fertilización superaron al testigo, sin embargo el tratamiento que propició el mayor rendimiento de fruta cosechada durante la primavera, fue aquel donde se aplicó la adición de silicio (T-4), seguido del tratamiento 3 y tratamiento 1. En este mismo Cuadro se puede observar que los tratamientos de fertilización incrementaron en más del 50% la cantidad de fruta de exportación en comparación con el testigo. Aunque estos también tienden a producir una cantidad considerable de frutos para el mercado nacional.

Cuadro 12. Rendimiento de árboles de Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilizante, Marzo, 2013.

Tratamiento	Total	Kg Exportación	Kg Nacional
1. 21-2-10+ FF	20.04 ab*	13.64 a**	6.40
2. 43-4-20 + FF	13.71 ab	8.61 ab	8.61
3. 64-8-30 + FF	20.68 a	14.15 a	6.53
4. 43-4-20 + FF+ Si	22.58 a	14.18 a	8.40
5. FF	9.27 b	5.85 b	3.42
6. Testigo	9.33 b	4.28 b	5.05

Total*Tukey 10.89 p=0.05, Exportación**Tukey 8.59 p=0.05

En el Cuadro 13 se presentan los datos de la cosecha registrada durante el mes de abril del 2013. Aunque en general el rendimiento de Limón disminuyó con respecto a la cosecha de marzo, claramente se observa que todos los tratamientos de fertilización involucrados en el experimento superan al testigo. Sin embargo presentaron diferencias los tratamientos con dosis 43-4-20 (T-2) así como dosis 64-830 (T-3) y dosis 21-2-10 (T-1) que produjeron un 19,33 y 43% respectivamente menos que el tratamiento con dosis 43-4-20 más la adición de silicio (T-4).

De manera similar, la dosis 43-4-20 más la adición de silicio (T-4), propició un incremento en la producción de fruta de exportación. Por eso es de llamar la atención que en comparación con la dosis 43-4-20 sin la adición de silicio (T-2), el rendimiento es menor en un 24% en contraste con el tratamiento antes mencionado (T4).

Cuadro 13. Rendimiento de árboles de Limón Persa con diferentes tratamientos de fertilizantes. Abril, 2013.

Tratamiento	Total	Kg Exportación	Kg Nacional
1. 21-2-10 + FF	11.26 ab *	7.48 ab**	3.78
2. 43-4-20 + FF	16.86 ab	10.81 ab	6.05
3. 64-8-30 + FF	14.41 ab	10.56 ab	3.85
4. 43-4-20 + FF+ Si	21.04 a	13.78 a	7.26
5. FF	9.48 ab	7.06 ab	2.42
6. Testigo	7.52 b	4.92 b	2.60

Total*Tukey 12.81 p=0.05, Exportación**Tukey 8.18 p=0.05

Para el mes de mayo del 2014 (Cuadro 14) los árboles que recibieron la dosis 43-4-20 más fertilización foliar y silicio (T4), continuaron como el tratamiento que mayor influencia ejerció en rendimiento total, siendo estadísticamente similar a los demás tratamientos a excepción del testigo y el tratamiento con solo fertilización foliar (T-5), que registraron un rendimiento bajo en la fecha antes mencionada.

De manera similar a la cosecha del mes de abril del 2013, en mayo del 2014 se registró más producción de fruta de exportación en todos los tratamientos, sin embargo, cabe mencionar que el tratamiento con mayor rendimiento fue el tratamiento con dosis 43-4-20 más fertilización foliar y silicio (T-4). Aunque, en abril de 2013, el tratamiento con

dosis 43-4-20 sin Silicio (T-2), fue de un menor volumen de producción, sin embargo para esta fecha registrada se obtuvo una cantidad considerable de fruto.

Cuadro 14. Rendimiento de Limón Pera obtenido de diferentes tratamientos de fertilizantes. Mayo, 2014.

Tratamiento	Total	Kg Exportación	Kg Nacional
1. 21-2-10 + FF	13.83 ab*	9.54 ab**	4.29
2. 43-4-20 + FF	14.36 ab	9.64 ab	4.72
3. 64-8-30 + FF	14.92 a	10.68 a	4.24
4. 43-4-20 + FF+ Si	18.08 a	11.59 a	6.49
5. FF	8.02 b	5.68 bc	2.34
6. Testigo	8.03 b	4.74 c	3.29

Total*Tukey 6.71 p=0.05, Exportación**Tukey 4.46 p=0.05

7.1.6 Efecto de tratamientos de fertilizantes en la calidad interna de frutos.

La calidad de la fruta fue evaluada en los años 2013 y 2014, y los resultados se presentan en el Cuadro 15. Se presentó una disminución en el porcentaje de acidez en contraste con los frutos afectados con HLB, los cuales reflejaron mayor acidez. Para el caso del pH, los frutos con HLB tuvieron mayor pH. Llama la atención que en el primer año, el tratamiento T-4, (dosis 43-4-20 de fertilizante + fertilización foliar + silicio) obtuvo el valor más elevado de grados brix (9.7), a diferencia de los demás tratamientos. Para el segundo año, todos los tratamientos disminuyeron la concentración grados brix a excepción del tratamiento T-2 (dosis 43-4-20 sin Silicio) que aumento 0.166.

Cuadro 15. Evaluación de las variables de Calidad Interna.

Tratamientos	Variables de calidad					
	% acidez		pH		Grados Brix	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014
1.21-2-10+ FF	0.204	0.523	2.078	2.275	8.9	9.183
2.43-4-20+ FF	0.209	0.571	1.91	2.333	8.8	8.966
3.64-8-30 + FF	0.204	0.473	1.998	2.233	9	9.188
4.43-4-20+ FF+ Si	0.189	0.475	1.984	2.283	9.7	9.144
5. FF	0.215	0.595	2.001	2.308	9.4	8.883
6. Testigo	0.262	0.67	1.971	2.25	9.5	9.2
7. Testigo HLB	0.786	0.986	2	2.2	8.75	8.65

7.1.7 Contenido de Clorofila en hojas de Limón Persa

En el Cuadro 16 se muestran las fechas en las que se evaluó el contenido de clorofila en los distintos tratamientos. En abril del 2013 la mayor cantidad de clorofila en las hojas se presentó en el T-3, en el cual se adicionó la mayor cantidad de nitrógeno y consecuentemente se presentó un incremento notable en el contenido de clorofila foliar, aunque este tratamiento resultó estadísticamente similar a la dosis 43-4-20 con si (T-4) y 43-4-20 sin silicio (T-2). El testigo y la dosis 21-2-10 de fertilización (T-1), mostraron valores más bajos de clorofila foliar. Durante las lecturas efectuadas en el mes de octubre del 2013, la tendencia que siguieron los tratamientos fue similar a la de abril del mismo año. En lectura registrada en el mes de marzo del 2014, se observó que el contenido de clorofila en las hojas fue estadísticamente igual en todos los tratamientos, a excepción del testigo que mostró los valores más bajos. Sin embargo se compararon árboles fuera del experimento que contienen un nivel de severidad de HLB relativamente alto, los cuales presentaron un contenido de clorofila mucho más bajo en comparación con los testigos dentro del experimento.

Al comparar los valores de clorofila entre el testigo, las dosis 43-4-20 de fertilizante + silicio y con un testigo positivo de HLB se observó que el daño causado por la enfermedad contribuyó a la reducción de la cantidad de clorofila foliar entre un 30 -34.6%, 35.4-39.9% y 36.3-43.7% con respecto a los testigos y los tratados con dosis 43-4-20 más adición de silicio, durante las lecturas abril 2013, octubre 2013, y marzo 2014, respectivamente (Cuadro 16).

Cuadro 16. Contenido de Clorofila en hojas de Limón Persa (Unidades spad) sometidas a distintos tratamientos de fertilizante en tres épocas.

Tratamiento	Abril 2013	Octubre 2013	Marzo 2014
1. 21-2-10 + FF	66.19 bc*	71.26 bc*	71.00 a*
2. 43-4-20 + FF	70.67 abc	73.37 ab	71.10 a
3. 64-8-30 + FF	73.99 a	73.98 a	71.69 a
4. 43-4-20 + FF+ Si	71.08 ab	73.65 ab	71.34 a
5. FF	63.59 c	70.45 cd	69.83 a
6. Testigo	66.36 bc	68.57 d	63.10 b
7. Testigo con HLB	46.50 d	44.30 e	40.20 c

Valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes (P= 0.05) de acuerdo DMS=(7.0965),(2.5690),(4.4354).

7.1.8 Condición del tejido e histología de hojas conservadas en refrigeración.

Al observar la apariencia física e histológica de las hojas de Limón Persa, de los árboles testigo y los que recibieron el tratamiento con dosis 43-4-20 más fertilización foliar más silicio (T-4), almacenadas por 36 días en refrigeración a 10° C, se observó que las hojas del testigo fueron más susceptibles a sufrir daños de quemaduras por las bajas temperaturas. En contraste con las hojas de los árboles con el tratamiento antes mencionado donde, se observó que no fueron severamente afectadas por las bajas temperaturas. En la Figura 10 se puede observar que el tamaño del floema en hojas del tratamiento control (testigo) es de tan solo 12.33 micras, mientras que en el caso de la hoja tratada con silicio muestra un incremento del mismo, con 100.25 micras.

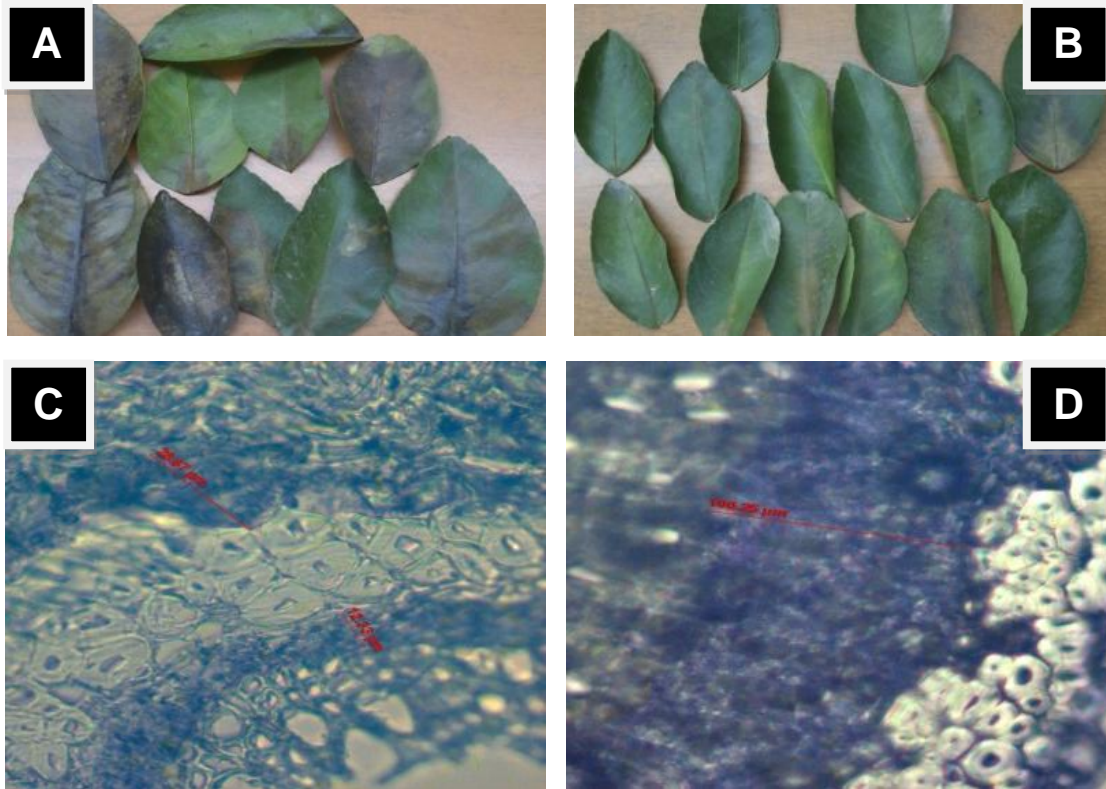


Figura 8. Apariencia e Histología de hojas de Limón Persa después de 30 días de refrigeración A) Hojas de árboles testigo B) Hojas de árboles de Limón tratados con fertilizante y silicio, C) Nótese el floema más reducido en hojas testigo. D) Tamaño del Floema de hojas de Limón con tratamiento fertilizante y silicio.

7.1.9 Limón Mexicano

7.1.9.1 Índices de HLB en el follaje de Limón Mexicano.

En el experimento establecido con árboles de Limón Mexicano en Tecomán, Col., la incidencia de síntomas de HLB en hojas de Limón Mexicano, siguió un comportamiento similar al Limón Persa en Jalisco. Al inicio del experimento la incidencia de HLB en árboles fue media con un nivel de severidad de 2.5 y similar en los arboles del experimento (Figura 12). Para la segunda fecha y tercera fecha, se incrementó la incidencia de daño en la mayoría de los tratamientos, aunque en los árboles testigos (T-6), así como en donde solo se aplicó fertilización foliar (T-5), el nivel de severidad de HLB se incrementó hasta 3.0 a 3.5 %. En estas mismas segunda y tercer fechas, los valores de HLB se mantuvieron bajos en los tratamientos donde se aplicó NPK + Si 10mL con y sin fertilización foliar. Para la cuarta fecha, los árboles que recibieron el tratamiento NPK + FF+Si 10mL, mantuvieron los valores de severidad de HLB más bajos, del 2.5 %. En contraste, los árboles del testigo y el tratamiento únicamente con fertilización foliar mostraron los mayores índices de daño por HLB, con un 4.2%.

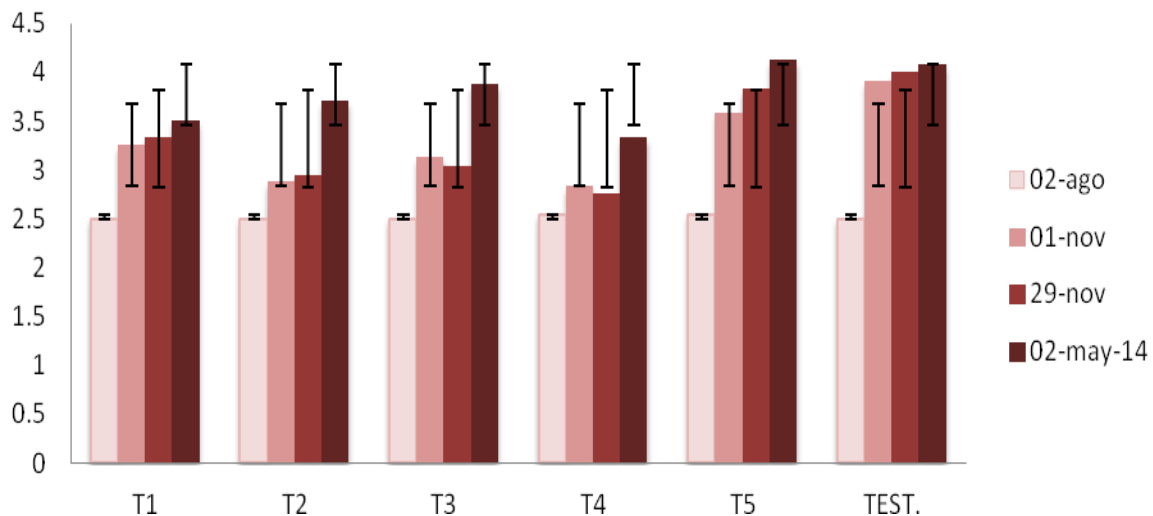


Figura 9. Dinámica de severidad de HLB en Hojas de árboles de Limón Mexicano tratados con fertilización convencional y aplicación de silicio en diferentes dosis.

Al comparar los resultados de severidad de HLB únicamente al inicio y final del experimento, se observó que los árboles con NPK + FF+ Si 5 mL mostraron un incremento reducido en la severidad de HLB de 0.64, lo que representa un 57.1% en comparación con el 100% del tratamiento testigo. La menor severidad de HLB en las hojas se observó al aplicar NPK+FF+ Si 10mL, que presento solo un 32.2% de incremento. Este resultado significó una reducción en la severidad de la enfermedad.

7.1.9.2 Determinación de Rendimiento

En el Cuadro 16 se presentan los datos de rendimiento por árbol los cuales fue posible registrarlos únicamente durante la época de primavera. Se observa que durante la primera cosecha realizada en marzo del 2014, no se observó diferencia en los tratamientos y el testigo. Para la segunda cosecha registrada en el mes de abril del 2014, los tratamientos de NPK+Si 10mL (T-3), NPK+FF+Si 10mL, y FF (T-5) incrementaron ligeramente la producción con respecto al testigo. Al promediar las tres cosechas todos los tratamientos superaron al testigo, aunque los valores más altos se obtuvieron con NPK+FF+Si 10mL (T-4) y FF (T-5).

Cuadro 17. Rendimiento de árboles de Limón Mexicano con diferentes tratamientos de silicio.

Tratamientos	Rendimiento (Kg/ árbol)				Eficiencia de rendimiento(kg)/m ³ de copa
	1ra cosecha	2da cosecha	3ra cosecha	Cosecha promedio	
1.NPK+Si 5mL	3.88	4.8	3.44	4.04 ab*	0.5915
2.NPK+FF+Si 5mL	3.5	4.42	3.96	3.95 ab	0.4718
3.NPK+Si 10mL	4.63	5.39	2.99	4.33 ab	0.7376
4. NPK+ FF+Si 10mL	4.6	5.43	3.89	4.64 a	0.8849
5. FF	4.75	5.85	3.13	4.57 a	0.8080
6. Testigo	3.31	4.13	1.64	2 b	0.4946

*DMS= 0.9828 p=0.05

7.1.9.3 Contenido de Clorofila en hojas de Limón Mexicano.

El contenido de clorofila en las hojas de Limón Mexicano vario de 48.7 a 62.7 unidades Spad como se observa en el cuadro 18 en la primer fecha de lectura y de 38.2 a 46.1 en la segunda lectura. Los valores promedio más altos estuvieron asociados a los tratamientos de NPK+FF + en dosis de Si 5mL (T-2) y dosis de Si 10mL (T-4), así como el tratamiento únicamente de NPK+Si 10mL sin FF (T-3).

Cuadro 18. Contenido de Clorofila (Unidades Spad) en hojas de árboles de Limón Mexicano con tratamientos de fertilización convencional y silicio.

Tratamiento	Diciembre 2013	Mayo 2014	Promedio
1.NPK+ Si 5mL	50.63	46.06	48.34 ab*
2.NPK+FF+Si 5mL	58.41	43.91	51.16 a
3.NPK+Si 10mL	60.60	45.13	52.86 a
4.NPK+ FF+Si 10mL	62.79	47.69	55.23 a
5. FF	48.70	38.23	43.46 b
6. Testigo	53.89	42.32	48.10 ab

DMS= 7.5232 P= 0.05

7.2. Experimento 2. Efecto en la aplicación de inductores de resistencia en árboles de Limón Persa con/sin síntomas de HLB en campo.

7.2.1 Índices de HLB en follaje en árboles de Limón Persa en condiciones de campo

Los Tratamientos de inductores de resistencia aplicados al follaje y un efecto sobre la severidad de HLB se presentan en el Cuadro 19.

Los árboles que recibieron la aplicación de Harpina fueron los que mostraron los menores índices de severidad de daño por HLB a través de las diferentes fechas de evaluación. Los árboles más afectados fueron aquellos que recibieron los tratamientos de acibenzolar-s- metil y *Reynoutria sachalinensis* respectivamente.

Al considerar el promedio de las 4 fechas se confirma que los tratamientos acibenzolar-s- metil y *Reynoutria sachalinensis* son iguales entre sí con un nivel de severidad más alto inclusive que el testigo. Estos tratamientos fueron superados significativamente por Harpina el cual resultó con un nivel de severidad más bajo (Cuadro 19).

Cuadro 19. Severidad de HLB en árboles de Limón Persa con Inductores de resistencia en condiciones de campo.

Fechas de evaluación de severidad	TRATAMIENTOS			
	Testigo	Acibenzolar-s- metil	<i>Reynoutria sachalinensis</i>	Harpina
Marzo 2013	1.9	2.2	2.0	1.4
Abril 2013	2.2	2.4	2.3	1.8
Mayo 2013	2.1	2.3	2.3	1.5
Abril 2014	2.1	2.4	2.4	1.7
Promedio	2.0b*	2.3a	2.2a	1.6c

*TUKEY 0.1449 P= 0.05

7.2.2 Aplicación de inductores de resistencia para el control de HLB en condiciones de invernadero.

7.2.2.1 Inducción de expresión de síntomas de HLB en hojas

En el Cuadro 20 se representa la severidad de daño de HLB en plantas de Limón Persa tratados con inductores de resistencia 10 días antes y 10 días después de haberse inoculado con yemas infectadas de HLB.

Se registraron datos, un mes después de la inoculación del patógeno a partir de diciembre (30 días), continuando en enero (60 días) febrero (120 días) y en el mes de abril- mayo 2014 (150 días después de los injertos) se presentaron síntomas característicos de HLB, calificados según la escala de daño establecida en el presente trabajo (Cuadro 4). Como se observa en el Cuadro 20, los árboles que presentaron mayor índice de severidad, fueron los árboles que recibieron la aplicación de Acibenzolar-s-metil en ambos ensayos (10 días antes y 10 días después de la inoculación de HLB), con 2.31 y 2.56 respectivamente. También se observó que los testigos mostraron el mismo nivel de severidad de 2.25, para ambos ensayos. Los árboles que no mostraron síntomas visibles de HLB, fueron aquellos tratados con *Reynoutria sachalinensis*, ya que en 150 días después de las aplicaciones estos seguían con 0% de síntomas, tanto en plantas inoculadas 10 días antes como 10 días después de las inoculaciones. Otro tratamiento promisorio con el cual los árboles presentaron una mínima severidad de HLB fue el Silicio. Con aplicaciones de Silicio en el ensayo 10 días antes de las inoculaciones, hubo 0% de índice de severidad de HLB, y las aplicaciones de Silicio en el ensayo 10 días posteriores a la inoculación, apenas alcanzaron valores de severidad de 1.12. También se observó que el índice de severidad. En general los productos usados como inductores de resistencia fueron más efectivos cuando se aplicaron en el ensayo 10 días antes de las inoculaciones en contraste con el segundo ensayo.

Cuadro 20. Severidad de HLB en plantas de Limón Persa tratadas con Inductores de Resistencia 10 días antes y 10 días después de la inoculación de yemas infectadas bajo condiciones de invernadero, 2014.

Tratamientos	10 días antes de la inoculación	10 días después de la inoculación
1. Testigo	2.25 *ab	2.25 ab
2. Si +Se	1.06 c	1.50 bc
3. Si	1.00 c	1.12 c
4. Acibenzolar-s-meti	2.31 ab	2.56 a
5. Harpina	1.25 c	1.62 bc
6. <i>Reynoutria sachalinensis</i>	1.00 c	1.00 c

*Tukey 0.9231 p=0.5

7.2.2.2 Incidencia de HLB a partir de la expresión de la enfermedad

En la Figura 12 podemos observar el nivel de severidad de árboles tratados con inductores de resistencia que desarrollaron síntomas de HLB en diferentes períodos. Se observó que los árboles testigo mostraron presencia de síntomas a partir del día 120 en ambos experimentos (antes del injerto así como después del injerto) con un nivel de severidad de 2 con un 75% de árboles que presentan estas condiciones siendo un 100% de árboles con sintomatología al día 150 como se observa en la figura 13; con un nivel de severidad del 3, así mismo los árboles tratados con Acibenzolar-s-metil, en el experimento antes del injerto mostraron un comportamiento similar al testigo, sin embargo, los árboles tratados con Harpina, al día 120 presentaron el 50% de plantas con síntomas en un nivel de severidad de 1.5 de HLB, manteniendo el mismo porcentaje al día 150. En el caso de los tratamientos como T-3 (Si), T2 (Si+Se), no presentaron síntomas de HLB a lo largo de los 150 días que duró el experimento por lo que resultó la opción más eficaz para prevenir la incidencia de esta enfermedad bajo condiciones de invernadero.

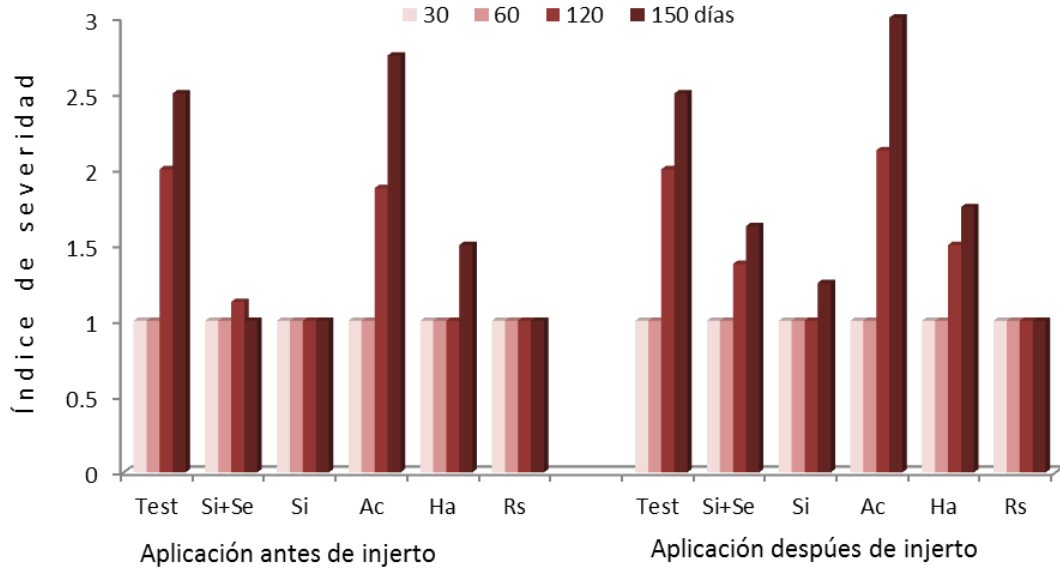


Figura 10. Severidad de HLB en Limón Persa en condiciones de invernadero aplicado con diferentes inductores de resistencia antes y después de inoculado mediante injerto.

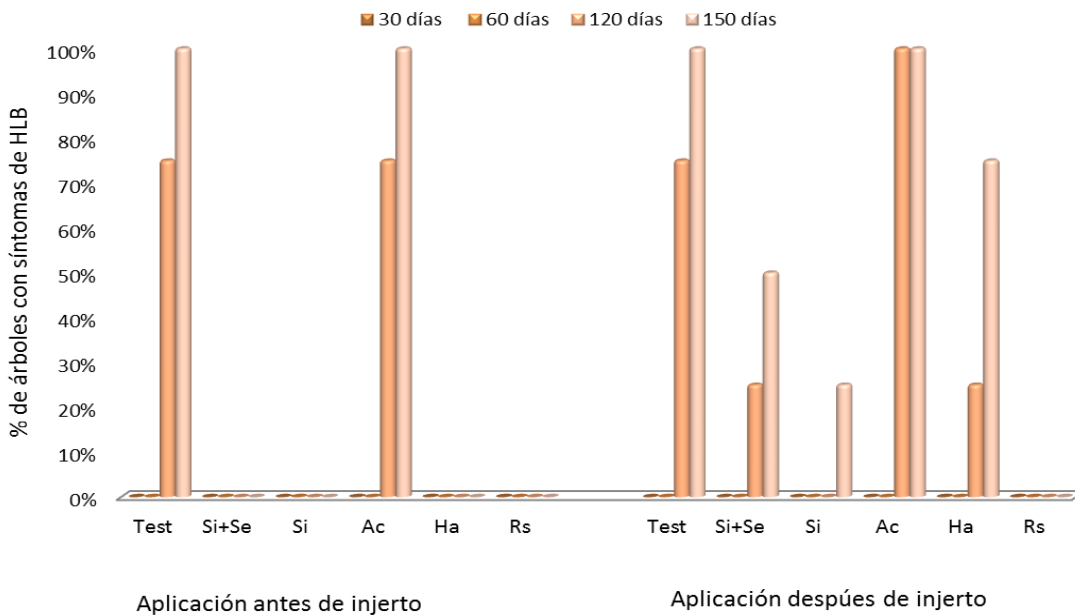


Figura 11. Porcentaje de árboles aplicados con diferentes inductores de resistencia antes y después de inoculados mediante injerto que expresan síntomas de HLB en los distintos días de evaluación.

Para el caso del experimento después de la inoculación en la Figura 12 se puede observar el nivel de severidad HLB. Los síntomas de HLB aparecieron a los 120 días tanto en el testigo como en árboles tratados con inductores. En la figura 13 se puede observar que la enfermedad fue progresiva presentándose en un 75% a 100% de los árboles en el testigo a los 120 y 150 días, respectivamente, con un nivel de severidad de 2.5 (Figura 12). El uso de Acibenzolar-s-metil, no tuvo ningún efecto sobre la enfermedad ya que el 100% de las plantas mostraron síntomas a partir del día 120, con un nivel de severidad de 2.125 incrementando el nivel de severidad a 3 a partir del día 150. Harpina obtuvo un porcentaje de plantas con síntomas del 75% a los 120 días manteniendo la misma cantidad al día 150 sin embargo el nivel de severidad aumento de 1.5 a 1.75 al día 150. Los árboles que recibieron las adición de silicio *selenio presentaron un avance progresivo del 25 al 50% a los 120 y 150 días, con un nivel de severidad de 1.3 a 1.6 respectivamente. La aplicación de silicio mostro una alta eficacia, ya que únicamente el 25% de plantas mostraron síntomas de HLB a 150 días después de la inoculación, con un nivel de severidad de 1.25 siendo este el comienzo de síntomas. No obstante el mejor tratamiento fue *Reynoutria sachalinensis*, ya que los árboles que recibieron este tratamiento no mostraron síntomas de HLB en el periodo que duro el experimento.

8 DISCUSIÓN

Los árboles de Limón Persa injertados sobre Limón *volkameriana* plantados sobre un suelo de tipo arcilloso (características mencionadas en el Cuadro 2) respondieron favorablemente a las aplicaciones de fertilización al propiciar un cambio en el follaje, de un aspecto clorótico a un verde intenso, así como un mayor rendimiento y una aceptable calidad del fruto. Estos resultados corroboran reportes previos realizados en diferentes tipos de suelo y en un cultivo de mandarina (Pustika, 2008), así como en distintos porta-injertos y sin la presencia del HLB (Medina *et al.*, 1993). Aunque en este trabajo no se pretendió obtener la dosis óptima de fertilización para el cultivo del Limón, se observó que en la medida que se incrementaron las cantidades de los distintos nutrientes, especialmente de N, P, y K, también aumentaron el rendimiento y calidad de la fruta, no obstante que el periodo de tiempo que duró este experimento fue de solo dos años, para llegar a determinar la dosis óptima, para la cual se requiere de una observación prolongada por varios años más.

En el presente trabajo la aplicación de una dosis media de N, P, y K, más la adición de micronutrientes foliares favorecieron la respuesta de los árboles en diferentes parámetros

1) En relación con la expresión de síntomas de HLB en el follaje:

La aplicación de fertilización de N, P y K más la adición de micronutrientes foliares disminuye la severidad de HLB en comparación con los árboles testigo, resultados similares fueron encontrados previamente en otras investigaciones (Pustika, 2008; Spann y Schumann, 2009; Spann 2012). Resulta interesante destacar que en nuestro estudio la aplicación de una dosis media de N, P y K al suelo más la aspersión de micronutrientes foliares y silicio fue la combinación que logró un menor índice de severidad de HLB en comparación con las diferentes dosis de fertilización antes descritas y con el testigo (Cuadro 4).

Una de las características distintivas en el presente trabajo fue que los árboles tratados con silicio presentan una diferencia a simple vista en el color del follaje en comparación con los árboles testigo. Los árboles que recibieron el tratamiento con dosis 43-

4-20 más fertilización foliar y silicio (en el primer año dirigido a suelo y vía foliar a partir del segundo año) expresan un color de follaje verde más intenso, en contraste con el testigo que mostró un follaje clorótico y un vigor más débil.

Spann (2012) consignó que la aplicación de fertilización de minerales contribuyó a reducir los efectos del HLB y prolongar la salud del árbol. De acuerdo con Spann y Schumann (2009), muchos nutrientes minerales en concentraciones elevadas tienen amplias propiedades antibacterianas, aunque se sabe relativamente poco acerca de los cambios en la nutrición de las plantas asociadas con HLB, a pesar de sus síntomas en las hojas a menudo suelen ser confundidas con las deficiencias nutrimentales, ejemplo de ello la deficiencia de Zn por la forma que presenta la clorosis; sin embargo es el micronutriente con mayor concentración presente en HLB.

El uso del silicio para el manejo de HLB no está reportado en cítricos lo que incluye las especies utilizadas en nuestro trabajo, Limón Persa y Mexicano. Sin embargo en estudios previos realizados en tomate afectados por la bacteria *Ralstonia solanacearum* se demostró que la aplicación de silicio al follaje redujo la expresión de síntomas hasta un 40% (Whydra, 2012). Debido a que tanto *Ralstonia solanacearum* como *Candidatus Liberibacter* son bacterias que afectan los haces vasculares, es posible comparar la respuesta a los tratamientos evaluados en dicho estudio con de este trabajo. En este caso la fertilización foliar más la adición de silicio llegó a reducir la expresión de la sintomatología hasta un 60%. En ambos casos se muestra claramente que la aplicación de silicio de manera preventiva es efectiva en la reducción de síntomas.

2) Silicio como generador de respuesta anatómica.

De acuerdo con Scheneider, (1968), la acumulación de almidón en el tejido foliar es el resultado del bloqueo de flujo de fotoasimilados, lo cual, provoca una necrosis del floema inducida por el HLB. En el presente trabajo se observó que la aplicación de silicio, incrementa el tamaño de los conductos, permitiendo el flujo de fotoasimilados en el floema de la planta lo que pudo facilitar un mayor aprovechamiento de los nutrientes minerales, la respuesta fue generada en el primer año de aplicaciones donde se fertilizó 8 veces divididas en dos temporadas con cuatro aplicaciones cada una.

Como es sabido, la presencia de HLB en las hojas de cítricos también altera su fisiología. Soto, (2013) reportó una marcada disminución en la actividad del fotosistema II en las hojas infectadas lo que se atribuyó a la pérdida de polipéptidos de diferente peso molecular que conforman los complejos proteínicos implicados en las reacciones luminosas de la fotosíntesis; Lo cual corroboró que en hojas positivas de HLB, hubo una disminución significativa en la eficiencia del fotosistema II ($P < 0.05$), atribuida a daños o alteraciones debido a *Ca. L. asiaticus*. En el presente trabajo se midieron los niveles de clorofila asociados a la fotosíntesis; como se observa en el Cuadro 18, con un nivel de severidad alto (4.5 escala de daño) el contenido de clorofila fue significativamente más bajo en comparación con los tratamientos con dosis media más aplicación de micronutrientes más silicio y dosis alta +FF. Sin embargo el primero de ellos muestra una cantidad similar al tratamiento alto en nitrógeno, lo que se puede atribuir al papel que desarrolla el Silicio para una mejor asimilación fisiológica de la planta. Si bien es cierto, también se puede observar que en la última toma de lectura de contenido de clorofila, todos los tratamientos, presentaban adición de silicio y como se observó en todos los tratamientos no difieren estadísticamente a excepción del testigo y árboles con un nivel de severidad alto de HLB.

Recientemente, a través de microscopía electrónica de transmisión, se observó una acumulación de almidón, calosa y colapso de células en el floema tanto en Limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush), como en naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck, variedad Madam Vinous). Entre especies, se observó que la actividad del floema fue menos afectada por HLB en Limón rugoso que en naranja dulce (Fan *et al.*, 2012). Otros autores han sugerido también que la deposición de calosa en respuesta a la infección por *Ca. L. asiaticus* en los tubos cribosos del floema, puede deberse a un bloqueo en el transporte de fotoasimilados y como consecuencia la acumulación excesiva de almidón alterando la estructura de los tilacoides y modificando las membranas fotosintéticas (Anchor *et al.*, 2010; Etxeberria *et al.*, 2009; Fan *et al.*, 2012). En base resultado en el presente trabajo que se vio un incremento en el floema en el tratamiento que se adiciono Si en comparación al Testigo el cual su tamaño de floema es más del 100% menor al tratamiento antes mencionado, se establece que la enfermedad del HLB, si afecta directamente a las especies de cítricos, quizá este muy poco estudiado, sin embargo, aquí se demuestra que la obstrucción es

evidente y por lo tanto hay un deterioro del árbol, trayendo como consecuencia la baja en producción así como su calidad.

3) Relación como un activador de defensa y absorción de micronutrientes

De acuerdo con Epstein, (2009) el silicio es un activador de metabolitos de defensa, por lo tanto en analogía con metabolitos secundarios, el silicio juega un papel importante en la defensa de las plantas contra todo tipo de adversidades. Estudios previos demuestran que el silicio actúa como metabolitos de defensas en plantas contra el ataque de patógeno en especial bacterias. Whydra (2012), demuestra que el silicio puede actuar como agente de barrera química si la aplicación es vía suelo y como formación de barreras bioquímicas vía foliar donde pueden estar actuando genes involucrados en la defensa de enfermedades. Sin embargo en el caso del HLB no existen reportes previos de que silicio pueda controlar esta enfermedad. En el presente trabajo los resultados demuestran el beneficio de silicio junto con fertilización de N, P y K para reducir la severidad de la enfermedad y favorecer la producción y calidad de la fruta.

De acuerdo con Mitani y Ma, (2005) las diferentes especies de plantas se ven diferenciadas por la habilidad de acumular silicio, siendo distintivas tres categorías: El primer grupo son plantas acumuladoras, ya que presentan un contenido $>1\%$ de silicio. El segundo grupo son plantas semi-acumuladoras que presentan un contenido de $0.5-1\%$ de Si, y por último el tercer grupo son la plantas no acumuladoras de Si, ya que contienen menos de 0.5% de este mineral. Los cítricos ácidos forman parte del tercer grupo.

Aunque se reporta que los cítricos pertenecen al grupo de no acumuladoras de silicio, en los resultados del presente trabajo, se encontró que este mineral se incrementó en mayor medida en el tratamiento donde se adiciono silicio de manera foliar en un 0.53% al final de la evaluación (35 días). Los tratamientos a los que se les añadió silicio a partir del año 2014 mostraron un incremento final elevado en relación al testigo, al cual no se le adicionó este mineral. Estos resultados indican una acumulación de silicio cuando se aplica de manera foliar. El hecho de que en los testigos también hubo presencia de silicio dentro de los parámetros del tercer grupo, se debe a que este mineral está presente en el suelo y fue absorbido por vía radicular. Ma *et al.*, (2006) demostraron que los altos niveles de silicio en

el tejido foliar de arroz son atribuidos a la habilidad de las raíces en la toma de este elemento en el suelo. Aunque los reportes previos sobre la toma de silicio en plantas no acumuladoras son escasos, existen trabajos donde se reporta la toma de silicio por parte del segundo grupo (Plantas semi-acumuladoras), ya que estas tienen la capacidad de absorber el silicio tanto vía foliar como vía radicular. Wydra (2012) demostró que la toma de silicio foliar se atribuye a la afinidad que hay entre el gen *Lsi1* (Transportador) para transportar el silicio de foliar a las plantas, pero también se demostró una segunda forma de toma de silicio ocurrida por difusión pasiva en xilema.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que al momento de adicionar silicio a las plantas no acumuladoras posiblemente se induce un sistema similar al de las plantas semi-acumuladoras lo que puede generar la activación del gen *Lsi1* transfiriéndose por la planta para generar una respuesta física ó bioquímica.

De acuerdo con Nwugo *et al.*, (2013) las hojas de naranjo con síntomas de HLB mostraron un incremento en K mientras que el Mg, Ca, B y Zn se vieron disminuidos. Estos mismos autores encontraron que la presencia de *Ca. L. asiaticus* en la planta reduce en un 9 y 62% en el contenido de Fe y Mn respectivamente. Un dato interesante que mostraron es que el Zn incrementa su concentración hasta un 100%. En el presente trabajo se puede observar que hay una mayor asimilación de dichos micro-nutrientes al adicionar silicio, incrementándose la cantidad de micro-nutrientes en las hojas en comparación con los árboles no tratados. Así el Mn se incrementó en un 270% en los árboles tratados con silicio durante 2 años en el día 35 después de la última aplicación. Y finalmente el Fe se incrementó en un 218%, comparado con los árboles testigos los cuales presentan un decremento significativo en tales concentraciones lo que como consecuencia reduce la vida útil del árbol. La aplicación del silicio más la adición de microelementos foliares, tiende a incrementar la producción de manera considerable, como se puede observar en los Cuadros 14 y 15. Además se observó un incremento en la producción de fruta de exportación. El mejor tratamiento que consistió de la dosis 43-4-20 más fertilización foliar y silicio aumento en un 225% la producción, que a su vez, contribuyo en el porcentaje de la fruta de exportación. En los tratamientos donde se les adiciono silicio en 2014 (Cuadro 14), se aprecia que los árboles produjeron una cosecha más o menos uniforme en contraste con el

testigo, el cual estuvo relacionado con el incremento de la producción de fruta, producto de exportación. No obstante el testigo sigue manejando el mismo valor de peso de la fruta como al inicio del experimento.

Como se puede observar en el presente trabajo la aplicación de silicio puede actuar como un inductor de resistencia para generar metabolitos de respuesta al ataque de enfermedades. Sin embargo, en este trabajo también se evaluaron productos calificados como inductores de resistencia (cuadro 5 y 6), donde se evaluó la dinámica del HLB en árboles de 6 años así como de seis meses de edad siendo estos últimos inoculados con HLB tratados a diferentes días de aplicación. Según Gozzo, (2003), reporto que los productos denominados inductores de resistencia (Harpina, Acibenzolar-s-metil y extractos de *Reynoutria sachalinensis*) tienen una influencia directa en las respuestas de las plantas ya que activa mecanismos de respuesta de las plantas ante el ataque de cualquier patógeno.

Sin embargo, en el presente trabajo se observa que los productos actúan de diferente manera en tiempos distintos de aplicación, los árboles más pequeños de seis meses inoculados con HLB y que fueron tratados 10 días antes de la inoculación con dichos inductores, presentaron síntomas de HLB en hojas a los 60 días presentando una incidencia mayor en los tratamientos de acibenzolar y Harpina, siendo este último el que marco la diferencias en árboles de Limón Persa de 6 años de edad con cero síntomas visuales de HLB. Como se puede ver el presente trabajo comparó el comportamiento de productos inductores de resistencia comerciales con la aplicación de silicio, y los resultados revelan que la aplicación preventiva con silicio puede ayudar para minimizar los efectos producidos por la bacteria *Ca L. asiaticus* en árboles de Limón. Considerando los resultados de este trabajo, es necesario hacer una investigación exhaustiva sobre estos productos así como su interacción con las plantas, para poder llegar a datos concretos. Como se puede observar en la figura 10 vemos la dinámica de severidad del HLB ante la aplicación de distintos productos inductores a través de dos ensayos mostrando índices de severidad relativamente altos en ambos ensayos. Y como se puede observar en la figura 11 el porcentaje de plantas que presentan sintomatología asemejándose al testigo. El cual puede llegar a concluir que no todos los productos son efectivos como inductores de resistencia en las plantas ante un patógeno.

9. CONCLUSIONES

1. Los árboles de Limón Persa tratados con aplicación foliar de silicio y micronutrientes disminuyeron la expresión de síntomas de HLB; mientras que, los árboles que no recibieron ningún insumo fertilizante ni Silicio, mostraron mayor avance en la severidad de la enfermedad, dando como resultado la aplicación de estos tratamientos de manera preventiva.
2. Los árboles de Limón Mexicano en todos los tratamientos a pesar de que presentaron un avance considerable en la severidad de HLB, los tratamientos adicionados con dosis alta de silicio y con aplicación de micronutrientes reduce significativamente el avance de expresión de síntomas.
3. Durante los 32 meses de evaluación en Limón Persa y 9 meses en Limón Mexicano, el rendimiento para ambas especies se vio incrementado en los tratamientos con adición de silicio y micronutrientes y la calidad de la fruta de exportación se incrementó a más de cien por ciento.
4. Los cambios fisiológicos que presenta la planta son debidos a la aplicación foliar del silicio, que actúa contra *Ca. Las*, Se incrementó el tamaño del floema lo que favoreció una mayor asimilación de nutrientes para su desarrollo y funcionamiento, además permitió un incremento en el contenido de clorofila.
5. El inductor que actuó con mayor eficacia como preventivos fue *Reynoutria sachalinensis*, así como la aplicación de silicio y selenio los cuales actúan de manera más eficiente en plantas de menor edad (6 meses), En campo para árboles de mayor edad (3 a 6 años) el más efectivo fue Harpina.

10. LITERATURA CONSULTADA

- Achor, D. S., E. Etxeberria., N. Wang., S.Y. Folimonova., K.R. Chung y L.G. Albrigo. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in Citrus affected with Huanlongbing disease. *Plant Pathol. Journal*. 9: 56-64
- Alberch U. y K. Bowman. 2012. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection whit *Candidatus liberibactes asiaticus*. *Plant science* 185-186.
- Alemán J., Baños H., Ravelo J. (2007) *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Rev. Protección Veg.* (22) 3. 154-165.
- Alcantar G. y L. Trejo. 2012. Nutrición de cultivos. Colegio de postgraduados, Texcoco, Estado de México.
- Armenta I., Ortiz J., Vega A., Ramírez J. 2010 Presencia de *Diaphorina citri* en el valle de guaymas-empalme, sonora. 2007-2010. 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Críticos y el Huanglongbing en México – 2010 INIFAP.
- Aubert, B. 1987. *Trioza erytreae* Del Guercio and *Diaphorina citri* (homóptera: Psylloidea), the two vectors of Citrus Greening Disease: Biological aspects and possible control strategies. *Fruits* 3 (42). P. 149-162.
- Belasque J.J., R.B. Bassanezi¹, P.T. Yamamoto¹, A.J. Ayres¹, A. Tachibana², A.R. Violante³, A. Tank Jr., F. Di Giorgi⁵, F.E.A. Tersi⁶, G.M. Menezes⁷, J. Dragone⁸, R.H. Jank Jr.⁹ and J.M. Bové. 2010. Lessons from Huanglongbing management in Sao Paulo state, Brazil. *Jpournal of plant Pathology*, 92(2), 285-302.
- Brlansky, H. R., Dewdney, M. M., Rogers E.M. and Chung R. K. 2009. Florida Citrus Pest Management Guide: Huan-glongbing (Citrus Greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. USA. SP-43. PP-225.

- Bové, JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, Newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of plant pathology* 88(1):7-37
- Bové J.M. 2010. Huanglongbin. En: Memoria del III Simposio nacional y II Internacional de Bacterias Fitopatógenas. Guadalajara Jal. México. Del 28 al 29 de septiembre.
- Buchanan, b., Girussem,W., and Jones, R. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. The American Society of plant Physiologists. Rockville, USA.
- Cesavejal. 2014. Situación actual del HLB en el estado de Jalisco
<http://www.cesavejal.org.mx/camp/hlb.php>
- Curtis-Díaz.S., Loredo S. X., Díaz, Z. U., Sandoval, R.U., Hernandez, H. J. 2000. Tecnología para producir Limón persa. SAGAR-INIFAP. Fundación Produce Martínez de la Torre, Veracruz
- Datnoff ,L.E., F.A. Rodrigues y K.W. Seebold. 2007. *Silicon and Plant Disease*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA.
- Diogo, R. 2004. Molecular characterization of the influence of silicon on resistance mechanisms of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and on the phenotype of *Ralstonia solanacearum*. MSc thesis. University of Hannover
- Diogo, R., Wydra, K. 2007. Silicon-induced basal resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* is related to modification of pectic cell wall polysaccharide structure. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70: 120-129
- Donovan, N.J., G.A.C. Beattil., G.A., Chambers., P. Holford., A. Englezou., S. P. Hardi., D. P. Wangdi y T. N. Om. 2011. First report of *Candidatus liberibacter asiaticus* in *Dioscorea communis*. *Australasian Plant Dis Notes*. 31-39
- Epstein, E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11-17.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 641-664.
- Esquivel-Chávez, F., G. Valdovinos-Ponce, G. Mora-Aguilera E Loeza-Kuk. G. Acevedo-

- Sánchez, G. Díaz-Padilla, G. Ruíz-García, N. López-Sánchez, P. Rivas-Valencia, A. Novelo-Cocón, P. López-Sánchez y F. Sánchez-Rebolledo. 2010. Análisis Estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing (HLB) de los cítricos en la península de Yucatán, En memoria del 1er. Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del psilido Asiático de los cítricos y el Huanglongbing en México. 04-18pp.
- Etxeberria, E., P. Gonzalez, Achor and G. Albrigo. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. Elsevier.
- Fan, J., C. Chen, Q. Yu, A.A. Khalaf, D. S. Achor, R.H. Brlansky, G.A. Moore, Z.G. Li y F.G. 2012. Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 25: 1396-1407.
- FAOSTAT. www.faostat.fao.org. consultada agosto 2013
- Fassbender, H. W, 1975. Química de los suelos, con énfasis en suelos de América Latina. IICA. Turrialba, Costa Rica.
- Flores-Sánchez, J.L. 2011. Análisis estructural de focos y gradientes de dispersión del Huanglongbing de los cítricos (HLB) en la península de Yucatán. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 75p.
- Fundecitrus. 2009. Manual técnico de Greening. Folleto técnico. Brasil. 12 pp.
- García Darderes C. 2009. DISTRIBUCIÓN DEL HUANGLONGBING (HLB-GREENING) EN EL MUNDO. Ministerio de la producción Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires, Argentina.
- Gómez, E.D. y E.M., Reis. 2011. Inductores abióticos de resistencia contra Fitopatógenos. *Química viva* 1:6-17
- González, Cruz F. 2011. Compilación Bibliográfica del Limón persa. Facultad de ciencias químicas, Veracruz, Veracruz.
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V., and Bassanezi, R. B. 2007. Citrus huanglongbing: The

- pathogen and its impact. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV
- Gottwald, T.R., J.H. Graham, M.S. Irey., T.G. McCollum y B.W. Wood. 2012. Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbin control fruit quality, bacterial titer and disease progress. Crop Protection. 36:73-82
- Gozzo, F.2003. Systemic Acquired Resistance in Crop Protection. From Nature to a Chemical Approach. J. Agric. Food Chem. 5:4487-4503
- Haing, L. 2007. Impacto de las aplicaciones de un mineral Bio – activo sobre parámetros agronómicos y fitosanitarios en plantas de banano del grupo Cavendish, variedad Williams a nivel de laboratorio e invernadero. Disponible en <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/4376/1/6896.pdf>.
- Hernández G.C., Curtí D.S., Sandoval R.J., Loredó S.R., Guajardo P.R., López A.J. 2010.Comportamiento de Diaphorina citri en cinco áreas agroecológicas definidas por temperatura, en Veracruz y Puebla 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo del Psílido Asiático de los Críticos y el Huanglongbing en México. INIFAP, SAGARPA 77-90 pp
- Hodgson R.H.1967. Horticultura varieties of citrus W. Reuter,J.H. Webber and L.D. Batchelor(Eds). The Citrus in Industry, University of California.p.431-589.
- Iwasaki, K., Maier, P., Fecht, M., Horst, W.J. 2002. Leaf apoplastic silicon enhances manganese tolerance of cowpea (*Vigna unguiculata*). J. Plant Physiol. 159, 167-173.
- Kirkby, E.A. and V. Römheld. 2007. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. Proceedings 543, The International Fertilizer Society, P. O. Box, York,
- Kliebenstein, D.2004. Secondary metabolites and plant environmental interactions: A view Through Arabidopsis thaliana tinged glasses. Plant Cell Environmental 27:675-684
- Li, W., L. Levy and J.S., Hartung. 2009.Quantitative distribution of Candidatus Liberibacter asiaticus in citrus plants whith citrus huanglongbing. Phytopathology 99:139-144

- Lima O, 2010. El silicio y la resistencia de las plantas al ataque de hongos patógenos.
Disponible en <http://www.diatom.com.br/es-ES/noticias/item/articulo-el-silicio-y-la-resistencia-de-las-plantas-al-ataque-de-hongos-patogenos>.
- Ma, J.F. y N. Yamaji. 2006. Silicon uptake system of silicon in different plant species.
J. Exp. Bot. 56 1255-1261.
- Madriz, O.k. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo
Integrado de Plantas 63:23-32.
- Mangussi, D. Graca, Hall. D. 2008. Taller Internacional sobre Huanglongbing de los
cítricos “Candidatus Liberibacter spp” y el psílido asiático de los cítricos
(*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora México.
- Manicom, B. q. AND Van Vauuren, S.P. 1990 Symptoms of greening disease with special
emphasis on African greening. 127-131pp in: proceedings of the 4th
international Asian –Pacific Conference on Citrus rehabilitation. FAO-UND,
Chiang-Mai, Thailand.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. New York: Academic
Press. 2:889.
- Melnicone, R., J. Bash., K. Kosta., M. Polek., F. Gmitter., M. Mossler. 2006.
Huanglongbing (HLB) or Citrus Greening (caused by “Candidatus”
Liberibacter africanus, *L. asiaticus*, and *L. americanus*). The American
Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.
- Medina-Urrutia V.M. 1993. Control de la floración de Limón Mexicano para incrementar la
cosecha de invierno en: memoria XI simposio sobre el sistema de
producción de cítricos. VACH-PIISCI. P. 217-225
- Medina, U.V.M., Robles, G.M.M., Becerra, R.S., Orozco, R.J., Orozco, S.M., Garza,
L.J.G., Ovando, C.M.E., Chávez, C.X. y Félix, C.F.A. 2001. El cultivo del
limón Mexicano. INIFAP. Libro Técnico Num. 1. México. 188 p.
- Kirkby EA. 2001. Principles of plant nutrition. Kluwer Academic Publishers. Oxford
- Mitani, N. y Ma, J.F. 2005. Uptake system of silicon in different plant species, J. Exp. Bot.
56, 1255-1261.

- OIRSA .2010. Plan de regional de contingencia para la prevención y contención del HLB en la región. Cuarta Edición.
- Orozco, S.S. 1995. Enfermedades presentes y Potenciales de los cítricos de México, Universidad Autonoma de Chapingo, México.
- Peters D, E. 2002. Territorio y competitividad en la agroindustria en México. Editado por Plaza y Valdés, S.A. de C.V. México DF.
- Pustika, A. B., S. Subandiyah, P. Holford, G.A.C.Beattie, T. Iwanami and Y. Masaoka. 2008. Interactions between plant nutrition and symptom expression in mandarin trees infected with the disease huanglongbing. Australasian Plant Disease Notes, 3: 112–115
- Nwugo CC, Duan Y, Lin H 2013 Study on Citrus Response to Huanglongbing Highlights a Down-Regulation of Defense-Related Proteins in Lemon Plants Upon ‘Ca. Liberibacter asiaticus’ Infection. PLoS journal ONE 8(6)
- Robles G,MM., Manzanilla R, M., Velázquez M, J., Orozco S, M. 2014. Manejo integral del cultivo de limón mexicano en un escenario de alta incidencia de HLB. INIFAP. Libro Técnico Num. 14. México. 188 p
- Romanazzi,G., Ascenzo,D., and MuroloS. 2009. Field treatmet with resistance inducers for the control of grapevine Bois noir. Journal of Plant pathology 91: 667-682
- Schneider,H., 1968. Anatomy of greening-disease sweet orange shots. Phytplathology 58: 1155-1160
- Spann, T. M. y A.W. Schumann. 2009. The role of plant nutrients in disease development with emphasis on citrus and Huanglongbing. Flastate hort Soc. 122: 169-171.
- Spann, T. M. 2012. Management of Huanlongbing in citrus with mineral nutrients, en: Memoria del IV Simposio Nacional y III Internacional de Bacterias Fitopatógenas Mini simposio HLB de los Cítricos Guadalajara Jal. México. Del 24 al 26 de septiembre.
- SAGARPA. 2012. Estadísticas de producción de Limón Persa. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2011B369.aspx>
- SAGARPA. 2014. Estadísticas de producción de Limón Persa. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2011B369.aspx>

- Sánchez, A.,H .2011. Situación actual y manejo regional de HLB. SENASICA-SAGARPA. 5^a semana de citricultura.
- SIAP, 2012.Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera, SIACON, Anuario Agrícola por Municipios, SAGARPA. Consulta de Indicadores de Producción Nacional y Márgenes de Comercialización de Limón persa. www.siap.sagarpa.gob.mx/siacon.
- Taiz, L., and Zeiger, E.2006. Plant physiology. Fith edition. Sinaver Associates Sunderland. Inc. USA.
- Trivedi,P., Sagaram, U.s, Kim, J.s., Brlansky R.H., Rogers, M.E., Stelinski,L.L.,Oswalt, C., Wang,N. 2009. Quantification of viable *Candidatus Liberibacter asiaticus* in host using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA) European Journal Plant Pathology. 124: 553-563.
- Velázquez M.J.2011. Situación actual del Huanglogbing de los cítricos (HLB) en México. XIII Congreso Internacional/XXXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Tlaxcala.INIFAP.SAGARPA.
- Wydra K. 2012. Management of bacterial diseases with mineral and biotic resistance inducers. Memoria del IV Simposio Nacional y III Internacional de Bacterias Fitopatógenas Mini simposio HLB de los Cítricos Guadalajara Jal. México. Del 24 al 26 de septiembre.
- Yasuda M. 2007.Regulation mechanisms on systemic acquired resistance induced by Plants activators. J. Pestic Sci. 32(3):281-282
- Yoshioka, K., Nakashita, H., Klessig, D. and Yamaguchi, I. 2001. Probenazole induces systemic acquired resistance in Arabidopsis with a novel type of action. The plant Journal 25: 149-157
- Zhang,M., Guo,Y. Powell C., Doud, M., Yang, C. and Duan, Y. 2014 Effective antibiotics against “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in HLB-Affected Citrus Pans Identified via the Graft-Based Evaluation. Identified via the Graft-Based Evaluation. PLoS ONE 9(11): e111032. doi:10.1371/journal.pone.0111032.

Apéndice 1.

**Análisis estadístico para la evaluación de rendimiento en las diferentes fechas
establecidas para cosecha así como análisis de clorofila análisis de inductores de
resistencia en distintos tiempos de evaluación en Limón Persa**

Análisis de varianza de peso total marzo 2013.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	1589.28	317.85	5.32	0.001
Bloques	8	495.20	61.90	1.036	0.426
Error	40	2388.54	59.71		
Total	53	4473.03			

CV= 48.4739%

Comparación de medias

TUKEY =10.8954 VALORES DE TABLAS (0.05) = 5.11

Análisis de varianza de peso calidad marzo 2013.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	898.12	179.62	4.828	0.002
Bloques	8	304.62	38.07	1.0231	0.435
Error	40	1487.91	37.19		
Total	53	2690.65			

CV= 60.25135%

Comparación de medias

TUKEY =8.5987 VALORES DE TABLAS (0.05) = 5.11

Análisis de varianza de peso total abril 2013.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	1133.17	226.634	2.74	0.032
Bloques	8	531.76	66.47	0.804	0.604
Error	40	3305.35	82.63		

Total	53	4970.29
--------------	-----------	----------------

CV= 60.25135%

Comparación de medias

TUKEY =12.8170 VALORES DE TABLAS (0.05) = 5.11

Análisis de varianza de peso calidad abril 2013.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	376.896	75.379	2.237	0.069
Bloques	8	172.828	21.603	0.6413	0.740
Error	40	1347.549	33.688		
Total	53	1897.274			

CV= 65.042%

Comparación de medias

TUKEY = 8.1829 VALORES DE TABLAS (0.05) = 5.11

Análisis de varianza de peso total mayo 2014.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	732.3125	146.462	6.4469	0.000
Bloques	8	139.5800	17.447	0.7680	0.634
Error	40	908.7304	22.7182		
Total	53	1780.623			

CV= 37.013935%

Comparación de medias

TUKEY = 6.7194 VALORES DE TABLAS (0.05) = 5.11

Análisis de varianza de peso calidad mayo 2014.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	347.740	69.548	6.884	0.000
Bloques	8	60.406	7.550	0.7475	0.651
Error	40	404.076	10.101		

Total	53	812.222
--------------	-----------	----------------

CV= 36.7541%

Comparación de medias

TUKEY =4.4610 VALORES DE TABLAS (0.05) = 5.11

CLOROFILA

Análisis de varianza de clorofila abril 2013.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	678.75	135.75	2.4539	0.049
Bloques	8	1356.17	169.52	3.0649	0.009
Error	40	2212.81	55.32		
Total	53	4247.73			

CV= 10.833738%

Comparación de medias

Nivel de Significancia = 0.05 DMS = 7.0965

Análisis de varianza de clorofila Octubre 2013.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	200.156	41.6312	5.7367	0.001
Bloques	8	105.625	13.2031	1.8194	0.102
Error	40	290.281	7.57		
Total	53	604.062			

CV= 3.747496%

Comparación de medias

Nivel de Significancia = 0.05 DMS = 2.5690

Análisis de varianza de clorofila mayo 2014.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	484.812	96.9625	4.4859	0.003

Bloques	8	534.656	66.832	3.0920	0.000
Error	40	864.5937	21.6148		
Total	53	1884.062			

CV= 6.6798% Comparación de medias

Nivel de Significancia = 0.05 DMS = 4.4354

SEVERIDAD DE INDUCTORES DE RESISTENCIA EN CAMPO

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	3	1.2692	0.42309	96.5939	0.000
Bloques	3	0.2246	0.0748	17.0983	0.001
Error	9	0.03942	0.0043		
Total	15	1.53337			

CV= 3.22251%

Comparación de medias

TUKEY =0.1449 VALORES DE TABLAS (0.05) = 5.96

Apéndice 2

**Análisis estadístico para la evaluación de severidad en las diferentes fechas
 establecidas para evaluación, en Limón Mexicano**

**Análisis de varianza de severidad de cuatro evaluaciones generales en Limón
 Mexicano.**

FV	GL	SC	CM	F	P>F
Tratamientos	5	1.7503	0.3500	5.8604	0.004
Bloques	3	4.8540	1.6180	27.0867	0.000
Error	15	0.896	0.0597		
Total	23	7.500			

CV= 7.604074% Comparación de medias

TUKEY =0.5620 VALORES DE TABLAS (0.05) = 5.80