

CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS ASOCIADOS A LA INFECCIÓN POR *Candidatus Liberibacter asiaticus* EN LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia*)

CHANGES IN CARBOHYDRATE METABOLISM ASSOCIATED TO *Candidatus Liberibacter asiaticus* INFECTION IN MEXICAN LIME (*Citrus aurantifolia*)

Ángela P. Arce-Leal¹, Norma E. Leyva-López^{1*}, María E. Santos-Cervantes¹, Edgar A. Rodríguez-Negrete²,
Jesús Méndez-Lozano¹, Miguel Á. Manzanilla-Ramírez³, María J. Perea-Flores⁴

¹Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, San Joaquín, Guasave, Sinaloa, Mexico. 8110 (angela_paulina22@hotmail.com, neleyval@ipn.mx, msantos@ipn.mx, jmendezl@ipn.mx). ²CONACYT. Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Unidad Sinaloa. Departamento de Biotecnología Agrícola. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, San Joaquín, Guasave, Sinaloa, México. 81101. (edgarnegrete@gmail.com). ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP-Campo Experimental Tecmán. Carretera Colima-Manzanillo km. 35. Tecmán, Colima, México. 28930. (manzanilla.miguel@inifap.gob.mx). ⁴Instituto Politécnico Nacional, Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnología, Luis Enrique Erro s/n, Zacatenco, D.F. México. 07738 (mpereaf@ipn.mx)

RESUMEN

La enfermedad huanglongbing (HLB) evoluciona rápido en México y afecta principalmente a la industria del limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). El conocimiento de los cambios en el metabolismo de carbohidratos causados por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) en cítricos ha permitido conocer su patogenicidad, pero la respuesta a la infección asociada al metabolismo de azúcares en limón mexicano no se ha caracterizado. La hipótesis fue que la infección por CLAs afecta diferencialmente el metabolismo de carbohidratos durante la etapa previa y posterior a la aparición de síntomas en plantas de limón mexicano. El objetivo fue caracterizar los cambios en el metabolismo de carbohidratos durante la progresión de la infección de CLAs en limón mexicano en condiciones de invernadero. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones biológicas y dos réplicas técnicas. En plantas inoculadas con CLAs se observó que el contenido de almidón aumentó significativamente ($p \leq 0.05$) en el tiempo, hasta cuatro veces a los 16 meses posteriores a la inoculación (mpi) con respecto al testigo. La microscopía confocal mostró acumulación de gránulos de almidón en los haces vasculares y colapso de tejido vascular en las plantas inoculadas. El contenido de sacarosa fue mayor ($p \leq 0.05$) en la etapa asintomática (4 mpi) y sintomática (16 mpi), y el contenido de glucosa y fructosa fue superior (6.3 veces y 1.5 veces) respecto a las plantas no infectadas. La eficiencia del fotosistema II (Fv/

ABSTRACT

Huanglongbing disease (HLB) has rapidly spread in Mexico mainly affecting the Mexican lime industry (*Citrus aurantifolia*). Knowledge of the variation of carbohydrate metabolism caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) in citrus fruits has allowed assessing its pathogenicity. Yet, response to the infection associated with the metabolism of sugars in Mexican lime is not characterized. The hypothesis was that the infection by CLAs differentially affects carbohydrate metabolism during the pre and post-emergence phase of symptoms in Mexican lime plants. The objective was to characterize the changes in carbohydrate metabolism during the CLAs infection progression in Mexican lime in greenhouse conditions. The experimental design was completely randomized with five biological subjects and two technical replications. In plants inoculated with CLAs, we observed that starch content significantly increased ($p \leq 0.05$) through time, up to four times at 16 months after inoculation (mpi) respect to the control. Confocal microscopy showed starch granules accumulation in vascular bundles and collapsed vascular tissue in inoculated plants. The sucrose content was higher ($p \leq 0.05$) in the asymptomatic (4 mpi) and symptomatic (16 mpi) stage and the glucose and fructose content were higher (6.3 and 1.5 times) than in the non-infected plants. Photosystem II efficiency (Fv/Fm = 0.77) in symptomatic plants decreased respect to healthy ones (Fv/Fm = 0.81). These changes could affect field production. This is the first study that quantifies changes in the carbohydrate metabolism in Mexican lime plants and their relation to the disease progression.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2018. Aprobado: enero, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 53: 593-604. 2019.

$F_m=0.77$) en plantas sintomáticas disminuyó respecto a las sanas ($F_v/F_m=0.81$). Estos cambios podrían afectar la producción en campo. Este es el primer estudio que cuantifica los cambios en el metabolismo de carbohidratos en plantas de limón mexicano y su relación con la progresión de la enfermedad.

Palabras clave: almidón, fotosistema II, huanglongbing, HLB, PCR en tiempo real.

INTRODUCCIÓN

La citricultura es relevante en la fruticultura mexicana, porque ocupa cerca de 500 mil ha en 28 estados del país. Los principales cítricos cultivados son: naranja (*Citrus sinensis*), limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y limón persa (*Citrus latifolia*). Los estados productores principales de limón mexicano son Michoacán, Colima, Oaxaca y Guerrero (SAGARPA-SIAP, 2017).

El Huanglongbing (HLB) es la enfermedad más devastadora que afecta a la citricultura mundial, reduce la cantidad y el valor de la producción sustancialmente, además lleva a la muerte indefectible de la plantación en pocos años. Especies del género *Candidatus Liberibacter* se consideran el agente etiológico de la enfermedad, aunque también se ha asociado a *Candidatus Phytoplasma* spp. (Chen *et al.*, 2009; Arratia-Castro *et al.*, 2014; Lou *et al.*, 2014). En México, se notificó su presencia en Yucatán en 2009 y ahora está en 24 de los 28 estados citrícolas del país (SENASICA, 2018). El impacto económico del HLB en México ha sido devastador. En 2008, antes de la llegada del HLB, se producían 1.3 millones Mg de limón mexicano en cerca de 88 mil ha, con un valor de 3 182 MDP; cinco años después se redujo la producción 23 %. El estado de Colima contribuía con 48 % a la producción nacional (626 895 t) en 2008 y actualmente todos sus huertos de limón mexicano están afectados por HLB. De 2010 a 2012 se estimó la caída en la demanda de mano de obra, para labores de campo y cosecha, de 2 435 empleos de tiempo completo en este estado (Avalos y González, 2013).

Los síntomas de los árboles infectados con HLB son variados, hojas pequeñas y amarillentas al inicio de la infección, y después punteado clorótico disperso y moteado asimétrico con color amarillento de las venas de hojas (Bové, 2006; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013). Algunas especies

Key words: starch, photosystem II, huanglongbing, HLB, real-time PCR.

INTRODUCTION

Citriculture is important for Mexican horticulture. It covers about 500 thousand ha in 28 states of the country. Main cultivated citrus fruits are oranges (*Citrus sinensis*), Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and Persian lemon (*Citrus latifolia*). The main producing states of Mexican lime are Michoacán, Colima, Oaxaca and Guerrero (SAGARPA-SIAP, 2017).

Huanglongbing (HLB) is the most devastating disease that affects world citriculture. It substantially reduces production quantity and value and leads to the unfailing death of plantations in a few years. Species of the *Candidatus Liberibacter* genus are considered to be the etiological agent of the disease, although it has also been associated with *Candidatus Phytoplasma* spp. (Chen *et al.*, 2009; Arratia-Castro *et al.*, 2014; Lou *et al.*, 2014). In Mexico, disease presence was notified in Yucatán in 2009; nowadays it is present in 24 of the country's 28 citric-growing states (SENASICA, 2018). HLB economic impact in Mexico has been devastating. In 2008, before the arrival of the HLB, 1.3 million Megagrams of Mexican lime were produced in about 88 thousand hectares, a 3182 million pesos (162.35 million USD) value. Five years later, production decreased 23 %. The state of Colima contributed 48 % to national production (626 895 Mg) in 2008 and, up to date, all its Mexican lime orchards are affected by HLB. From 2010 to 2012, estimated decrease in the labor demand for fieldwork and harvesting was 2435 full-time jobs in this state (Avalos and González, 2013).

The symptoms of trees infected with HLB vary from small and yellowish leaves at the beginning of the infection to dispersed chlorotic stippling and blotchy mottle with yellowing of the leaf veins afterward (Bové, 2006; Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013). Some citrus species, such as limes and lemons, have relative tolerance (Folimonova *et al.*, 2009; Stover *et al.*, 2015) and some resistance has been observed (Ramadugu *et al.*, 2016), but all citrus species, varieties or grafts combinations and rootstocks are affected by HLB. Mexican lime was considered to have a relative tolerance to HLB, but rapid dispersion and affectations of the disease have

de cítricos, como limas y limones, tienen tolerancia relativa (Folimonova *et al.*, 2009; Stover *et al.*, 2015) y se ha observado cierta resistencia (Ramadugu *et al.*, 2016), pero todas las especies de cítricos, variedades o combinaciones de injertos y portainjertos son afectados por HLB. El limón mexicano se consideraba tener una tolerancia relativa al HLB, pero se ha observado afectación y dispersión rápida de la enfermedad en el país. Según Robles-González *et al.* (2017), en un lote experimental la producción disminuyó más de 40 % en árboles sintomáticos de dos variedades de limón mexicano injertadas sobre *Citrus macrophylla*.

La producción de carbohidratos en las plantas mediante la fotosíntesis es un proceso vital porque regula procesos de crecimiento y desarrollo mediante modulación coordinada de expresión génica y actividades enzimáticas en tejidos que exportan e importan carbohidratos. El floema es una ruta de translocación en las interacciones fuente/demanda, en él la sacarosa es el principal carbohidrato de exportación (Ainsworth y Bush, 2011). Éste también es un metabolito de señalización que transmite información sobre la disponibilidad de recursos esenciales para el desarrollo de la planta (Wind *et al.*, 2010; Zeeman *et al.*, 2010). La sacarosa sintetizada en el citosol de la célula se transporta de las hojas al floema. El almidón se sintetiza y almacena en cloroplastos durante el período con luz y se descompone en glucosa y maltosa por la noche y se envía al citosol para la síntesis de sacarosa (Maloney *et al.*, 2015). La síntesis dinámica y la descomposición del almidón, junto con la síntesis y exportación de sacarosa, aseguran que los tejidos no fotosintéticos reciban suministro constante de carbohidratos para impulsar el metabolismo y el crecimiento (Griffiths *et al.*, 2016). El metabolismo de carbohidratos en plantas es un proceso dinámico que varía con el estado fisiológico y en respuesta al estrés por factores abiótico y biótico, como las infecciones bacterianas (Bonfig *et al.*, 2006).

En México *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) es el agente etiológico con asociación amplia al HLB en limón mexicano; es un simbiote obligado exclusivamente en células de floema, que se identifica mayormente como parásito y no como patógeno, ya que carece de toxinas, enzimas degradantes extracelulares y sistemas de secreción (Duan *et al.*, 2009). Así, el resultado de la expresión de la enfermedad se asocia al desequilibrio metabólico del hospedero o interferencia del transporte de

been observed in the country. Robles-González *et al.* (2017) reported that production decreased more than 40 % in the symptomatic trees of an experimental plot, two Mexican lime varieties grafted on *Citrus macrophylla*.

Carbohydrates production in plants through photosynthesis is a vital process because it regulates growth and development processes through coordinated modulation of gene expression and enzymatic activities in tissues exporting and importing carbohydrates. Phloem is the translocation path for source/sink interactions, in which sucrose is the main exported carbohydrate (Ainsworth and Bush, 2011). This is also a signaling metabolite which transmits information on the availability of essential resources for plant development (Wind *et al.*, 2010; Zeeman *et al.*, 2010). Sucrose synthesized in the cytosol is transported from the leaves to the phloem. Starch is synthesized and stored in chloroplasts during the light period and broken down into glucose and maltose at night, then starch is sent to the cytosol for sucrose synthesis (Maloney *et al.*, 2015). The dynamic synthesis and decomposition of starch, together with synthesis and exportation of sucrose, ensure that non-photosynthetic tissues receive a constant supply of carbohydrates to boost metabolism and growth (Griffiths *et al.*, 2016). Carbohydrates metabolism in plants is a dynamic process that varies within physiological stages and in response to stress by abiotic and biotic factors, such as bacterial infections (Bonfig *et al.*, 2006).

In Mexico *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) is an etiologic agent with broad association to HLB in Mexican lime; is a symbiont bound exclusively in phloem cells, which is mostly identified as a parasite and not as a pathogen, since it lacks toxins, extracellular degrading enzymes and secretion systems (Duan *et al.*, 2009). Thus, the result of the disease expression is associated with the metabolic imbalance of the host or with interferences in photoassimilates transport. CLas can affect cellular metabolic functions in the host and metabolites imports from the host cell for its growth and development. Also, it metabolizes sugars, such as glucose, fructose and xylose (Duan *et al.*, 2009). Fructose and glucose are not abundant in the phloem sap (Chino *et al.*, 1991; Flowers and Yeo, 1992), but the fructose consumption by CLas during infection can initiate changes in the distribution of host

fotoasimilados. CLas puede afectar funciones metabólicas celulares en el hospedero e importar metabolitos de la célula del hospedero para su crecimiento y desarrollo; además, metaboliza azúcares, como glucosa, fructosa y xilosa (Duan *et al.*, 2009). La fructosa y glucosa no abundan en la savia del floema (Chino *et al.*, 1991; Flowers y Yeo, 1992), pero el consumo de fructosa por CLas durante la infección puede iniciar un cambio en la distribución de los metabolitos del hospedero. Fan *et al.* (2010) observaron acumulación de almidón, sacarosa y glucosa, pero no de fructosa, en plantas de naranja dulce, por lo cual sugirieron que CLas puede metabolizar fructosa, similar a *Spiroplasma citri* (Andre *et al.*, 2005). El conocimiento de los cambios en el metabolismo de carbohidratos causados por la infección por CLas permitió avances en el conocimiento de su patogenicidad en naranja dulce, toronja, mandarina y limón rugoso (portainjerto). En ellos se han estudiado perfiles metabólicos, de expresión génica y cambios en las estructuras anatómicas por la infección por CLas (Etxeberria *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Martinelli *et al.*, 2012). Los estudios se han realizado principalmente en etapas sintomáticas de la infección, pero no se han considerado algunos eventos fisiológicos y moleculares que ocurren antes de la aparición de síntomas. Por lo tanto, un modelo que diferencie las etapas de la infección parece necesario.

En huertos de limón mexicano en el país hay manejo del vector de CLas, pero la enfermedad se ha dispersado rápido y se desconoce el mecanismo de interacción planta – patógeno. El conocimiento de los aspectos bioquímicos asociados al metabolismo de carbohidratos en plantas de limón mexicano infectadas con CLas permitirá inferir sobre su función en la respuesta de la planta al patógeno y su importancia en la reacción de la planta, posibilitará el manejo de la enfermedad. La hipótesis de este estudio fue que la infección por CLas afecta diferencialmente el metabolismo de carbohidratos durante la etapa previa y posterior a la aparición de síntomas en limón mexicano. El objetivo fue determinar los cambios en el metabolismo de azúcares en plantas en limón mexicano infectadas con CLas durante 16 meses en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas del estudio fueron de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*, Christm., Swingle) injertadas sobre el portainjerto

metabolitos. Fan *et al.* (2010) observed accumulation of starch, sucrose and glucose, but not fructose, in sweet orange plants; thus, they suggested that CLas can metabolize fructose, similar to *Spiroplasma citri* (Andre *et al.*, 2005). The knowledge of changes in the carbohydrate metabolism caused by CLas infection allowed advances in the understanding of its pathogenicity in sweet orange, grapefruit, tangerine and rough lemon (rootstock). Metabolic profiles, gene expression and changes in the anatomical structures are studied in these citrus species following CLas infection (Etxeberria *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2009, Martinelli *et al.*, 2012). Studies have been carried out mainly in the symptomatic stages of the infection, but some physiological and molecular events that occur before the onset of symptoms have not been considered. Therefore, a model that differentiates the stages of infection seems necessary.

Mexican lime orchards have CLas vector management, but the disease has spread rapidly and the plant - pathogen interaction mechanism is unknown. Knowledge of the biochemical aspects associated to carbohydrate metabolism in Mexican lime plants infected with CLas will allow inferring their function on the plant response to the pathogen and their importance on plant reaction, making possible to manage the disease. The hypothesis in this study was that CLas infection differentially affects carbohydrate metabolism during the pre and post-emergence phase of symptoms in Mexican lime. The objective was to determine the changes in sugars metabolism in Mexican lime plants infected with CLas along 16 months under greenhouse conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plants in this study were Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*, Christm., Swingle) grafted on a Volkamerian lemon rootstock (*Citrus volkameriana*, Pasq), 9 months old, free of pathogens. The inoculum source were budding grafts (approximately 30 cm) from CLas positive plants (PCR positive), with characteristic HLB disease symptoms (Bové, 2006), collected in February 2013 from a Mexican lemon orchard (6 years after planted) at Tecmán, Colima, Mexico, a locality with history of the disease since 2010. From the PCR-confirmed CLas inoculated plants, five were selected with between 1000 to 2000 cells titer of CLas 100 ng^{-1} DNA. The plants were placed in 40 L pots with 20 kg substrate (peat moss: river sand: perlite, 30: 30: 40 %) and kept in a greenhouse at sunlight, between 23 and 28 °C and 31 to 45 % relative humidity. Plants were irrigated two or three

de limón Volkameriano (*Citrus volkameriana*, Pasq), de 9 meses de edad, libres de patógenos. La fuente de inóculo fueron yemas de varetas (de 30 cm, aproximado) de plantas PCR positivas a CLas, con síntomas característicos de la enfermedad HLB (Bové, 2006), y se recolectó en febrero de 2013 en una huerta de limón mexicano (6 años de plantación) en Tecomán, Colima, localidad con antecedentes de la enfermedad desde 2010. De las plantas inoculadas confirmadas PCR positivas para CLas se seleccionaron cinco con un título entre 1 000 a 2 000 células de CLas 100 ng^{-1} de DNA. Las plantas se colocaron en macetas de 40 L con 20 kg de sustrato (peat moss: arena de río: perlita, 30: 30: 40 %) y se mantuvieron en invernadero con luz natural, entre 23 y 28 °C y humedad relativa de 31 a 45 %. Las plantas se regaron dos o tres veces por semana y se fertilizaron cada tres semanas con una mezcla de fertilizante soluble en agua (20-0-30 N-P-K) y micronutrientes (Microfol® Combi P.S.). Además, 40 g de fosfato monoamónico (MAP) se aplicaron a cada maceta cada 6 meses.

Recolección de muestra

Muestras foliares se recolectaron, para evaluar la progresión del título de CLas en plantas de limón mexicano y cambios en el metabolismo de carbohidratos, cada dos meses durante 16 meses. Cada muestra foliar fue de la quinta hoja madura de siete ramas de una misma planta, las cuales se separaron por lámina y nervadura. El tejido foliar se congeló con N líquido y se liofilizó (Labconco, Kansas City, MO). Las muestras liofilizadas se pulverizaron en un molino TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) durante 1 min (30 Hz).

Detección y cuantificación de CLas

La extracción de DNA se realizó a partir de 0.02 g de nervadura liofilizada con el método del CTAB al 3 % (Zhang *et al.*, 1998), con algunas modificaciones (Arratia-Castro *et al.*, 2014). Posteriormente, para la detección y cuantificación de CLas se realizó un estudio cuantitativo en tiempo real (Lin *et al.*, 2010), el cual consiste en un sistema de diagnóstico ultrasensible y cuantitativo mediante la combinación de PCR anidado y PCR TaqMan® en un solo tubo.

Análisis de carbohidratos

Extracción y cuantificación de almidón

Para extraer el almidón se siguió el método descrito por González *et al.* (2010), con 0.02 g de lámina foliar liofilizada. El almidón se cuantificó en 300 μL del extracto de almidón, 15 μL de la solución de yodo a una placa óptica de 96 pozos

times per week and fertilized every three weeks with a water-soluble fertilizer mixture (20-0-30 N-P-K) and micronutrients (Microfol® Combi P.S.). In addition, 40 g of monoammonium phosphate (MAP) were applied to each pot every 6 months.

Sampling

Foliar samples were collected to evaluate the titer progression of CLas in Mexican lemon plants and the changes in their carbohydrate metabolism, every two months during 16 months. Each leaf sample was taken from the fifth mature leaf of seven branches in the same plant, which were then separated in leaves and midribs. Leaf tissues were frozen in liquid N and then lyophilized (Labconco, Kansas City, MO). Lyophilized samples were pulverized in a TissueLyser mill (Qiagen, Valencia, CA) for 1 min (30 Hz).

CLas detection and quantification

DNA extraction was made from 0.02 g of lyophilized leaf midribs following the 3 % CTAB method (Zhang *et al.*, 1998) with some modifications (Arratia-Castro *et al.*, 2014). Subsequently, a quantitative real-time study was carried out for CLas detection and quantification (Lin *et al.*, 2010), which consists of an ultrasensitive and quantitative diagnostic system by combining nested PCR and TaqMan® PCR in a single tube.

Carbohydrate analysis

Starch extraction and quantification

González *et al.* (2010) method was followed to extract the starch, from 0.02 g of lyophilized foliar lobes of mature leaves. The starch was quantified from 300 μL of starch extract, 15 μL of the iodine solution to a 96-well optical plate. Its absorbance assessed at 595 nm in a spectrophotometer (Thermo Scientific™ Multiskan GO, USA) and a standard curve from rice starch (Sigma-Aldrich, USA).

Soluble carbohydrates extraction and quantification

The sucrose, glucose and fructose concentration was evaluated at 4 and 16 mpi in 0.05 g of freeze-dried central veins of asymptomatic and symptomatic leaves, respectively, by the Geigenberger and Stitt (1993) and Fan *et al.* (2010) method. The sucrose, glucose and fructose quantification was done with commercial kits (Sigma-Aldrich, USA), following the manufacturer's instructions.

y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Multiskan GO, USA) y una curva estándar a partir de almidón de arroz (Sigma-Aldrich, USA).

Extracción y cuantificación de carbohidratos solubles

La concentración de sacarosa, glucosa y fructosa se evaluó a los 4 y 16 mpi en 0.05 g de nervadura central liofilizada de hojas asintomáticas y sintomáticas, respectivamente, con el método descrito por Geigenberger y Stitt (1993) y Fan *et al.* (2010). La cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa se hizo con kits comerciales (Sigma-Aldrich, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Análisis microscópico de los cambios estructurales

Mediante microscopía confocal laser se determinaron los cambios micro estructurales en los tejidos, de acuerdo con lo descrito por Gámez-Rosas *et al.* (2015). Las nervaduras de hojas con y sin síntomas se fijaron en FAA (etanol al 50 %, ácido acético y formaldehído, 18: 1: 1, v/v) por 48 h a 4 °C, se lavaron con PBS (amortiguador de fosfatos, pH 7), deshidrataron con etanol y transparentaron con etanol-xilol. Las muestras se trataron con xilol-parafina y seccionaron transversalmente con microtomo en secciones de 12 µm. Los gránulos de almidón se detectaron en el corte transversal de nervadura después de inmersión en rodamina B (0.2 % en PBS). Los cortes se observaron en un microscopio confocal de barrido laser LSM 710 NLO (Carl Zeiss, Alemania) con los objetivos 10x/0.3; 20x/0.8, y para las imágenes en 3 D se capturaron 40 cortes ópticos. Las imágenes se capturaron con velocidad de barrido de 5 s, el láser de excitación fue de 514 nm y 2 % de transmitancia. Las imágenes de cuatro campos en color RGB se adquirieron con el programa ZEN 2010 (Carl Zeiss) y se almacenaron en formato TIFF a 512×512 píxeles.

Eficiencia del fotosistema II

La eficiencia fotosintética del fotosistema II (Fv/Fm) del tejido vegetal se evaluó con un equipo FluorPen FP 100, con el parámetro QY (Quantum Yield). Este parámetro se evaluó en etapa asintomática (4 mpi) y sintomática (16 mpi) en plantas adaptadas a oscuridad por 30 min y se evaluaron tres hojas maduras de cada planta (aproximadamente la quinta hoja de la varetta de la planta).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con cinco repeticiones, y las pruebas se realizaron por duplicado. Los resultados

Microscopic analysis of structural changes

Using confocal laser microscopy the microstructural changes in the tissues were determined, according to that described by Gámez-Rosas *et al.* (2015). The leaf midribs with and without symptoms were fixed in FAA (50 % ethanol, acetic acid and formaldehyde, 18: 1: 1, v / v) for 48 h at 4 °C, washed with PBS (phosphate buffer, pH 7), dehydrated with ethanol and made transparent with ethanol-xylol. Samples were treated with xylol-paraffin and transversely sectioned with a microtome in 12 µm slices. The starch granules were detected in the cross-sections of the ribs after immersion in rhodamine B (0.2 % in PBS). Slices were evaluated in an LSM 710 NLO laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Germany) with 10 x / 0.3; 20 x / 0.8 objectives. For the 3 D images, 40 optical cuts were captured. The images were captured with a 5 s scanning speed, the excitation laser was at 514 nm and 2 % transmittance. The images of four fields in RGB color were acquired with the ZEN 2010 program (Carl Zeiss) and stored in TIFF format at 512 x 512 pixels.

Photosystem II Efficiency

The photosystem II photosynthetic efficiency (Fv/Fm) of the plant tissues were evaluated with a FluorPen FP 100 equipment, with QY parameter (Quantum Yield). This parameter was evaluated at asymptomatic (4 mpi) and symptomatic (16 mpi) stages, in plants adapted to darkness for 30 min, and three mature leaves from each plant (approximately the fifth leaf of the plant outshoot) were evaluated.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design was completely random with five repetitions and tests were performed by duplicate. Results were analyzed using the analysis of variance and means were compared with the Tukey statistical test ($p \leq 0.05$) using the StatGraphics Centurion XV statistical package (StatPoint Inc., 2005).

RESULTS AND DISCUSSION

The CLas titer of infected plants (HLB+) was increased over time. Six months after inoculation (6 mpi) they showed bacterial titer of $2.5 \pm 0.4 \times 10^3$ cells of CLas 100 ng⁻¹ of DNA. At that time, there were no characteristic infection symptoms, compared to healthy plants (HLB-). From 10 mpi on, with a bacterial titer of $7.3 \pm 1.4 \times 10^3$ cells of CLas 100 ng⁻¹ of DNA, the plants exhibited initial symptoms of the disease: scattered chlorotic

se analizaron mediante un análisis de varianza y una comparación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el paquete estadístico StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas infectadas (HLB+) incrementaron en el título de CLas en el tiempo. Seis meses después de inoculadas (6 mpi) mostraron título bacteriano de $2.5 \pm 0.4 \times 10^3$ células de CLas 100 ng^{-1} de DNA. En ese tiempo no se observaron síntomas característicos de la infección, respecto a las plantas sanas (HLB-). A partir de los 10 mpi, con un título bacteriano de $7.3 \pm 1.4 \times 10^3$ células de CLas 100 ng^{-1} de DNA, las plantas presentaron síntomas iniciales de la enfermedad: punteado clorótico disperso, moteado difuso y aclaramiento de nervaduras. Los síntomas característicos descritos en campo como un moteado asimétrico, engrosamiento y amarillamiento de las venas de las hojas (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013) se observaron hasta los 16 mpi, donde la carga bacteriana fue de $4 \pm 0.4 \times 10^4$ células de CLas 100 ng^{-1} de DNA (Figura 1).

En este estudio se presenta el primer reporte sobre la cinética de infección de HLB en una lima ácida, en ella el título bacteriano se asoció a la sintomatología observada. Este modelo podría usarse en estudios transcriptómicos, metabolómicos y proteómicos para ampliar el conocimiento de los mecanismos de interacción planta-patógeno en bacterias no cultivables restringidas al floema.

CLas no forma agregados bacterianos en cítricos, los síntomas visibles en los órganos aéreos de las plantas se han asociado al bloqueo o taponamiento, o ambos, del floema por fotoasimilados (Schneider, 1968; Kim *et al.*, 2009). En etapa asintomática (4 mpi) no se observó cambio significativo en el contenido de almidón; a partir de 12 mpi se observó aumento ($p \leq 0.05$) hasta de cuatro veces (16 mpi), respecto al testigo sano (Figura 2).

En el sistema vascular de plantas sintomáticas se acumularon gránulos de almidón, el tejido vascular colapsó y desordenó (Figura 3). Además, el contenido de sacarosa fue significativamente mayor ($p \leq 0.05$) en etapa asintomática (4 mpi) y sintomática (16 mpi); el contenido de glucosa y fructosa fue mayor ($p \leq 0.05$; 6.3 veces y 1.5 veces) solo en etapa sintomática (Figura 4).

stippling, diffuse mottling and leaf midribs clearing. The characteristic symptoms described for field conditions as asymmetric mottling, thickening and yellowing of leaf veins (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013) were observed up to 16 mpi, where the bacterial load was $4 \pm 0.4 \times 10^4$ cells of CLas 100 ng^{-1} of DNA (Figure 1).

This study is the first report of HLB infection kinetics in acidic limes, in which the bacterial titer was associated with the observed symptomatology. This model could be used in transcriptomic, metabolomic and proteomic studies to broaden the knowledge of the mechanisms of plant-pathogen interaction in non-culturable bacteria restricted to the phloem.

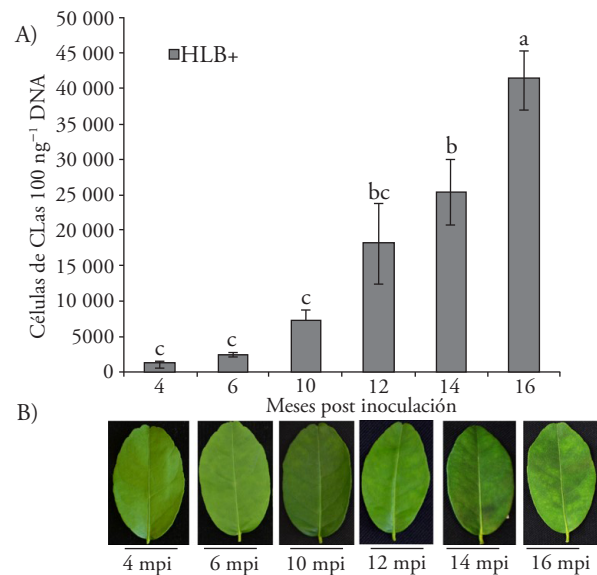


Figura 1. Cinética de infección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) en plantas de limón mexicano. Panel A, título de CLas 100 ng^{-1} de DNA de nervadura de limón mexicano infectada con CLas, determinado por PCR en tiempo real. Medias $\pm$ desviación estándar (DE) con letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Panel B, síntomas inducidos por la infección de CLas en limón mexicano durante 16 meses posteriores a la inoculación (mpi).

Figure 1. Kinetics of infection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) in Mexican lime plants. Panel A, title of CLas 100 ng^{-1} of Mexican lime leaf midribs DNA infected with CLas, determined via real-time PCR. Means $\pm$ standard deviation (SD) with different letters indicate a significant difference ($p \leq 0.05$). Panel B, symptoms induced by CLas infection in Mexican lime for 16 months after inoculation (mpi).

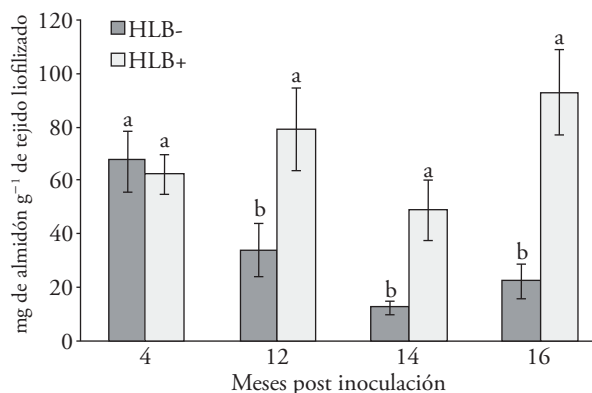


Figura 2. Contenido de almidón en láminas de hojas maduras de limón mexicano infectadas por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Medias $\pm$ desviación estándar (DE) con letras distintas indican diferencia significativa para cada mes post inoculación (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 2. Starch content in foliar lobes of mature leaves of Mexican lime infected by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Means $\pm$ standard deviation (SD) with different letters indicate significant difference for each month post inoculation (Tukey, $p \leq 0.05$).

Since CLAs does not form bacterial aggregates in citrus fruits, visible symptoms in plant aerial organs have been associated with blockage or plugging, or both, of the phloem by photoassimilates (Schneider, 1968, Kim *et al.*, 2009). In asymptomatic stage (4 mpi), no significant changes in starch content were observed; from 12 mpi an increase ($p \leq 0.05$) was observed up to four times (16 mpi), compared to that of the healthy control (Figure 2).

Starch granules were accumulated in the vascular system of symptomatic plants, vascular tissue collapsed and disordered (Figure 3). In addition, sucrose content was significantly higher ($p \leq 0.05$) in both, asymptomatic (4 mpi) and symptomatic stages (16 mpi); the glucose and fructose content was greater ($p \leq 0.05$, 6.3 times and 1.5 times) only at the symptomatic stage (Figure 4).

The HLB-disease progression is linked to the change in carbohydrate metabolism and causes physiological disorders and disease symptoms in

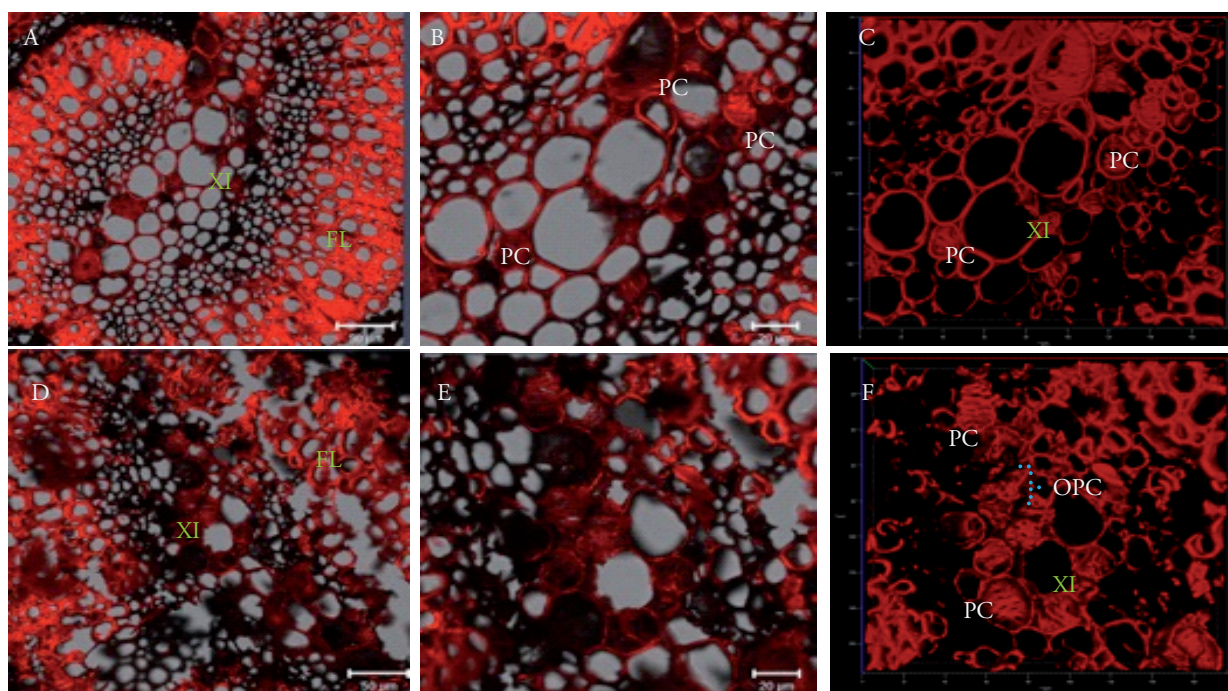


Figura 3. Cambios microestructurales y de contenido de almidón en plantas de limón mexicano por microscopía confocal. Panel A y B, corte transversal de nervadura de hoja de árbol sano; Panel D y E, corte transversal de nervadura de hoja de limón mexicano con síntomas de HLB y PCR positiva a CLAs; Panel C y F, imágenes en 3D por microscopía confocal de un corte transversal enfocado en la zona del xilema generadas para observar la obstrucción celular. PC: placa cribrosa, XI: xilema, FL: floema, OPC obstrucción y colapso por gránulos de almidón.

Figure 3. Microstructural changes and starch content in Mexican lime plants by confocal microscopy. Panel A and B, cross sections of leaf midrib from a healthy tree; panel D and E, cross section of Mexican lime leaf midrib with HLB symptoms and PCR positive to CLAs; and panel C and F show 3D images by confocal microscopy of a cross-section cut focused on the xylem area generated to observe cellular obstruction. PC: cribrous plate, XI: xylem, FL: phloem, OPC obstruction and collapse by starch granules.

La progresión de la enfermedad del HLB se ha relacionado con el cambio en el metabolismo de carbohidratos y causa trastornos fisiológicos y síntomas de enfermedad en las plantas afectadas. En plantas sintomáticas de naranja dulce infectadas con CLas se reportó un aumento en el contenido de almidón de hasta 7.9 veces con respecto a plantas sanas (Fan *et al.*, 2010), lo cual coincide con nuestro estudio. El aumento de este carbohidrato se ha asociado con una respuesta diferente entre genotipos. En plantas tolerantes (limón rugoso) y susceptibles (naranja dulce) a HLB se ha observado acumulación de almidón y calosa; sin embargo, la actividad de transporte del floema es menos afectada en el limón rugoso (Fan *et al.*, 2012). El análisis histológico ha mostrado, en tejido sintomático de limón mexicano infectado con CLas, más almidón en el parénquima en empalizada y esponjoso que en limón persa y naranja dulce (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). La infección por HLB también se ha asociado con el aumento en el contenido de sacarosa y glucosa en etapas sintomáticas, similar a los resultados del presente estudio. En contraste el contenido de fructosa no mostró diferencia significativa en plantas sintomáticas con respecto a plantas sanas (Fan *et al.*, 2010).

affected plants. In symptomatic sweet orange plants infected with CLas, an increase in starch content of up to 7.9 times was reported in respect to healthy plants (Fan *et al.*, 2010), which coincides with our study. The increase of this carbohydrate is associated with a different responses between genotypes. In tolerant plants (rough lime) and susceptible (sweet orange) to HLB, starch accumulation and callose has been observed; nevertheless, the transport activity is less affected in rough lemon phloem (Fan *et al.*, 2012). Histological analysis of symptomatic tissue of Mexican lime infected with CLas has shown more starch in the palisade and spongy parenchyma than in Persian lime and sweet oranges (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). HLB infection has also been associated with an increase in the sucrose and glucose content in symptomatic stages, similar to the results of the present study. In contrast, the fructose content showed no significant difference in symptomatic plants with respect to healthy plants (Fan *et al.*, 2010).

In symptomatic plants (16 mpi), photosystem II efficiency significantly decreased compared to healthy plants (Table 1).

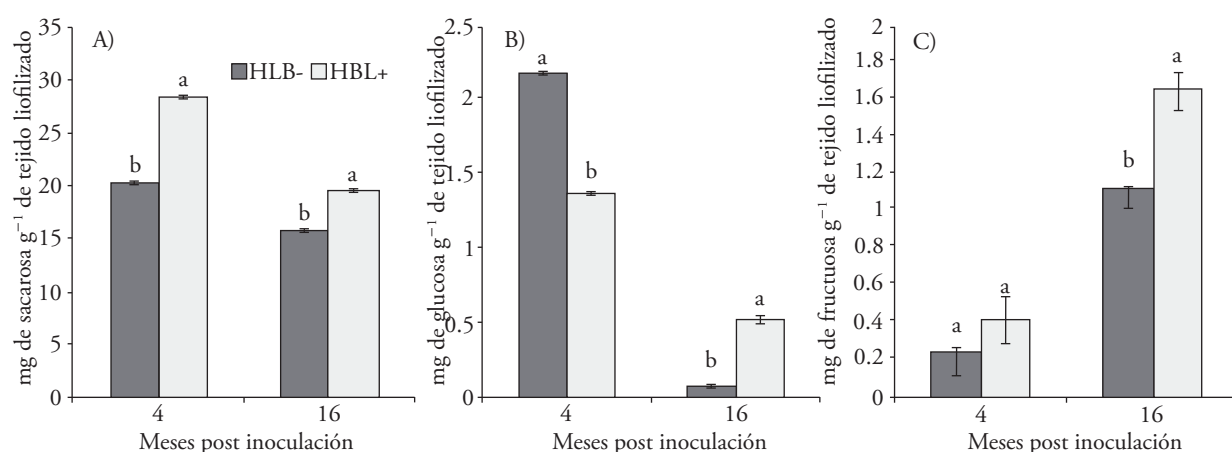


Figura 4. Efecto de la infección por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el contenido de carbohidratos solubles en nervaduras de hojas maduras de limón mexicano a los 4 y 16 meses postinoculación (mpi). Panel A, contenido de sacarosa; Panel B, contenido de glucosa; Panel C, contenido de fructosa. Medias $\pm$ desviación estándar (DE) con letras distintas indican diferencia significativa para cada mes postinoculación (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 4. Effect of infection by *Candidatus Liberibacter asiaticus* on the soluble carbohydrates content in midribs of mature leaves of Mexican lime at 4 and 16 months post-inoculation (mpi). Panel A, sucrose content; panel B, glucose content; and panel C, fructose content. Means $\pm$ standard deviation (SD) with different letters indicate significant difference for each postinoculation month (Tukey, $p \leq 0.05$).

En plantas sintomáticas (16 mpi) disminuyó significativamente la eficiencia del fotosistema II respecto a las plantas sanas (Cuadro 1).

Sagaram y Burns (2009) observaron que la eficiencia del fotosistema II osciló entre 0.67 y 0.75 en genotipos susceptibles y tolerantes a HLB, menor a las plantas sanas ($F_v/F_m=0.81$).

Las moléculas de azúcar pueden ser señalizadoras a larga distancia (Liu *et al.*, 2009) y regular la expresión génica (Martinelli y Dandekar, 2017). Estudios transcriptómicos entre genotipos sanos, infectados (en diferentes etapas) y tolerantes permiten sugerir que el patógeno regula genes del metabolismo de carbohidratos (Albrecht and Bowman, 2008; Kim *et al.*, 2009; Mafra *et al.*, 2013), lo que afecta el flujo de nutrientes en todo el árbol y la relación fuente/demanda, lo cual disminuye la producción y la calidad del fruto y puede causar muerte al árbol (Martinelli *et al.*, 2012; Martinelli y Dandekar, 2017). La importancia de los carbohidratos en respuesta a CLas se observa en la concentración de mono y disacáridos, alcoholes y azúcares, en la savia del floema que podría relacionarse con la respuesta de tolerancia al HLB (Albrecht *et al.*, 2016; Killiny, 2017). El limón mexicano se había calificado como tolerante al HLB, pero el desequilibrio metabólico y fisiológico descrito, en respuesta a la infección por CLas, parece disminuir la producción y rendimiento en huertos experimentales y comerciales. Los síntomas pueden acompañarse con la caída prematura de hojas (Robles-González *et al.*, 2013) en zonas sintomáticas o asintomáticas del árbol (Robles-González *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Efecto de la infección de CLas en la eficiencia del Fotosistema II en plantas de limón mexicano.

Table 1. Effect of CLas infection on the photosystem II efficiency in Mexican lime plants.

Meses post inoculación	Fv/Fm	
	HLB-	HLB+
4	0.83±0.007a	0.79±0.04a
16	0.81±0.010a	0.77±0.02b

Medias ± desviación estándar con letras distintas para cada mes post inoculación indican diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$). [†]HLB+= Plantas PCR positiva, [†]HLB-= Plantas PCR negativas. ♦ Means ± standard deviation with different letters for each month post-inoculation indicate a significant difference (Tukey, $p \leq 0.05$). [†]HLB += Positive PCR plants, [†]HLB- = Negative PCR plants.

Sagaram and Burns (2009) registered that photosystem II efficiency oscillated between 0.67 and 0.75 in susceptible and tolerant genotypes to HLB, lower than healthy plants ($F_v / F_m = 0.81$).

Sugar molecules can be long-distance signaling (Liu *et al.*, 2009) and regulate gene expression (Martinelli and Dandekar, 2017). Transcriptomic studies between healthy, infected (in different stages) and tolerant genotypes suggest that the pathogen regulates carbohydrate metabolism genes (Albrecht and Bowman, 2008, Kim *et al.*, 2009, Mafra *et al.*, 2013), thus affecting nutrients flow through the tree and the carbohydrates source/sink ratio, which decrease the production and quality of fruits and can cause tree death (Martinelli *et al.*, 2012, Martinelli and Dandekar, 2017). The importance of carbohydrates in response to CLas was observed by metabolomic studies, showing that the concentration of mono and disaccharides, alcohols and sugars in the phloem sap could be playing an important role in the tolerance response to HLB (Albrecht *et al.*, 2016, Killiny, 2017). The Mexican lime has been described as HLB tolerant, but the metabolic and physiological imbalance described in response to CLas infection may be associated with decreased production and yield in experimental and commercial orchards. Symptoms may be accompanied by premature leaf fall (Robles-González *et al.*, 2013) in symptomatic or asymptomatic areas of the tree (Robles-González *et al.*, 2017).

In this study, the temporal quantitative metabolic imbalance in Mexican lime was documented during the infection and with only one infection event; this contrasts with other studies involving trees in field conditions that could present several inoculations by the psyllid vector *Diaphorina citri*.

CONCLUSIONS

The CLas infection alters the carbohydrates metabolism in Mexican lime plants since starch, sucrose, and glucose accumulate and the photosynthetic capacity decreases. The imbalance of the carbohydrate partition associated with the starch accumulation in the infected leaves during the progression of HLB symptoms and the inhibition of the translocation of photoassimilates in the phloem are related to the decrease in the production and development of the disease at field conditions.

En este estudio se documentó el desbalance metabólico cuantitativo temporal en limón mexicano, durante la infección y con solo un evento de infección; esto contrasta con otros estudios que involucran árboles en campo que podrían presentar varias inoculaciones por el psílido vector *Diaphorina citri*.

CONCLUSIONES

La infección de CLas altera el metabolismo de carbohidratos en plantas de limón mexicano, ya que el almidón, la sacarosa y la glucosa se acumulan y la capacidad fotosintética disminuye. El desequilibrio de la partición de carbohidratos asociado a la acumulación de almidón en las hojas infectadas durante la progresión de los síntomas de HLB y la inhibición de la translocación de fotoasimilados en el floema puede relacionarse con la disminución de la producción y el desarrollo de la enfermedad en campo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento otorgado con el proyecto SIP 2016-4813 y al CONACYT (Proyecto PEI 2017-242999). Arce Leal agradece al CONACYT y al IPN por su beca de estudios de posgrado.

LITERATURA CITADA

- Ainsworth, E. A., and D. R. Bush. 2011. Carbohydrate export from the leaf: A highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol.* 155: 64-69.
- Albrecht, U., and K. D. Bowman. 2008. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Sci.* 175: 291-306.
- Albrecht, U., O. Fiehn, and K. D. Bowman. 2016. Metabolic variations in different citrus rootstock cultivars associated with different responses to Huanglongbing. *Plant Physiol. Biochem.* 107: 33-44.
- Andre, A., M. Maucourt, A. Moing, D. Rolin, and J. Renaudin. 2005. Sugar import and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*: glucose and fructose play distinct roles. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18: 33-42.
- Arratia-Castro, A. A., M. E. Santos-Cervantes, E. Fernández-Herrera, J. A. Chávez-Medina, G. L. Flores-Zamora, E. Camacho-Beltrán, J. Méndez-Lozano, and N. E. Leyva-López. 2014. Occurrence of '*Candidatus Phytoplasma asteris*' in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection* 62: 144-151.
- Avalos, V. O., y S. R. F. González. 2013. El impacto social, y económico en el comercio del HLB en la cadena de limón mexicano en Colima. *In: Memorias del IX Simposio Internacional Citrícola. 1^{er} Simposio internacional sobre HLB en cítricos ácidos.* Velázquez-Monreal, J. J., M. A. Manzanilla-Ramírez, M. M. Robles-González, y M. Orozco-Santos (Eds). COEPLIM- INIFAP. Tecomán, Colima, México. pp: 1-30.
- Bonfig, K. B., U. Schreiber, A. Gabler, T. Roitsch, and S. Berger. 2006. Infection with virulent and avirulent *P-syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in Arabidopsis leaves. *Planta* 225: 1-12.
- Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88: 7-37.
- Chen, J., X. Pu, X. Deng, S. Liu, H. Li, and E. Civerolo. 2009. A phytoplasma related to '*Candidatus Phytoplasma asteris*' detected in citrus showing Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99: 236-242.
- Chino, M., H. Hayashi, S. Nakamura, T. Oshima, H. Turner, D. Sabnis, V. Borkovec, D. Baker, G. Grousse, and C. L. Bonnemain. 1991. Phloem sap composition. *In: Recent Advances in Phloem Transport and Assimilate Compartmentation.* Bonnemain J. L., S. Delrot, W. J. Lucas and J. Dainty (eds). Oest Editions, Presses Académiques, Paris, France. pp: 64-73.
- Duan, Y., L. Zhou, D. G. Hall, W. Li, H. Doddapaneni, H. Lin, L. Liu, C. M. Vahling, D. W. Gabriel, K. P. Williams, A. Dickerman, Y. Sun, and T. Gottwald. 2009. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 1011-1020.
- Esquivel-Chávez, F., G. Valdovinos-Ponce, G. Mora-Aguilera, R. Gómez-Jaimes, J. J. Velázquez-Monreal, M. A. Manzanilla-Ramírez, J. L. Flores-Sánchez, y J. I. López-Arroyo. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782.
- Etcheberria, E., P. González, D. Achor, and G. Albrigo. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74: 76-83.
- Fan, J., C. Chen, R. H. Bransky, F. G. Gmitter, and Z. G. Li. 2010. Changes in carbohydrate metabolism in *Citrus sinensis* infected with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*.' *Plant Pathol.* 59: 1037-1043.
- Fan, J., C. Chen, Q. Yu, A. Khalaf, D. S. Achor, R. H. Bransky, G. A. Moore, Z. G. Li, and F. G. Gmitter. 2012. Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25: 1396-1407.
- Flowers, T. J., and A. R. Yeo. 1992. Transport in the phloem. *In: Solute transport in plants. Tertiary Level Biology.* Springer, Dordrecht. pp. 143-161.
- Folimonova, S. Y., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, S. Gowda, and W. O. Dawson. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) under different conditions. *Phytopathology* 99: 1346-1354.
- Gómez-Rosas, P., C. A. López-Luque, M. J. Perea-Flores, E. Camacho-Beltrán, N. E. Leyva-López, M. E. Santos-Cervantes, M. A. Magallanes-Tapia, H. San Martín-Matheis, M. Tu-

- cuch-Cauch, G. Rincón Enríquez, and J. Méndez-Lozano. 2015. Analysis of starch accumulation and phloem structure by confocal laser scanning microscopy in Mexican limes trees affected by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) after bio-products treatments. *In*: IV International research conference on Huanglongbing. 9-13 de febrero. Orlando, Florida, EUA. pp: 6.13.
- Geigenberger, P., and M. Stitt. 1993. Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in developing potato tubers and other plant tissues. *Planta* 189: 329-339.
- González, P. C., E. Exteberria, D. Achor, W. Dawson, T. Spann, J. D. Yates, y G. Albrigo. 2010. Uso de la reacción almidón-yodo para la selección de hojas sospechosas con HLB: distribución anatómica de niveles anormalmente altos de almidón en árboles de naranja valencia positivos al HLB. *In*: 2° Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos. 19-23 de julio. Mérida, Yucatán. México.
- Griffiths, C. A., M. J. Paul, and C. H. Foyer. 2016. Metabolite transport and associated sugar signalling systems underpinning source/sink interactions. *Biochim Biophys Acta* 1857: 1715-1725.
- Killiny, N. 2017. Metabolite signature of the phloem sap of fourteen citrus varieties with different degrees of tolerance to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 97: 20-29.
- Kim, J. S., U. S. Sagaram, J. K. Burns, J. L. Li, and N. Wang. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50-57.
- Lin, H., C. Chen, H. Doddapaneni, Y. Duan, E. L. Civerolo, X. Bai, and X. Zhao. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantitation of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *J. Microbiol. Methods* 81: 17-25.
- Liu, T. Y., C. Y. Chang, and T. J. Chiou. 2009. The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 312-319.
- Lou, B., X. Bai, Y. Bai, C. Deng, M. RoyChowdhury, C. Chen, and Y. Song. 2014. Detection and molecular characterization of a 16SrII-A* phytoplasma in grapefruit (*Citrus paradisi*) with Huanglongbing-like symptoms in China. *J. Phytopathol.* 162: 387-395.
- Mafra, V., P. K. Martins, C. S. Francisco, M. Ribeiro-Alves, J. Freitas-Astúa, and M. A. Machado. 2013. *Candidatus Liberibacter americanus* induces significant reprogramming of the transcriptome of the susceptible citrus genotype. *BMC Genomics* 14: 247.
- Maloney, V. J., J. Y. Park, F. Unda, and S. D. Mansfield. 2015. Sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase interact in planta and promote plant growth and biomass accumulation. *J. Exp. Bot.* 66: 4383-4394.
- Martinelli, F., S. L. Uratsu, U. Albrecht, R. L. Reagan, M. L. Phu, M. Britton, V. Buffalo, J. Fass, E. Leicht, W. Zhao, D. Lin, R. D'Souza, C. E. Davis, K. D. Bowman, and A. M. Dandekar. 2012. Transcriptome profiling of citrus fruit response to Huanglongbing disease. *PLoS One* 7 e38039.
- Martinelli, F., and A. M. Dandekar. 2017. Genetic mechanisms of the devious intruder *Candidatus Liberibacter* in citrus. *Front. Plant Sci.* 8: 904.
- Ramadugu, C., M. L. Keremane, S. E. Halbert, Y. P. Duan, M. L. Roose, E. Stover and R. F. Lee. 2016. Long term field evaluation reveals Huanglongbing resistance in citrus relatives. *Plant Dis.* 100: 1858-1869.
- Robles-González, M. M., J. J. Velázquez-Monreal, M. Á. Manzanilla-Ramírez, M. Orozco-Santos, V. M. Medina-Urrutia, J. I. López-Arroyo, y R. Flores-Virgen. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (christm) swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 19: 15-31.
- Robles-González, M. M., M. Orozco-Santos, M. Á. Manzanilla-Ramírez, J. J. Velázquez-Monreal, y S. H. Carrillo-Medrano. 2017. Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón mexicano en Colima, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 8: 1101-1110.
- Sagaram, M., and J. K. Burns. 2009. Leaf chlorophyll fluorescence parameters and Huanglongbing. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 134: 194-201.
- Schneider, H. 1968. Anatomy of greening diseased sweet orange shoots. *Phytopathology* 58: 1155-1160.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (Consulta: octubre 2018).
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2018. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx>. (Consulta: octubre 2018).
- StatPoint Inc. 2005. StatGraphics Centurion XV version 15.02.06. Warrenton, Virginia, USA. www.statgraphics.com.
- Stover, E., G. T. McCollum, R. Driggers, R. Lee, R. Shatters, Y. P. Duan, M. Ritenour, J. X. Chaparro, and D. G. Hall. 2015. Resistance and tolerance to Huanglongbing in citrus. *Acta Hortic.* 1065: 899-903.
- Teixeira, D. C., N. A. Wulff, E. C. Martins, E. W. Kitajima, R. Bassanezi, A. J. Ayres, S. Eveillard, C. Saillard, and J. M. Bové. 2008. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98: 977-984.
- Wind, J., S. Smeeckens, and J. Hanson. 2010. Sucrose: metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry* 71: 1610-1614.
- Zeeman, S. C., J. Kossmann, and A. M. Smith. 2010. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 209-234.
- Zhang, Y., J. K. Uyemoto, and B. C. Kirkpatrick. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J. Virol. Methods.* 71: 45-50.