

CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA

**SOLICITUD DE PERMISO DE LIBERACIÓN AL
AMBIENTE EN ETAPA EXPERIMENTAL**

**NARANJA VALENCIA GENÉTICAMENTE
MODIFICADA CON RESISTENCIA A HLB.**

**Expresando defensina humana como proteína
antimicrobiana.**

Versión con Información Pública

Promovente: Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

Depto. de Biotecnología y Bioingeniería

CINVESTAV Ciudad de México

Resumen

Huanglongbing (HLB) es una enfermedad destructiva, que potencialmente puede causar pérdidas totales en la producción de cítricos en México y en el resto del mundo. Los síntomas son amarillamiento de las hojas, menor producción de frutos, y eventualmente muerte de árbol enfermo. A la fecha no existe un tratamiento eficaz y se considera como la principal amenaza a la producción de cítricos (www.senasica.gob.mx). El agente causal del HLB es la bacteria no cultivable *Candidatus Liberibacter asiaticus*, cuyo hábitat se restringe al tejido vascular del floema en cítricos. La bacteria es transmitida por el psílido *Diaphorina citri*.

En el presente solicitud de permiso de siembra experimental se propone el uso de cítricos modificados genéticamente, expresando la proteínas antimicrobiana defensina con capacidad de movimiento sistémico in planta. Para este propósito, se ha generado naranja GM expresando defensina humana. Se pretende realizar la siembra experimental en un predio de acceso restringido en Tecomán, Colima, un área citrícola donde es endémico el HLB. La evaluación en campo nos permitirá estudiar la protección de las plantas en condiciones naturales de infección, y así adecuar la tecnología a los requerimientos propios de nuestro país.

Órgano de la Secretaría Competente a la que se Dirige la Solicitud

De acuerdo al Artículo 12, Fracción I de la LBOGM, la autoridad competente responsable de la emisión del permiso solicitado es la SAGARPA, quien ante el Registro federal de Trámites de la Comisión Federal de la Mejora Regulatoria registró como responsable del trámite a la Dirección de Inocuidad Agroalimentaria, Acuícola y Pesquera del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.

Dirección: Boulevard Adolfo Ruiz Cortines No. 5010, Colonia Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacán, Ciudad de México, C.P. 04530

De acuerdo al Artículo 12, Fracción I de la LBOGM, la autoridad competente responsable de la emisión del permiso solicitado es la SAGARPA, quien ante el Registro federal de Trámites de la Comisión Federal de la Mejora Regulatoria registró como responsable del trámite a la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

Ciudad de México a 16 de diciembre, 2016.

Firma de la interesada

Beatriz Xoconostle Cázares

I. Nombre del Representante legal y Apoderado

Representante Legal del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN:

Dr. José Mustre de León, Director General.

mustre@cinvestav.mx

Tel: 57473800

II. Domicilio para oír y recibir notificaciones

Av. Instituto Politécnico Nacional 2508

Col. San Pedro Zacatenco

07360 Ciudad de México.

Nombre de la Investigadora Autorizada por el Representante Legal

Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

Profesora Titular 3D

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Datos del OGM

Organismo: *Citrus x sinensis*

Nombre Común: Naranja Dulce Valencia.

Evento: Resistencia a HLB.

Origen de las plantas: CINVESTAV Ciudad de México.

Sitio de Liberación propuesto: Tecomán, Colima.

Número de Hectáreas solicitadas: Una.

Cantidad de semilla a importar: Las plantas se generaron en México.

Fenotipo adquirido: Resistencia a HLB.

Nombre comercial: No tiene.

Objetivo de la liberación al ambiente:

El objetivo de esta siembra a cielo abierto es evaluar una estrategia biotecnológica con potencial de controlar a la plaga cuarentenaria denominada HLB que infecta árboles de cítricos, de gran importancia para nuestro país. Cabe señalar que la industria citrícola en México siembra en una superficie de 549 mil Ha con una producción de 7 millones de toneladas y un valor de diez millones de pesos anuales, Desde el punto de vista social, trabajan en esta actividad 69,000 productores, generando 159,000 empleos directos y emplea más de cinco millones de jornales. El HLB se considera la enfermedad más devastadora que ha tenido el cultivo de cítricos en el país y a nivel mundial, para los cuales no hay una cura y control consiste en la remoción de los árboles infectados. El evaluar en campo posibles estrategias de control que ya han dado resultados en biocontención, nos permitirá conocer el comportamiento de los materiales genéticamente mejorados en sus condiciones naturales, lo que nos permitirá, adecuar la tecnología a los requerimientos propios de nuestro país.

REQUISITOS

I. Caracterización Molecular

El gen que se emplea en el presente desarrollo de la biotecnología moderna es la defensina humana. Esta proteína tiene propiedades antimicrobianas y pertenece al sistema inmune innato en humanos. Este sistema es la primera barrera inmunológica de nuestra especie y se sintetiza de manera constante en nuestro epitelio y se secreta en los fluidos corporales tales como saliva, sudor, lágrimas, mucosidades y está presente en el aparato digestivo (Alberts et al., 2002).

I. a Identificador Único del Evento de Transformación.

No se ha realizado el registro de la variedad ante la OCDE.

1. b Especies relacionadas con el OGM y distribución de éstas en México

Debido a que los cítricos son originarios de Asia, nuestro país no cuenta con especies nativas. Sin embargo, en nuestro país se siembran limón mexicano, limón persa, naranja dulce, mandarina, toronja, lima y naranja agria.

1. c Existencia de especies sexualmente compatibles

Los cítricos son plantas autogámicas, de reproducción sexual, con flores dioicas que abren cuando el carpelo se ha fecundado con el polen producido por la misma flor. El limón persa es una excepción en esta estrategia reproductiva, ya que su propagación es vegetativa. A pesar de producir flores, los frutos no tienen semillas, por lo que su propagación es vegetativa.

El naranjo o naranjo dulce, es un árbol frutal del género *Citrus*, que forma parte de la familia de las rutáceas. Es un árbol de porte mediano -aunque en óptimas condiciones de cultivo llega hasta los 13 m de altura-, perenne, de copa grande, redonda o piramidal, con hojas ovales de entre 7 a 10 cm de margen entero y frecuentemente estipulado y ramas en ocasiones con grandes espinas (más de 10 cm). Sus flores blancas, llamadas azahar, nacen aisladas o en racimos y son sumamente fragantes. Su fruto es la naranja dulce.

El naranjo es un árbol de tamaño mediano, de tres a cinco metros de altura, con copa redondeada y ramas regulares. Un solo tronco, derecho y cilíndrico, verdoso primero y gris después. Las ramas aparecen a un metro, poco más o menos, del suelo. Las hojas son perennes, medianas y alargadas, con base redondeada y terminadas en punta. Las flores aparecen en las axilas de las hojas, solitarias o en racimos.

El naranjo puede reproducirse por germinación de una semilla, por trasplante de una estaca o por acodo, es decir, partiendo de una raíz. En cualquier caso ha de transcurrir un cierto tiempo en el vivero o plantel antes de pasar al huerto o naranjal. En nuestro país, de acuerdo a normas mexicanas, debe injertarse en árboles o patrones resistentes al virus de la tristeza de los cítricos. Los patrones comunes son: *Citrus volkameriana*, indicado para terrenos arenosos, y *Citrus macrophylla*, para terrenos arcillosos.

Biología del cultivo

Citrus x sinensis es el nombre científico del árbol cuyos frutos son la naranja dulce para jugo. Es un árbol obtenido de diversas cruas genéticas de individuos de la especie Citrus, y forma parte de la familia de las rutáceas. El porte de estos árboles es mediano, aunque puede alcanzar hasta 10 a 12 metros en nuestro país. Generalmente se poda dentro del manejo integral del cultivo para cosechar eficientemente sus frutos. Es perenne, su copa es podada en forma esférica o bien cúbica si está sembrado a alta densidad y forma espalderas. Sus hojas son simples, de forma oval, simétricas con longitudes de 5 a 10 cm y su margen es estipulado. Los miembros del género Citrus tienen 3 meristemos latentes, de los cuales uno se diferencia a hoja, un segundo a espina y un tercero puede generar una ramificación. Las espinas pueden tener longitudes variadas, aunque la naranja Valencia que se cultiva en México puede llegar a tener hasta 5 cm de longitud. El cultivo tiene brotaciones inducidas por el invierno, o menor calidad de luz y menor temperatura. Las brotaciones son cambios diferenciativos en la fenología del cultivo que permiten a la planta cambiar la identidad de sus meristemos vegetativos a florales. Sus flores son blancas y pueden formar racimos, emiten sustancias volátiles atraerentes de polinizadores y son muy agradables.

En cultivo, el naranjo es un árbol de tamaño mediano, de tres a cinco metros de altura, con copa redondeada y ramas regulares. Posee un solo tronco, derecho y cilíndrico, que muestra crecimiento secundario. Las ramas aparecen isodiamétricas, las hojas pueden durar hasta dos años y son generalmente lustrosas por la deposición de sustancias hidrofóbicas que produce la planta que la defiende de estrés biótico y abiótico. En nuestro país, el naranjo se reproduce vegetativamente, a través del uso de varetas certificadas que contienen yemas latentes, las cuales se heteroinjetan en portainjertos o patrones de naranja agria (*Citrus volkameriana* y *Citrus macrophylla*), que muestra alguna resistencia al virus de la tristeza de los cítricos. El naranjo también puede crecer a través de la germinación de sus semillas, sin embargo, los frutos generalmente contienen un gran número de semillas, aunque son más vigorosos. El género *Citrus* agrupa especies tropicales, y muestra elevada susceptibilidad a temperaturas bajas, ya que una helada puede congelar el fruto y ya no tener calidad comercial. Adicionalmente, el frío causa defoliación e incluso puede matar al árbol. En México, su siembra ocurre en áreas costeras a baja altitud. El suelo es también muy importante en este cultivo perenne, y se recomienda injertar en patrones de *C. volkameriana* si el suelo es arenoso, ya que este patrón tiene raíz trepidatoria y es capaz de buscar agua a profundidad. En contraste, si el suelo es arcilloso, se recomienda el uso de patrones de *C. macrophylla*, que produce una raíz superficial fibrosa. En caso de terrenos con mezclas de arena y arcillas, se recomienda *C. macrophylla*, mientras que en suelo con grandes piedras, como es el caso de las áreas citrícolas en la Península de Yucatán, se recomienda el uso de *C. volkameriana*.

El naranjo al igual que el resto de los cítricos tienen su centro de origen y de diversidad en Asia, y fueron llevados a Europa por los árabes, y de ahí a América. En sánscrito la palabra *nâranga* que significa fragante.

12 principales países con la mayor producción de naranjas en 2012 (FAOSTAT, 2012). (millones de toneladas)					
Rank	País	Producción	Rank	País	Producción
1	 Brasil	18.0	7	 Egipto	2.8
2	 Estados Unidos	8.2	8	 Italia	1.8
3	 China	6.5 ^{est. 1}	9	 Turquía	1.7
4	 India	5.0 ^{est. 1}	10	 Sudáfrica	1.6
5	 México	3.7	11	 Indonesia	1.6
6	 España	2.9	12	 Pakistán	1.4 ^{est. 1}

1.d Descripción de los Hábitats donde el OGM puede persistir

Los cítricos son cultivos perennes, que se cultivan en zonas citrícolas y también en traspatios. El Servicio de Información Agrícola y Pecuaria (SIAP), reporta que en territorio mexicano se cultiva principalmente naranja dulce. La producción en toneladas y el valor de producción en miles de pesos, de las diferentes variedades para el año 2011 se detalla en la siguiente tabla:

La producción de naranja en México está dividida por zona geográfica: predominantemente se cultiva en el golfo de México.

1. e Descripción taxonómica del organismo receptor y donador

Organismo receptor:

Por favor, considere que se obtuvo de la base de datos la secuencia de aminoácidos de las proteínas defensina humana, misma que se empleó para diseñar un gen sintético con el uso de codones preferenciales de cítricos. A nivel de secuencia de DNA, el gen se considera sintético; sin embargo a nivel de secuencia de aminoácidos, corresponden a la presentes en humanos. A continuación se hace la descripción taxonómica.

Superreino (Dominio): Eukarya

Reino: Plantae

Subreino: Eudicotiledóneas

Superclase: Eudicots nucleares

Clase: Eurosidas

Subclase: Rosidae

Superorden: Rutanae

Orden: Rutales

Familia: Rutaceae Juss

Género Citrus

Especie: *Citrus x sinensis*

Organismo donador de los genes antimicrobianos

Como se indicó arriba, se obtuvo de la base de datos la secuencia de aminoácidos de la proteína defensina humana, misma que se empleó para diseñar un gen sintético con el uso de codones preferenciales de cítricos. A nivel de secuencia de DNA, el gen se considera sintético; sin embargo a nivel de secuencia de aminoácidos, corresponden a la presentes en humanos. A continuación se hace la descripción taxonómica.

Homo sapiens

El ser humano (*Homo sapiens*, del latín «homo», «hombre», y «sapiens», «sabio») es una especie de primate de la familia de los homínidos. También son conocidos bajo la denominación genérica de "humanos", poseen capacidades mentales que les permiten inventar, aprender y utilizar estructuras lingüísticas complejas, lógicas, matemáticas, escritura, ciencia y tecnología. Los humanos son animales sociales, capaces de concebir, transmitir y aprender conceptos totalmente abstractos (www.wikipedia.org). Pueden desarrollar sentimientos superiores como el amor a sus semejantes, altruismo, ayuda colectiva, compasión; aunque también pueden ser agresivos, crueles y territoriales.

Clasificación taxonómica:

Superreino: (Dominio): Eukaryota
Reino: Animalia
Subreino: Eumetazoa
Superfilo: Deuterostomia
Filo: Chordata
Subfilo: Vertebrata
Infrafilo: Gnathostomata
Superclase: Tetrapoda
Clase: Mammalia
Subclase: Theria
Infraclase: Placentalia
Superorden: Euarchontoglires
Orden: Primates
Suborden: Haplorrhini
Infraorden: Simiiformes
Parvorden: Catarrhini
Superfamilia: Hominoidea
Familia: Hominidae
Subfamilia: Homininae
Tribu: Hominini
Subtribu: Hominina
Género: *Homo*
Especie: *H. sapiens* Linnaeus, 1758

Organismo donador del terminador: *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria saprobia que puede causar tumores en plantas, generalmente en la base del tallo. *Agrobacterium* es una alfa proteobacteria, clado que incluye a las fijadoras de nitrógeno que viven en simbiosis con las leguminosas. El terminador es una secuencia en DNA de 6 bases que es empleada para terminar el proceso de transcripción de RNA y editar un homopolímero de Adeninas en el extremo 3' del RNA mensajero.

Clasificación taxonómica:

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Proteobacteria alfa

Orden: Rhizobiales

Familia: Rhizobiaceae

Género: *Agrobacterium*

Especie: *A. tumefaciens* (Smith & Townsend, 1907) Conn, 1942.

I. f País o localidad donde el OGM fue generado

La naranja Valencia genéticamente modificada se obtuvo en el Departamento de Biotecnología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), en las áreas de uso confinado. El CINVESTAV está localizado en la Av. IPN 2508 Col. San Pedro Zacatenco, 07360 Ciudad de México.

1. g Referencia documental sobre origen y diversificación del organismo receptor

Como se indicó, los cítricos son originarios de Asia. Las variedades presentes en nuestro país son limón mexicano, limón persa, naranja dulce, naranja agria, mandarina, lima toronja y mandarina, mientras que en el mundo existen las variedades que se describen a continuación:

Naranjos (*Citrus sinensis*), mandarinas (*Citrus reticulata*) y tangelos (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*), (*Citrus limon*), toronjas (*Citrus paradisi*), *Citrus limonia*, *Citrus limettoides* (McClean & Schwarz, citados en EPPO quarantine pest, 1990).

Aeglopsis chevalieri Swingle, *Atalantia missionis* Oliver, *Balsamocitrus dawei* Stapf., *Calodendrum capensis* Thunb, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don X *Citroncirus webberi* J. Ingram & H.E. Moore, *Citrus amblycarpa* Ochse, *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle, *Citrus aurantium* L., *Citrus depressa* Hayata, *Citrus grandis* (L.) Osbeck, *Citrus hassaku* Hort. ex Tanaka, *Citrus hystrix* DC., *Citrus ichangensis* Swingle, *Citrus jambhiri* Lushington, *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka, *Citrus kabuchi* Hort. ex Tanaka, *Citrus limon* (L.) Burm, *Citrus x limonia* Osbeck, *Citrus x nobilis* Lour. "Ortanique", *Citrus maxima* (pomelo/shaddock), *Citrus x nobilis* Lour., *Citrus oto* Hort. ex Tanaka, *Citrus x paradisi* Macfad., *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus sunki* Hort. ex Tanaka, *Citrus unshiu* (Mack.) Marc, *Clausena indica* Oliver, *Clausena lansium* (Lour.) Skeels, *Cuscuta australis* R. Br. (Convolvulaceae, Cuscutaceae), *Fortunella* spp., *Limonia acidissima* L., *Microcitrus australasica* (F.J. Muell.) Swingle, *Murraya koenigii* (L.), *Murraya paniculata* (L.) Jack, *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr., *Toddalia lanceolata* Lam, *Triphasia trifolia* (Burm. f.) P. Wilson.

A continuación se muestra la distribución mundial de los cítricos.

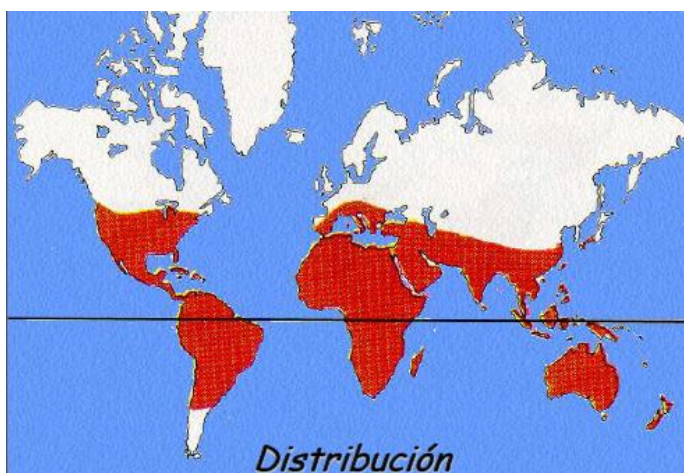


Figura 2. Distribución de los cítricos en el mundo, principalmente entre los Trópicos de Cáncer y Capricornio.

Hábito: Son árboles o arbustos, perennes, aromáticos por la presencia de glándulas secretoras de aceites esenciales, mesófitas o xerófitas.

Hojas deciduas, trifoliadas o compuestas, alternas, sin estípulas, con cavidades secretoras o esquizógenas, en general con espinas.

Reproducción: Son plantas hermafroditas, algunas variedades no comerciales son monoicas o dioicas. Su polinización es autogámica, aunque son visitadas por insectos, principalmente abejas. Sus inflorescencias son corimbos o panículas terminales. Sus flores son bracteadas, olorosas de color blanco u amarillo verdoso, presentan disco hipógino. Su cáliz es lobulado con múltiplos de 4 o 5 unidades. La corola tiene como consecuencia, pétalos de 4 o 5 y sus múltiplos, los pétalos son solapados, dentados o ciliados y tienen un disco basal nectarífero con 8 a 20 glándulas secretoras. El androceo puede tener de 2 a 60 estambres. El gineceo contiene un ovario súpero, lobulado, de 1 a 100 carpelos fusionados. El fruto es un hesperidio, mientras que las semillas poseen endospermo (García Breijo, 2010).

Fisiología: Son plantas con metabolismo C3, cianogénicas o no cianogénicas, con y sin alcaloides, presencia o no de proantocianidinas, síntesis de flavonoides como quercetina, kenferol o miticetina. Puede producir saponinas y se han detectado antroquinonas (García Breijo, 2010).

Referencias bibliográficas sobre los datos presentados.

Agostini, J.P. (2011). Cítricos: El HLB y su prevención. Revista de Investigaciones Agropecuarias. Buenos Aires, Argentina. <http://ria.inta.gov.ar/?p=677>, consultada en noviembre, 2016.

Almon E., Horowitz M., Wang H.L., Lucas W.J., Zamski E., Wolf S. (1997) Phloem-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein alters carbon metabolism and partitioning in transgenic potato plants. *Plant Physiol* 115:1599–1607

Benkerroum N. (2008) Review: Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology* 7: 4856-4867

Botha C.E.J., Cross R.H.M., van Bel A.J.E, Peter C.I. (2000) Phloem loading in the sucrose-export-defective (SXD-1) mutant maize is limited by callose deposition at

plasmodesmata in bundle sheath–vascular parenchyma interface. *Protoplasma* 214:65–72.

Bové J.M., Bonnet P., Garnier M., Aubert B. (1980). Penicillin and tetracycline treatments of greening disease-affected citrus plants in the glasshouse, and the bacterial nature of the procaryote associated with greening. *Proceedings of 8th Conference IOCV, IOCV Riverside 1980*, 91-102.

Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37.

Callewaert L., & Michiels C.W. (2010) Lysozymes in the animal kingdom; *J. Biosci.* 35:127–160.

Camas, A., Cárdenas, L., Quinto, C., Lara, M. (2002) Expression of Different Calmodulin Genes in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): Role of Nod Factor on Calmodulin Gene Regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 15:428–436.

Cervera, M., José, J., Navarro, A., José, A., Pina, J.A., Navarro, L., Peña, L. (1998) Genetic transformation and regeneration of mature tissue of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.* 7: 51–59.

Cervera, M., José, J., Navarro, L., Peña, L. (2004) Genetic transformation of mature citrus plants. *Methods Mol. Biol.* 286: 177–187.

Coca M., Peñas G., Gómez J., Campo S., Bortolotti C., Messeguer J., Segundo B.S. (2006) Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice. *Planta* 223: 392–406.

Codon Usage Database <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.

Coletta-Filho H. D., Targon M. L. P. N., Takita M. A., De Negri J. D., Pompeu J., Jr, Machado M. A., Amaral A. M. & Muller G. W. (2004). First report of the causal agent of huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) in Brazil. *Plant Dis* 88,1382.

Crang R., y Vassilyev A. Plant Anatomy. Libro electrónico, consultado en mayo 2013 en: http://www.cls.zju.edu.cn/sub/fulab/plant_Antomy/plant/index.html

da Graca J. V. and Korsten L. (2004) Citrus Huanglongbing: Review, Present Status and Future Strategies. Diseases of fruit and Vegetables 1: 229-245.

da Graça, J.V. Biology, history and world status of Huanglongbing. (2008) Resumen I Taller Internacional sobre Huanglongbing de los cítricos (*Candidatus Liberibacter* spp) y el psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*). Hermosillo, Sonora. México

Distribución de Huanglongbing (HLB) en México. Fuente: Original con datos de SENASICA. Consultado en mayo 2013 en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4608>

Doddapaneni H., Liao H., Lin H., Bai X., Zhao X., Civerolo E. L., Irey M., Coletta-Filho H., & Pietersen G. (2008) Comparative phylogenomics and multi-gene cluster analyses of the Citrus huanglongbing (HLB)-associated bacterium *Candidatus Liberibacter*. BMC Res. Notes 1:72.

Drake G.A., Carr D.J., Anderson W.P. (1978) Plasmolysis, plasmodesmata, and electrical coupling of oat coleoptile cells. J Exp Bot 29:1205–1214.

Duan Y., Zhou L., Hall D.G., Li W., Doddapaneni H., Lin H., Liu L., Vahling C.M., Gabriel D.W., Williams K.P., Dickerman A., Sun Y., Gottwald T. (2009) Complete Genome Sequence of Citrus Huanglongbing Bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus* Obtained Through Metagenomics. The American Phyto-pathological Society. 22:1011–1020.

Düring K., Porsch P., Fladung M., Lörz H. (1993) Transgenic potato plants resistant to the phytotopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. The plant Journal 4: 587-598.

Düring K. (1996) Mini-review: Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes Molecular Breeding 2: 297-305
Esau K., Cheadle V.I. & Gifford E.M. (1953) Comparative structure and possible trends of specialization of the phloem. Amer. J. Bot. 40: 9-19.

Ettxeberria E., Gonzalez P., Achor D., Albrigo G. (2009) Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74: 76–83.

Febres V., Fisher L., Khalaf A., & Moore G.A. Citrus transformation: Challenges and prospects. Horticultural Sciences Department, Plant Molecular and Cellular Biology Program, University of Florida USA. Consultado en abril 2013 en: http://cdn.intechopen.com/pdfs/18815/InTech-citrus_transformation_challenges_and_prospects.pdf 22 mayo 2013 Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Commodities by country, countries by commodities, top rank in the world, by commodities, año 2013. Consultado el 08 de mayo de 2013 en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

Fundecitrus. 2009. Manual técnico de Greening. Folleto técnico. Brasil. 12 pp. Gao A.G , Hakimi S.M., Mittanck C.A., Wu Y., Woerner B.M., Stark D.M., Shah D.M., Liang J, Rommens C.M. (2000) Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 18:1307–1310.

García- Darderes C. (2009). *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemíptera: Psyllidae), vector de la bacteria que Causa el Huanglongbing (HLB – Greening). Ministerio de la Producción Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires, Argentina.

Garnier M., Bové J.M. (1977) Structure trilamellaire des deux membranes qui entourent les organismes procaryotes associés à la maladie du “greening” des agrumes. *Fruits* 32:749-752.

Garnier M., Danel N., Bové J.M. (1984a). Aetiology of Citrus Greening Disease. *Ann. Microbiology. (Inst. Pasteur)* 135A: 169-179.

Garnier, M., Danel, N., Bové, J.M. (1984b). The greening organism is a Gram negative bacterium. *Proc 9th Conf. IOCV*, 115-124, IOCV, Univ. Calif., Riverside, CA.

GenBank Database. Consultado en abril 2012 en: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Gottwald T.R., da Graça J.V., Bassanezi R.B. (2007) Citrus huanglongbing: The pathogen, its epidemiology, and impact. Plant Healthy Progress doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV. Grafton-Cardwell E., Godfrey K.E., Rogers M.E., Childers C., Stansly P.A. (2006) Asian Citrus Psyllid. Publication 8205. University of California-Riverside. Division of Agriculture and Natural Division.

Gurr S.J. & Rushton P.J. (2005) Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? TRENDS in Biotechnology 23: 275-282
Halbert S.E. & K.L. Manjunath. (2004) Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. Florida Entomologist 87(3): 330-353.

Haywood V., Yu T. S., Huang N. C. & Lucas, W. J. (2005) Phloem long-distance trafficking of gibberellic acid insensitive RNA regulates leaf development. Plant J 42: 49-68

Informe de la Dirección General de Sanidad Vegetal y Sistemas de Alerta Fitosanitaria de la NAPPO (2008).

International Organization of Citrus Virologist. Consultada en mayo 2013 en: <http://www.ivia.es/iocv/>

Jagoueix S., Bové J.M., Garnier M. (1994) The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α -subdivision of the Proteobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 397-386.

Koh E.J., Zhou L., Williams D.S., Park J., Ding N., Duan Y.P., Kang B.H. (2011). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". Protoplasma (publicado electrónicamente) PMID: 21874517.

Laflèche D., Bové J.M. (1970a) Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, 270: 1915-1917.

Laflèche D., Bové J.M. (1970b) Mycoplasmes dans les agrumes atteints de “greening”, de “stubborn” ou de maladies similaires. *Fruits* 25: 455-465. Lee, H. A. (1921). The relation of stocks to mottled leaf of citrus leaves. *Phil. J. Sci.* 18: 85-95.

Lin, C. K. (1956) Observations on yellow shoot on citrus. *Acta Phytophylact. Sin.* 2: 237-242. Lin, K.H. (1956) Yellow shoot of citrus. Symptomatology. Investigations in the cause of huanglongbing. Natural transmission and spread. General conclusions. *Acta Phytopathologica Sinica* 2:1-42

Lin M.K., Belanger H., Lee Y.J., Varkonyi-Gasic E., Taoka K., Miura E., Xoconostle-Cázares B., Gendler K., Jorgensen R.A., Phinney B., Lough T.J., Lucas W.J. (2007) FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* 19: 1488-1506.

López-Collado, J. (2013) Manejo de la enfermedad Huanglongbing (HLB) mediante el control de poblaciones del vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), el psílido asiático de los cítricos. Reporte CONACYT. Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Consultado en enero 2013

López-Arroyo, J.I., M.A. Peña, M.A. Rocha Peña, Y J. Loera. (2005). Ocurrencia en México del psílido asiático *Diaphorina citri* (Homoptera: Psyllidae), pp. C68. En: Memorias del VII Congreso Internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chih., Méx.

Martinelli F., Uratsu S.L., Albrecht U., Reagan R.L., Phu M.L. (2012) Transcriptome Profiling of Citrus Fruit Response to Huanglongbing Disease. *PLoS ONE* 7(5): e38039. doi:10.1371/journal.pone.0038039

Martinez A.L., Wallace J.M. (1967) Citrus leaf mottle-yellows disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. *Plant Disease Reporter* 51: 692-695.

Martínez- Carillo J.L. (2008) Ficha Técnica *Diaphorina citri* Kuwuyama, Psílido asiático de los cítricos. SAGARPA- SENASICA-SINAVEF. Martínez Carrillo J.L. & Cortez Mondaca. (2008) El psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri* amenaza la

producción citrícola de México. Memoria del XI Congreso Internacional en Ciencias Agrícolas. UABC.

Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E.G., Michiels C.W. (2001) Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl Environ Microbiol.* 67:339-344.

McClellan A.P.D., Oberholzer P.C.J. (1965a). Greening disease of sweet orange: evidence that it is caused by a transmissible virus. *South Africa Journal of Agricultural Science* 8: 253-276.

McClellan A.P.D., Oberholzer P.C.J. (1965b). *Citrus psylla*, a vector of the greening disease of sweet orange. *South Africa Journal of Agricultural Science* 8: 297-298.

Ministerio de la Producción. Secretaría de la Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires, Argentina, 2009.

Montesinos E. (2007) Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters*, 270: 1–11. Nakajima H., Muranaka T., Ishige F., Akutsu K. (1994). Fungal and bacterial disease resistance in transgenic plants expressing human lysozyme *Plant Cell Report* 16: 674–679.

Osusky M., Zhou G., Osuska L., Hancock R.E., Kay W.W., Misra S. (2000) Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens *Nat. Biotechnol.* 18, 1162–1166

Park C.H., Kang Y.H., Chun H.J. (2002) Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. *Plant Mol Biol* 50: 59–69.

Philips, D.C. (1967) The Hen-Egg White Lysozyme Molecule. *Proceedings of the National Academy of Science.* 57:483- 495.

Radford J., Vesik M., Overall R. (1998) Callose deposition at plasmodesmata. *Protoplasma* 201:30–37

Rinne P., Schoot C. (2003) Plasmodesmata at the crossroads between development, dormancy, and defense. *Can J Bot-Rev Canadienne De Botanique* 81:1182–1197

Rinne P.L., van den Boogaard R., Mensink M.G., Kopperud C., Kormelink R., Goldbach R., van der Schoot C. (2005) Tobacco plants respond to the constitutive expression of the Tospovirus movement protein NS(M) with a heat-reversible sealing of plasmodesmata that impairs development. *Plant J* 43:688–707

Roberts A.G., Oparka K.J. (2003) Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Env* 26:103–124

Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., Kragler F. (2004). The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 641-650.

Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cazares B., Lucas W.J. (1999) Phloem long distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* 126: 4405–4419

Russin W.A., Evert R.F., Vanderveer P.J., Sharkey T.D., Briggs S.P. (1996) Modification of a specific class of plasmodesmata and loss of sucrose export ability in the sucrose export defective1 maize mutant. *Plant Cell* 8:645–658

Sambrook, J. & Green M.R. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schaefer S.C., Gasic K., Cammue B., Broekaert W., van Damme E.J.M., Peumans W.J. & Korban S.S. (2005) Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. *Planta* 222: 858–866.

Schneider H. (1981) Plant anatomy and general botany. In: Clark G, editor. *Staining procedures for biological stain commission*. 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; pp. 315–73.

Sharma A., Sharma R., Imamura M., Yamakawa M. & Machii H. (2000) Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Letters* 484: 7–11

SENASICA, Quinto Informe de Labores, Senasica, 2011. senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=21587.

Servicio de Información Agrícola y Pecuaria (SIAP). Cierre de la producción agrícola en México por cultivo, año 2011. Consultado el 08 de mayo 2013 en: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350

Sivaguru M., Fujiwara T., Šamaj J., Baluška F., Yang Z., Osawa H., Maeda T., Mori T., Volkmann D., Matsumoto H. (2000) Aluminum-induced 1→3-β-D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant Physiol* 124:991–1005

Smith A.M., Denyer K., Martin C. (1987) The synthesis of the starch granule. *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 48:67–87

Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening, 2010. Consultado en abril de 2012 en la página de Board on Agriculture and Natural Resources (BANR). http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=12880&page=41

Stover E., Richard R., Stange, Jr., & Gregory T.M. (2013) Screening Antimicrobial Peptides In Vitro for Use in Developing Transgenic Citrus Resistant to Huanglongbing and Citrus Canker. *J. AMER.SOC.HORT.SCI.* 138:142–148.

Taiz L. & Zeiger E. (2010) *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

Tatineni S., Sagaram U.S., Gowda S., Robertson C.J., Dawson O.W., Iwanami T., Wang T. (2008) In Planta Distribution of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. *Phytopathology* 98: 592-599

Teixeira D. C., Saillard C., Couture C., Martins E.C., Wulff N.A., Eveillard-Jagoueix S., Yamamoto P.T., Ayres A.J., Bove J.M. (2008) Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22: 139–150

Texeira C. D., Saillard C., Eveillard S., Danet L. J., da Costa P., Ayres J.A., Bové, J. (2005). *Candidatus Liberibacter americanus*, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1857–1862.

Universal Protein Resource (UNIPROT) Database. Consultado en enero 2013 en: www.uniprot.org

van der Biezen E.A. (2001) Quest for antimicrobial genes to engineer disease-resistant crops *TRENDS in Plant Science* 6: 89-91

Van der Merwe A. J., Andersen F. G. (1937) Chromium and manganese oxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Farming in South Africa*. 12: 439-440.

Vocadlo D. J., Davies G. J., Laine R., Withers S. G. (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature* 412: 835- 838

Wang T.L., Bogracheva T.Y., and Hedley C.L. (1998) Starch: as simple as A, B, C. *J Exp Bot* 49:481–502.

Williams K. P., Sobral B. W., Dickerman A. W. (2007) A robust species tree for the Alphaproteobacteria. *J. Bacteriol.* 189: 4578-4586.

Xin-Wu P., Shi-Kai C., Rui-Ming W., Shang Y., Jia-Qin H., Yong-Qiang Z., Bing-Shan W., Zhi-Xing W., Shi-Rong J. (2005) Creation of Transgenic Bananas Expressing Human Lysozyme Gene for Panama Wilt Resistant. *Journal of Integrative Plant Biology*. 47: 971–977

Yelenosky G., Guy C.L. (1977) Carbohydrate accumulation in leaves and stems of 'Valencia' orange at progressively colder temperatures. *Bot Gaz* 138:13–7.

Zavaliev R., Sagi G., Gera A., Epel B.L. (2010) The constitutive expression of Arabidopsis plasmodesmal-associated class 1 reversibly glycosylated polypeptide impairs plant development and virus spread. J Exp Bot 61:131–142

II. Identificación de la zona donde se pretende liberar el OGM.

II.a Superficie total del polígono o polígonos donde se realizará la liberación

Se propone un predio localizado en el Rancho el Pandelo y las Ánimas en el área conocida como el Llano, Municipio de Tecomán. Se muestra el polígono propuesto empleando el motor de ubicación de coordenadas UTM (<http://www.permacultura.org.mx/es/>). Como propuesta se indica el área de 7,500 m², marcado con color azul (Figura 11).



— 0.45 cm = 50 m

Área propuesta para ubicación del ensayo experimental. Tecomán, Colima.

Protocolos a evaluar:

1. **Efectividad Biológica:** Concentración de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) en cada tratamiento. Detección de los antimicrobianos en tratamientos.
2. **Equivalencia agronómica:** Mediciones de talla, diámetro del tronco, brotación y capacidad fotosintética de ramas por tratamiento.

3. **Interacciones ecológicas:** Monitoreo de las poblaciones de insectos y malezas en el predio.
4. **Prácticas agronómicas:** Estimación de insumos del manejo integrado del cultivo.
5. **Productividad:** Producción de flores, llenado de frutos, calidad del fruto, peso unitario, diámetro de frutos, peso por tratamiento.

Periodicidad de las evaluaciones. Se propone realizar evaluaciones con periodicidad mensual, arrancando con una inicial al momento de establecer el ensayo experimental. La duración del ensayo sería el tiempo necesario para completar dos o tres ciclos de cosecha, a partir de la instalación del mismo.

Manejo agronómico del ensayo experimental. El manejo de la huerta experimental se realizará de acuerdo con lo reportado por Robles-González *et al.*, (2013) para la región de Tecomán, Colima.

Literatura citada

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2007. NOM-032-FITO-1995.
Robles-González et al. 2013. Revista Chapingo Serie Horticultura.
SAS Institute 2009. Cary, NC. USA.

II. c. 1 Listado de especies sexualmente compatibles

El Municipio de Tecomán, es el área más grande en el país con cultivo de limón mexicano y persa. Los cítricos son plantas autogámicas, de reproducción sexual, con flores dioicas que abren cuando el carpelo se ha fecundado con el polen producido por la misma flor. El limón persa es una excepción en esta estrategia reproductiva, ya que su propagación es vegetativa. A pesar de producir flores, los frutos no tienen semillas, por lo que su propagación es vegetativa.

El naranjo (*Citrus x sinensis*) es un árbol vigoroso, de porte erguido, fruto suele ser redondo, con diámetro promedio de 10 cm. El fruto es de corteza suave, en estado inmaduro es color verde, mientras que su coloración se torna anaranjado en su madurez (SIAP, 2011).

Especies sexualmente compatibles

La zona citrícola del Llano en Tecomán tiene huertos esencialmente de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*). En la actividad agrícola, el limón es el principal cultivo de la región, mismo que posiciona al Estado de Colima en el 2° lugar nacional (http://www.sefome.gob.mx/docs/2012/cedula_pdf/Tecomán.pdf) en producción de limón mexicano y derivados. Otros cultivos destacados del municipio son: pastos, plátano, coco, caña de azúcar, papaya, sandía, mango, chile verde, melón y tomate rojo. Las especies de ganado son: bovino, porcino, ovino, caprino y pollos de engorda.

Flora: La vegetación que predomina en los cerros está formada por xolocoahuítl, habillo, mojo, guásima, tepemezquite, asmol, llorasangre, timúchil, coliguana, granjeen, otate, etc. La parte del Valle fue reforestada con plantaciones de palmeras, frutales, limón y otros cultivos (http://vinculando.org/documentos/monografia_colima.html).

Fauna: coyote, jabalí, tejón, ardilla, iguana, peces del río, caimanes en esteros y lagunas, aves como la güilota y la chachalaca. **No existen áreas naturales protegidas** (http://vinculando.org/documentos/monografia_colima.html).

Características y uso del suelo: Los suelos en su mayoría son de origen aluvial aunque de diferentes modos de formación, pues se tiene los que se constituyeron por las crecientes de los ríos Armería y Coahuayana, por los depósitos de arena del océano y los que fueron intercalados con sedimentos de origen marítimo. Su principal uso es de tipo agrícola (http://vinculando.org/documentos/monografia_colima.html).

No hay reportes de animales que se alimenten de cítricos, se hipotetiza que su gran cantidad de espinas y la acidez de los frutos evitan la depredación.

II. c. 4 Descripción geográfica de áreas protegidas.

Existe controversia sobre la presencia de áreas naturales protegidas. A continuación se citan las áreas que podrían estar protegidas.

Laguna de Alcuzahue. A 8 kilómetros al este de Tecomán se encuentra entre los cerros la Laguna de Alcuzahue. Los ejidatarios del lugar han construido un museo donde se muestran cocodrilos disecados, también se crían cocodrilos y se puede caminar alrededor de la laguna a través de un sendero construido exprofeso. El acceso a la laguna es por un camino de terracería, no en buenas condiciones cuando llueve. La laguna colinda con sembradíos de caña de azúcar y limón.

Laguna de Amela. Se localiza a 20 kilómetros aproximadamente al este de Tecomán. También la opera una cooperativa de ejidatarios y se puede pescar, aunque hay pequeñas palapas con comida del mar.

Desembocadura El Chupadero. Localizado a 12 kilómetros de Tecomán, se encuentra la desembocadura del río El Chupadero. En época de sequía, el río también se seca o lleva muy poca agua. Cerca hay balnearios provistos con restaurantes

Bibliografía de los datos presentados

Aubert, B., and J.M. Bové. 1980. Effect of penicillin or tetracycline injections of citrus trees affected by greening disease under field conditions in Reunion Island. In Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, eds. E.C.

Bové JM (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology. 88: 7-37.

Bové, J.M., P.Bonnet, M. Gamier, and B. Aubert. (1980). Penicillin and tetracycline treatments of greening disease-affected citrus plants in the glasshouse, and bacterial nature of the prokaryote associated with greening. In proceedings of the 8th conference of the international Organization of citrus Virologist, eds. E.C. Cavalan, S.M., Garnsey and L.W. Timmer, pp.91-102, May 13-31, 1979, at Australia. Riverside, CA:IOVC.

Bové, J.M., M. Garnier, Y.S. Ahlawat, N.K. Chakraborty, and A. Varma. 1993. Detection of the Asian Strains of the greening BLO by DNA-DNA hybridization in Indian orchard trees and Malaysian *Diaphorina citri* psyllids. In Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, eds. P. Moreno, J.V. da Graça and L.W. Timmer, pp. 258–263, November 23–27, 1992, at New Delhi, India. Riverside, CA:

Broekaert WF, Terras FR, Cammue BP, Osborn RW. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. Plant Physiol. 108:1353-8

Burckhardt, D., D. Ouvrard, D. Queiroz and D. Percy. 2014. Psyllid host (Hemiptera: Psylloidea): Resolving a semantic problem. Florida Entomologist. 97 (1): 242-247.

Callewaert L, Michiels CW. (2010).[Lysozymes in the animal kingdom.](#)J Biosci.(1):127-60.

Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. Science 316: 1030-1033.

Duan YP, ZhouLJ, Hall DG, Li WB, Doddapaneni H, et al. (2009). Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, "Canüdated Liberibacter asiaticus" obtained through metagenomics.

MPM I 22 :1011 -20

Esau, K., V. I. Cheandle and E. M. Gifford. 1953. Comparative structure and possible trends of specialization of the phloem. Amer. J. Bot. 40: 9-19.

<http://faostat.fao.org>

Ganz T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nat Rev Immunol. 3(9):710-20.

Halbert S, Manjunath K. 2004. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. Fla. Entomol. 87 330-53

Hansen, A. K., J. T. Trumble, R. Stouthamer and T. D. Paine. 2008. A new Huanglongbing species '*Candidatus Liberibacter psyllaeus*' found to infect tomato and potato is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). Applied and Environmental Microbiology. 74 (8): 5862-5865.

Hartung JS, Shao J, Kuykendall LD. (2011). Comparison of the 'Ca. Liberibacter asiaticus' genome adapted for an intracellular lifestyle with other members of the Rhizobiales. PLoS One. 2011; 6(8):e23289.

Haywood V, Kragler F, Lucas WJ (2002) Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. Plant Cell 14(Suppl):S303–S325.

Hollis, D. 1987. A new citrus-feeding psyllid from the Comoro Islands, with a review of the *Diaphorina amoena* species group (Homoptera). Systematic Entomology. 12: 47-61.

[Biegel JM, Stewart CB.](#) (2011). Evolution of the mammalian lysozyme gene family.

[BMC Evol Biol.](#)15;11:166.

Koh EJ, Zhou L, Williams DS, Park J, Ding N, Duan YP, Kang BH. (2011). Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". Protoplasma (publicado electrónicamente) PMID: 21874517.

Lay FT, Anderson MA. (2005) Defensins--components of the innate immune system in plants. Curr Protein Pept Sci. 6:85-101.

Li W. B., J.S. Hartung and L.E. Levy. (2006). Quantitative real time PCR for detection and identification of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing. J. Microbiol Methods. 66: 104-115.

León Ramírez, M.J., B. Xoconostle C., R. Ruiz M. 2004. Comunicación intercelular a distancia a través del floema en plantas. Ciencia al Día Internacional ABRIL, 2004 NUMERO 2 VOLUMEN 5.

Lin H, Coletta-Filho HD, Han CS, Lou B, Civerolo EL, Machado MA, Gupta G.

Draft Genome Sequence of "Candidatus Liberibacter americanus" Bacterium Associated with Citrus Huanglongbing in Brazil. Genome Announc. 2013 May 23;1(3). pii: e00275-13. doi: 10.1128/genomeA.00275-13

Lin MK, Belanger H, Lee YJ, Varkonyi-Gasic E, Taoka K, Miura E, Xoconostle-Cázares B, Gendler K, Jorgensen RA, Phinney B, Lough TJ, Lucas WJ. (2007). FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. Plant Cell 19: 1488-1506.

Lin H, Lou B, Glynn JM, Doddapaneni H, Civerolo EL, Chen C, Duan Y, Zhou L, Vahling CM. (2011). The complete genome sequence of 'Candidatus Liberibacter solanacearum', the bacterium associated with potato zebra chip disease. PLoS One 6: e19135.

Lough TJ, Lucas WJ. (2006). Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. Annu Rev Plant Biol 57:203-232.

Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav SR, Helariutta Y, He XQ, Fukuda H, Kang J, Brady SM, Patrick JW, Sperry J, Yoshida A, López-Millán AF, Grusak MA, Kachroo P. (2013). The plant vascular system: evolution, development and functions. J Integr Plant Biol. Apr; (4):294-388.

Marmioli N, Maestri E. (2014). Plant peptides in defense and signaling. Peptides. 56C:30-44. doi: 10.1016/j.peptides.2014.03.013.

Masschalck B, Van Houdt R, Van Haver EG, Michiels CW (2001). Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. Appl Environ Microbiol. 67:339-344.

Moll, J.N., & S.P. van Vuuren. 1977. Greening disease in Africa. In Proceedings of the 2nd International Citrus Congress - International Society of Citriculture, Vol. 3, pp. 903–912, n.d., Orlando, FL. Gainesville: University of Florida Press.

Moll, J.N., S.P.V. Vuuren, & D.L. Milne. 1980. Greening disease, the Southern African situation. In Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, eds. E.C. Calavan, S.M. Garnsey and L.W. Timmer, pp. 109–117.

Moll A, Manning PA, Timmis KN. (1980). Mid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the traT gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* (2):359-67.

Nawrot, R, Barylski J, Nowicki G, Broniarczyk J, Buchwald W, Goździcka-Józefiak A. Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiol (Praha)* 2014; 59: 181–196. Published online 2013 October 4. doi: 10.1007/s12223-013-0280-4

Provencher LM, Miao L, Sinha N, Lucas WJ (2001). Sucrose export defective1 encodes a novel protein implicated in chloroplast-to-nucleus signaling. *Plant Cell* 13:1127-1141.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ (1999) Phloem long-distance transport of mNACP mRNA: Implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**, 4405-4419.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Kragler F. (2004). The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 641-650.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ. (2001). The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol.* 4:202-209.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cázares B, Ham BK, Li G, Lucas WJ. (2011). Vascular expression in *Arabidopsis* is predicted by the frequency of CT/GA-rich repeats in gene promoters. *Plant J* 67:130-144.

Ruiz-Medrano R. F. Kragler , and S. Wolf. 2012. Signaling and Phloem-Mobile Transcripts. F. Kragler and M. Hülskamp (eds.), *Short and Long Distance Signaling*, 151 Advances in Plant Biology 3.

Robles-González, M. M., J. J. Velázquez-Monreal, M. A. Manzanilla-Ramírez, M. Orozco-Santos, V. M. Medina-Urrutia, J. I. López-Arroyo, 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. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 19(1): 15-31).

Schwarz, R.E., and S.P. von Vuuren. 1971. Decreasing fruit greening of sweet orange by trunk injections of tetracycline. *Plant Disease Reporter* 55:747–750.

Schwarz, R.E., J.N. Moll, S.P. van Vuuren. 1974. Control of citrus greening of citrus psylla vector by trunk injections of tetracycline and insecticides. In *Proceedings of the 6th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, eds. L.G. Weathers and M. Cohen, pp. 26–29, August 21–28, at Swaziland. Riverside, CA: IOCV.

Singh S, Rajam MV. 2009. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol Mol Biol Plants*. (1):3-22.

Stotz HU, Thomson JG, Wang Y. 2009. Plant defensins: defense, development and application. *Plant Signal Behav*. 4:1010-2.

Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening (2010) Committee on the Strategic Planning for the Florida Citrus Industry: Addressing Citrus Greening Disease (Huanglongbing); National Research Council of the National Academies USA. ISBN 978-0-309-15207-5.

Taylor K, Barran PE, Dorin JR. (2008) Structure-activity relationships in beta-defensin peptides. *Biopolymers*. 90:1-7.

Trivedi P, Sagaram UP, Kim JS, Bransky RH, Rogers ME, Stelinski LL, Oswalt C, Wang N. 2009. Quantification of viable '*Candidatus Liberibacter*

asiaticus' in hosts using quantitative PCR with the aid of ethidium monoazide (EMA). Eur. J. Plant Pathol. 124: 553-563).

Van Bel AJ, Gaupels F. (2004) Pathogen-induced resistance and alarm signals in the phloem. Mol Plant Pathol 5:495-504.

Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R, Withers SG. (2001) Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. Nature. 412:835-8.

Wuriyanghan, H. & B. W. Falk. 2013. RNA interference towards the potato psyllid *Bactericera cockerelli*, is induced in plants infected with recombinant *Tobacco Mosaic Virus* (TMV). PLOS ONE. 8(6): e66050 doi: 10.1371/journal.pone.0066050.

Wong JH, Xia L, Ng TB. (2007) A review of defensins of diverse origins. Curr Protein Pept Sci. 8:446-59.

www.uniprot.org

IV. a. 2 Estrategias de monitoreo posteriores a la liberación.

Inspección visual: Se realizará el monitoreo alrededor del predio para identificar plantas voluntarias, durante todo el desarrollo del cultivo, aunque debe considerarse que no tendremos floración o esta será reducida. Se buscará la presencia de plántulas alrededor del predio, dichas plantas serán sujetas a detección del transgen por métodos moleculares.

IV. a 3 Estrategias para la detección del OGM y su presencia posterior

Como fue indicado en la inspección visual, las plantas voluntarias obtenidas serán sujetas a análisis molecular con la técnica de PCR en punto final descrita en el apartado II. Dicha inspección se realizará en un periodo de seis meses posteriores a la conclusión de la siembra. Cabe señalar que en Tecomán impera un clima tropical húmedo, que favorece el crecimiento de los cítricos. En el tiempo propuesto de seis meses, un cítrico convencional es capaz de alcanzar hasta 2 metro de talla.

Por ello, se considera este tiempo como suficiente como para poder identificar alguna plántula proveniente del GM. Cabe señalar que no habrá floración debido al estado juvenil de los árboles y que la aparición de algún esqueje será registrada y se procederá a su remoción, aunque la naranja GM está injertada en patrones no GM, de los cuales se podría observar algún esqueje.

IV. b Medidas y Procedimientos de Bioseguridad

IV. b. 1 Medidas y procedimientos para prevenir la liberación

La promovente entiende la importancia de prevenir el acceso de personal no autorizado y de implementar medidas para evitar la entrada de posibles vectores de dispersión (animales domésticos y/o silvestres) que puedan afectar la integridad de la siembra experimental. El predio está resguardado a través de una puerta de acero y el acceso de personas está restringido. Se contará con registro de entrada y salida de personal autorizado.

IV. b. 2 Medidas y Procedimientos para disminuir el acceso

Como se indicó en la sección anterior, el predio está resguardado y hay una puerta de acero con llave. Dentro del predio, solo hay acceso a personal autorizado.

IV. b. 3 Medidas para la Erradicación del OGM en Zonas Distintas a las Permitidas.

Como se indicó arriba, se realizará un monitoreo postcosecha para monitorear posibles plantas nuevas fuera de la zona de la siembra.

Monitoreo de plantas voluntarias

El monitoreo sobre el sitio experimental se realizará por seis meses, para eliminar cualquier escape. Las plantas voluntarias identificadas serán eliminadas mediante métodos mecánicos o químicos. Durante la realización de esta actividad el sitio experimental permanecerá perfectamente identificado.

IV. b. 4 Medidas para el Aislamiento de la Zona de Liberación

Acciones preventivas:

Se cuenta con acceso restringido, constituido por una reja al inicio de la carretera que lleva al predio y otra reja de acero con llave a la entrada al predio. Solo se permite la entrada a personal autorizado. Se empleará un registro de entrada del personal autorizado a trabajar en el predio.

Acciones correctivas:

A. Liberación accidental durante el transporte.

Este escenario no es posible, ya que se injertarán las plantas dentro del mismo vivero y cuando estén listas para trasplante, se desplazarán 100m al sitio de la siembra.

B. Liberación accidental durante la siembra.

Si por accidente se realiza la liberación del material experimental en un sitio no autorizado, el incidente se reportará inmediatamente a la autoridad y se procederá a implementar acciones correctivas. Una vez confirmado que la liberación se ha realizado en sitios no autorizados, se procederá a la destrucción inmediata de las plantas establecidas, mediante método mecánico o químico. Se deberá identificar claramente el área donde ocurrió la liberación accidental y realizar un programa de monitoreo posterior durante un año para proceder a la destrucción inmediata de las plantas, mediante el uso de método mecánico o químico.

Una vez que se hayan llevado a cabo las medidas correctivas mencionadas anteriormente, se realizará una revisión para identificar las causas que originaron el problema e instituir los cambios necesarios en las prácticas de manejo o entrenamiento adicional en el personal a fin de evitar que se repita la liberación accidental.

VI. Consideraciones sobre los riesgos de las alternativas tecnológicas

No existe información disponible en literatura científica ni en figuras de protección intelectual que sugieran otras alternativas eficientes en el manejo y control de la enfermedad HLB en cítricos. Se han descrito en reuniones con productores el uso alternativo de productos con poco sustento científico, como el uso de agua magnética, ozono y descargas eléctricas. Por comunicación personal con Viveristas, estas alternativas de control no han producido los resultados esperados. El manejo que se da en otros países de esta enfermedad consiste en reemplazar rápidamente a los árboles

enfermos por nuevos, pero debido a su prolongada fase juvenil, la productividad ha disminuido sustancialmente. Un método generalizado es el empleo de grandes cantidades de fertilizantes tanto sistémicos como radiculares. Esta estrategia aunque aumenta el manejo del cultivo, si permite retardar los síntomas, debido a que la absorción de fósforo es muy limitada por el sistema radicular de plantas enfermas con HLB.

VII. Número de Autorización Expedida por el Sector Salud

Se está escribiendo un Dossier para su evaluación en COFEPRIS.

VIII. La Propuesta de la Vigencia para el Permiso y los Elementos Empleados para Determinarla.

Debido a que es un cultivo perenne y que no se observan ciclos agrícolas para su cultivo, se solicitan la siembra experimental con una duración de 6 meses a partir de que se autorice la siembra.

XII. Información Adicional

En caso de que el promovente lo considere adecuado, otros estudios o consideraciones en los que se analicen tanto la contribución del OGM a la solución de problemas ambientales, sociales, productivos o de otra índole, así como las consideraciones socioeconómicas que existan respecto de la liberación de OGMs al ambiente. Estos análisis deberán estar sustentados en evidencias científicas y técnicas, en los antecedentes sobre uso, producción y consumo, y podrán ser considerados por las secretarías competentes como elementos adicionales para decidir sobre la liberación experimental al ambiente, y consecuentes liberaciones al ambiente en programa piloto y comercial, respectivamente, del OGM de que se trata,

XII.1 Información de la biología de cítricos y HLB

Producción de cítricos en México y el mundo.

En la producción nacional de limón, naranja, mandarina, toronja y lima participan 67 mil familias mexicanas, donde se generan 70 mil empleos directos y 250 mil indirectos. La citricultura es una actividad redituable en aspectos económicos para el productor, ecológicos al no utilizar demasiados agroquímicos como en otros cultivos e importante desde el punto de vista social al generar mano de obra durante todo el año (SENASICA, 2008).

Huanglongbing, la enfermedad de los cítricos.

El naranja puede ser afectado por diversas enfermedades infecciosas (bióticas) y no infecciosas (abióticas) siendo las primeras causadas por hongos, bacterias, nematodos y otros organismos; en tanto que las enfermedades abióticas son provocadas por condiciones ambientales adversas, defectos genéticos, factores nutricionales y toxicidad provocada por uso inadecuado de productos químicos que reducen tanto la producción como la calidad de la fruta.

Entre las enfermedades más devastadoras que existen actualmente en el naranja, y en general en todos los cítricos, es la denominada Huanglongbing, también conocida como citrus greening, dragón amarillo o simplemente HLB. Esta enfermedad ha cobrado una gran importancia en nuestro país y en el resto del mundo, ya que es considerada como la principal amenaza a la producción de cítricos a nivel mundial.

El HLB es causado por *Candidatus Liberibacter* spp., una bacteria gram negativa restringida al floema de las plantas de cítricos. El HLB se considera la enfermedad más destructiva para los cítricos en el mundo debido a que causa la muerte del árbol de forma inevitable, sin que exista cura alguna (Halbert y Manjunath, 2004).

La bacteria se transmite a través del psílido asiático *Diaphorina citri* y el psílido africano *Trioza erytreae*; los cuales al alimentarse de la savia de una planta infectada, pueden extraer a la bacteria y luego transmitirla a plantas sanas de cítricos. El HLB no se transmite a través de la ropa, herramientas de trabajo, viento, etc., y no afecta a las personas y animales. El HLB afecta a la familia de las Rutáceas como a la lima mexicana, naranja agria y dulce, limón y toronja.

Se han identificado tres especies causantes de HLB: la americana, la africana y la asiática. En México se ha reportado que el causante de la enfermedad es *Candidatus Liberibacter asiaticus* (SENASICA, 2013).

Reseña histórica de HLB

Se cree que los primeros reportes de la enfermedad ocurrieron en los años de 1800, en las provincias de la India y China, considerados como los lugares citrícolas más antiguos del mundo, en donde posiblemente la bacteria se encontraba en plantas rutáceas silvestres, donde la enfermedad se desarrolló conforme la expansión del comercio agrícola. Lo mismo pudo haber ocurrido para el género africano (da Graça, 2008).

Para el año 1919, Reinking describe la enfermedad por primera vez en China. Durante los primeros 50 años del siglo XX, la enfermedad era conocida con varios nombres incluyendo “greening”, y varios investigadores atribuían como causas de la enfermedad: toxicidad severa por minerales (van der Merwe y Andersen, 1937), deficiencia de zinc en los árboles (Lee, H. et al., 1921), desórdenes fisiológicos como deficiencias de agua, infestación de nematodos en el suelo e inclusive infección por el hongo *Fusarium* sp. (Lin, 1956; Bové, 2006).

Se considera que Lin, (1956), por primera vez reveló la naturaleza de la enfermedad, al demostrar que ésta podía transmitirse por inoculación con injertos positivos a la enfermedad. Adicionalmente, asumió la existencia de un vector transmisor de la enfermedad, para poder explicar la infección de aquellos árboles que no habían sido injertados. Unos años después, en Sudáfrica, los investigadores McClean y Oberholzer (1965a, 1965b), corroboraron que HLB es transmitida por inoculación con injertos y también por el vector africano *Trioza erytreae*. Para el año 1967, Martínez y Wallace, demostraron que también la enfermedad podría ser transmitida por el psílido asiáticos *Diaphorina citri* (Bové, 2006).

Para el año 1967, estaba demostrado que la enfermedad se transmitía por inoculación con injertos y también por dos vectores psílicos. Estos resultados indicaban que el patógeno causante de la enfermedad era un virus, el único agente

conocido en esa época capaz de infectar plantas y ser transmitido de estas maneras posibles. En ese mismo año, varios investigadores empezaron la búsqueda de este agente en plantas infectadas con el microscopio electrónico, encontrando evidencia del agente causal en los tubos cribosos de las plantas infectadas, haciendo pensar que se trataba de un micoplasma, un tipo especial de bacteria que carece de pared celular (Laflèche, D. y Bové, J.M., 1970a y 1970b). Sin embargo, esto fue rápidamente descartado cuando se observó que la membrana citoplasmática estaba rodeada por una capa, que después se demostró con varias técnicas de tinción, se trataba de una pared celular típica de una bacteria gran negativa, compuesta por una membrana y peptidoglicano (Garnier, M. y Bové, J.M., 1977, Garnier, M., et al., 1984a y 1984b, Bové, J.M., 2006). A la fecha esta bacteria a la que se le ha denominado *Candidatus Liberibacter* no ha podido ser cultivado en medios sintéticos, lo que ha complicado su estudio.

Para 1980, el grupo de investigación de Bové, J.M., evidenciaron indirectamente la naturaleza gram negativa de la bacteria causal del HLB, estudiando el efecto de la penicilina en árboles infectados con HLB. La penicilina inhibe los últimos pasos (transpeptidación) de la biosíntesis del peptidoglicano, componente esencial de la pared celular de las bacterias gram negativas. El resultado del estudio fue concluyente al observarse efectos benéficos en los árboles infectados, disminuyendo la gravedad de los síntomas, además de que ninguna bacteria fue encontrada en los tubos cribosos después del tratamiento con penicilina. Sin embargo, una vez que se suspendió dicho tratamiento, los síntomas reaparecieron (Bové, J.M., 2006).

En 1994, Jagoueix, S., et al., propusieron en base a la secuencia del 16S rDNA y del operon β , que la bacteria causal del HLB es miembro de la subdivisión Proteobacteriaceae.

En el 2004 se detectó la especie asiaticus en la localidad de Araracuara, Sao Paulo, Brasil (Coleta-Filho, H.D. et al., 2004). Posteriormente, se reportó una nueva especie de *Candidatus Liberibacter* en cítricos a la que se nombró *Ca. L. americanus* (Teixeira, C.D., et al., 2005). En 2005, se reportó a *Ca. L. asiaticus* en Florida, EUA. Sólo cinco años después, en el 2009 se detectó la enfermedad por primera vez en

México en la localidad de Tizimín Mérida, Yucatán. Actualmente, SENASICA reporta que el HLB está presente en 13 de los 23 estados citrícolas del país (SENASICA, 2013).

Síntomas característicos de HLB

De acuerdo a varios autores consultados, no existe un solo síntoma característico de la enfermedad sino más bien un conjunto de síntomas, que se presentan en todos los cítricos y en todas las formas de la enfermedad ya sea americana, asiática o africana, los cuales grupalmente pueden descartar otros trastornos con los que suele ser confundidos los síntomas, como es el caso de deficiencia de minerales como el zinc.

La siguiente tabla detalla los síntomas característicos de HLB en árboles citrícolas:

Síntomas característicos de HLB. Fuente: Elaboración propia con información de Bové, 2006; da Graca et al., 2004; Gottwald et al., 2007; Martinelli et al., 2012, Quinto Informe de Labores, Senasica, 2011.

HOJA	FRUTOS
Presencia de uno o más puntos amarillos (estados tempranos de la enfermedad).	Fruto pequeño, asimétrico y deforme.
Moteado difuso asimétrico hasta un amarillamiento completo de la hoja.	Hay una inversión de color en los frutos, es decir ocurre un "enverdecimiento".
Hojas delgadas y clorosis.	Al realizar un corte perpendicular al axis del fruto, se observan las semillas pequeñas, cafés y abortadas
Las venas centrales y laterales de las hojas presentan un engrosamiento y encorchamiento visible.	Al realizar un corte transversal al axis del fruto, se observa una asimetría y semillas abortadas.
Hojas con crecimiento en forma de "orejas de conejo"	Fruta con sabor amargo.
Defoliación (etapas avanzadas de la enfermedad).	
Muerte del árbol	

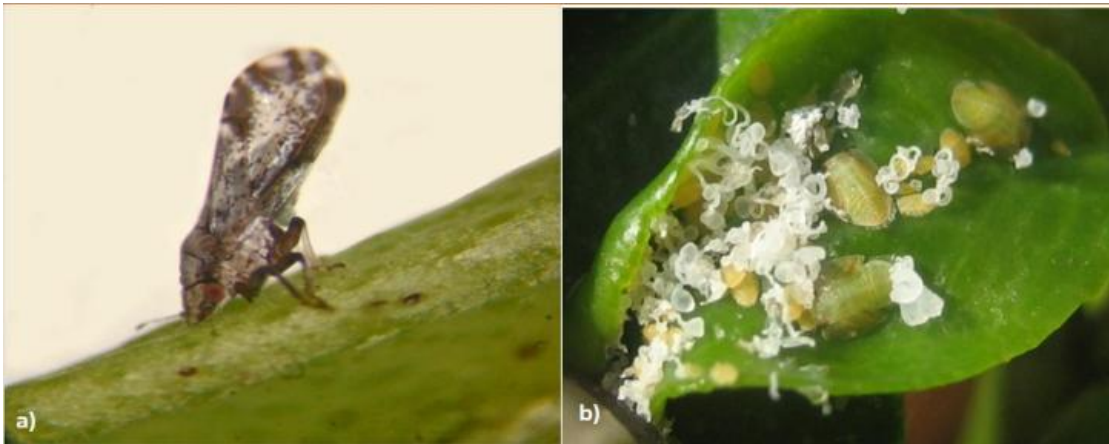
De forma muy general, cuando un árbol de cítricos presenta uno o varios puntos amarillos en sus hojas, frutos pequeños y deformes, con semillas abortadas e inversión de color, probablemente esté infectado con HLB, sin embargo la confirmación de la enfermedad debe llevarse a cabo con métodos de biología molecular.



Síntomas de HLB observados en hoja de limón persa y mexicano. Fuente: Ficha Técnica HLB, SENASICA 2011.

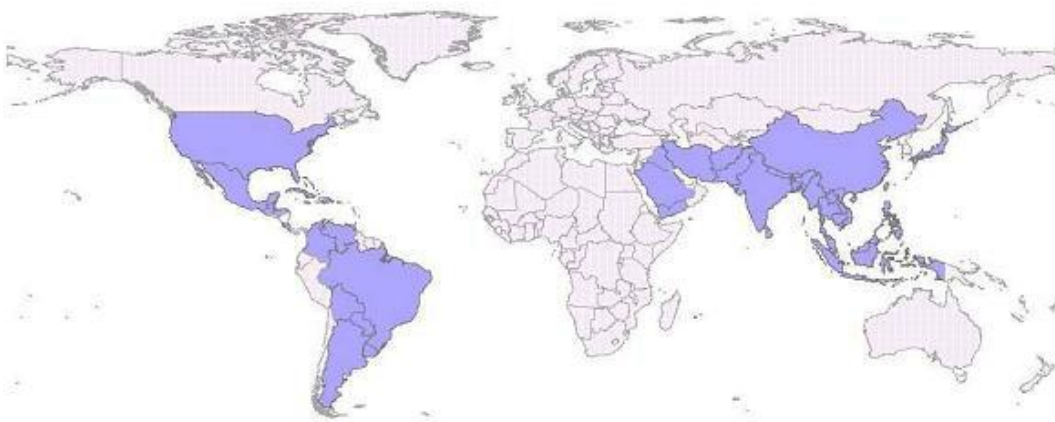
Características de *Diaphorina citri*, vector de la bacteria que causa la enfermedad de Huanglongbing

El psílido asiático, *Diaphorina citri* Kuwuyama (Hemiptera: Psyllidae), es la plaga en cítricos más problemática actualmente alrededor del mundo, debido a que éste es el vector transmisor de la bacteria *Candidatus Liberibacter* spp., agente causal del Huanglongbing, la enfermedad más devastadora de cítricos en los últimos años. *Diaphorina citri* Kuwuyama pertenece al Phylum Arthropoda, Clase Insecta, Orden Hemiptera, Familia Psyllidae; conocido comúnmente como psílido asiático de los cítricos.



Etapas de desarrollo de *Diaphorina citri*: a) adulto; b) ninfas. Fuente: Ficha Técnica HLB, SENASICA 2011.

La relación entre el agente causal del HLB y el psílido se estableció por primera vez en 1954 por Lin et al., y años más tarde por Martínez y Wallace en 1967. Se sabe que desde el siglo XX, el vector está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de Asia, sin embargo el primer reporte de la presencia del psílido en América, ocurrió hacia el año 1940 en Brasil y cincuenta años más tarde fue reportada su presencia en Florida, USA. Actualmente el psílido se encuentra diseminado en todas las plantaciones de cítricos de los Estados Unidos, México, Belice, Costa Rica, el Caribe y gran parte de Sudamérica (Grafton- Cardwell et al., 2013). El siguiente mapa esquematiza lo mencionado anteriormente.



Distribución mundial de *Diaphorina citri*, 2009. Fuente: Ministerio de la Producción. Secretaría de la Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Buenos Aires, Argentina, 2009.

Particularmente, en nuestro país, la presencia de *Diaphorina citri* fue reportada por primera vez en el año 2002 en los estados de Campeche y Quintana Roo. Desde entonces se ha distribuido ampliamente en todas las áreas citrícolas del país. En el año 2003, fue observado en los estados de Nuevo León y Tamaulipas; para el año 2004, la plaga se había extendido hasta los estado de Colima, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Yucatán (López Arroyo et al., 2005). Durante 2005 fue registrado en Sinaloa; en 2006 el insecto también fue encontrado en Sonora y Baja California sur (Martínez Carrillo, et al., 2008). En el mes de Junio de 2008, se reportó la presencia de este insecto en la zona urbana de Tijuana Baja California, (Dirección General de Sanidad Vegetal y Sistemas de Alerta Fitosanitaria de la NAPPO 2008), lo que demuestra que en tan solo seis años 2002 a 2008 el insecto se desplazó por todo el territorio nacional. Durante Julio de 2008, el insecto fue observado alimentándose en árboles dispersos y escasos en jardines del área rural del estado de Coahuila, lejos de cualquier zona citrícola (López Arroyo et al., 2008).

Los datos indican que actualmente se encuentra presente en 688 municipios del territorio nacional. En la Figura 4 se presenta la distribución de *Diaphorina citri* en México.



Distribución de *Diaphorina citri* en México, 2008. En color verde, se señalan los estados donde se ha localizado el vector. Fuente: Ficha Técnica de *Diaphorina citri* Kuwuyama, Psílido asiático de los cítricos. SAGARPA, SENASICA, SINAVEF, 2008.

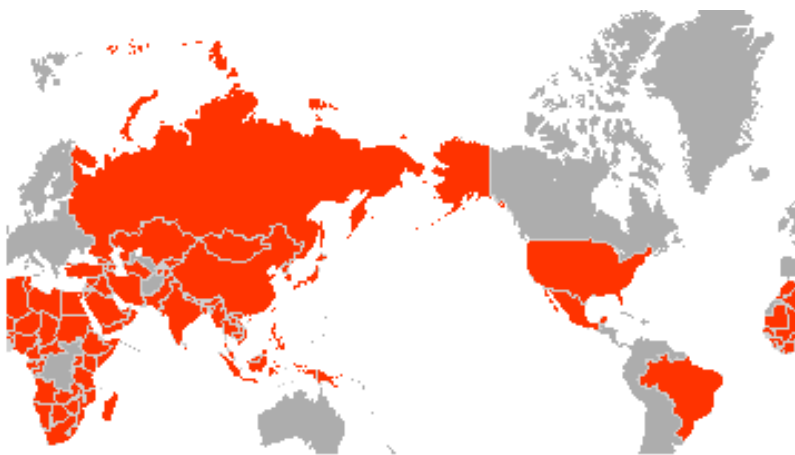
En resumen, el ciclo de vida del vector empieza con la ovoposición de alrededor de 800 huevos durante toda su vida por hembra de *D. citri* en las yemas axilares de los árboles de cítricos, los cuales eclosionan de 2-4 días. Existen cinco estadios larvales, los cuales son completados en un período de 11- 15 días, mientras que el ciclo de vida lleva a cabo de 15 a 47 días, esto dependiendo de la temperatura del medio ambiente. Hembras y machos de *D. citri*, emergen al mismo tiempo sin protandria ni protoginia. La duración del apareamiento dura alrededor de 20 a 100 minutos y ocurre exclusivamente durante la fotofase y en las yemas axilares. Para el mantenimiento de un rendimiento máximo de reproducción, las hembras necesitan aparearse varias veces, lo cual se logra con la gran cantidad de machos que puedan encontrar a su alrededor, así las hembras una vez que se han apareado, empiezan a ovoposicionar después del 1 día de ocurrido el suceso. El psílido presenta un pico poblacional al final de la primavera e inicios del verano, coincidente con el período

de brotes de los cítricos. (García-Darderes, C., 2009; Halbert, S.E. y Manjunath, K.L., 2004; Grafton- Cardwell, E., et al., 2006).

Diaphorina citri tiene preferencia por la familia de las Rutáceas. Afecta especialmente a los cítricos, entre ellos limones (*Citrus limon*), limón rugoso (*C. jambhuri*), naranja agria (*C. aurantium*), pomelo (*C. paradisi*) y limas (*C. aurantifolia*). También existen hospederos alternativos, siendo sus preferidos los del género *Murraya spp.* (*Murraya paniculata* o comúnmente llamado mirto). Estas son utilizadas como plantas ornamentales en parques, plazas y jardines, lo que facilita la propagación del vector (García-Darderes, 2009).

Características de *Candidatus Liberibacter spp.*

Por muchos años, la distribución geográfica del HLB estaba restringida a dos grandes regiones: África y Asia. Hasta el año 2007, el HLB estaba localizado en casi toda África, Asia central, Asia oriental, Asia del Este, América (Brasil, Estados Unidos y México, entre otros (Figura 5), por lo tanto es posible que actualmente la distribución de HLB sea mayor en la época actual (López- Collado, 2013). En el 2013, México reporta la presencia de la enfermedad en los siguientes estados: Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco y Yucatán (SENASICA, 2013). La Figura siguiente muestra la distribución de HLB en México.



Distribución mundial de HLB, en color naranja se muestran los países con presencia de HLB. Fuente: Huanglongbing, HLB en México. López- Collado, J. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz. Marzo, 2013.

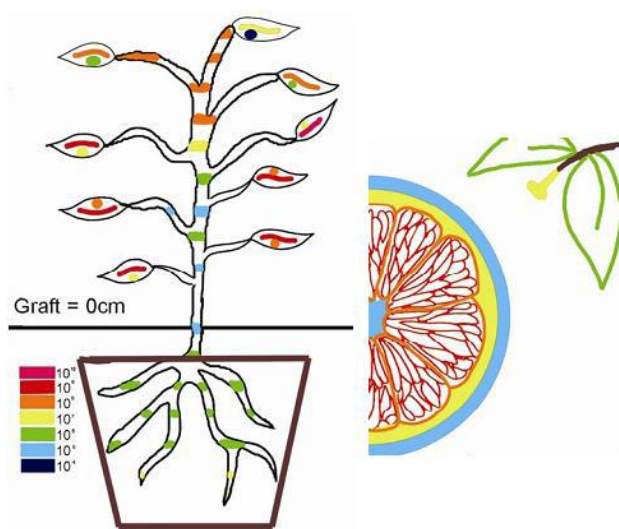
Candidatus Liberibacter spp. es parte del subgrupo α de Proteobacteria, dentro de la cual se encuentran tanto microorganismos patógenos de plantas (*Agrobacterium tumefaciens*), simbioses (*Bradyrhizobium* spp.) así como patógenos de humanos (*Rochalimea* spp., *Bartonella bacilliformis*, *Brucella abortus*, *Afipia* spp., etc). Los microorganismos de este subgrupo viven en íntima asociación con células eucariotas, y en muchos casos, han adquirido la habilidad de sobrevivir y crecer dentro de un artrópodo que usan como vector, caso muy similar a la bacteria causal de HLB (Bové, J.M., 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, existen tres especies de la bacteria causante de HLB: *americanus*, *asiaticus* y *africanus*. En México, se ha reportado la presencia únicamente de la variedad asiática desde el año 2004 (SENASICA, 2013).

A pesar de que la bacteria es no cultivable, se ha podido secuenciar su genoma por medio de herramientas como la metagenómica, lo que ha puesto al descubierto información de este microorganismo: El tamaño del genoma de *Ca. L. asiaticus* es de 1.23 Mb y tiene en promedio un 36.5% en contenido de GC. La anotación del genoma reveló un alto porcentaje de genes involucrados tanto en motilidad celular (4.5%) como en transporte activo en general (8.0%), lo que probablemente contribuya con su virulencia. En cuanto a la respiración aerobia, *Ca. L. asiaticus* parece estar limitada en este aspecto, además de ser auxotrófo, en al menos cinco aminoácidos (triptófano, tirosina, leucina, isoleucina y valina). Por otro lado, *Ca. L. asiaticus* parece carecer de sistemas de secreción del tipo III y IV, lo cual es común en microorganismo de vida libre y aquellos que colonizan plantas, sin embargo *Ca. L. asiaticus* posee el sistema de secreción tipo I, necesario para la secreción de varios fármacos y toxinas (Yongping- Duan et al., 2009). También se confirmó la cercanía de *Ca. L. asiaticus* con la familia *Rhizobiaceae* por análisis filogenéticos de multi- proteínas (Williams et al. 2007; Doddapaneni et al. 2008; Yongping- Duan et al., 2009). No existe indicio alguno que *Ca. L. asiaticus* actúe como patógeno en la

planta, ya que el análisis del genoma no reveló toxinas, enzimas o sistemas de secreción especializados. Es en cambio el estilo de vida intracelular de *Ca. L. asiaticus* el que describe mejor a éste microorganismo como parásito en lugar de patógeno, en donde las causas de los síntomas de la enfermedad surgen principalmente como resultado de los desequilibrios metabólicos, agotamiento o la interferencia de nutrientes causada por la presencia de *Candidatus* en el floema (Yongping- Duan et al., 2009).

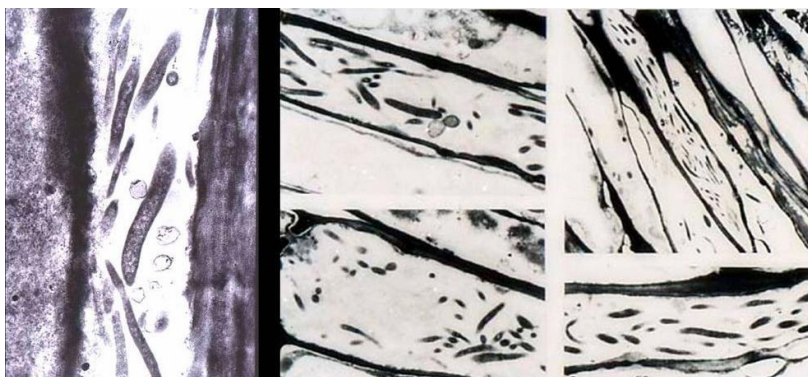
Se han hecho investigaciones para determinar la localización de *Ca. L. asiaticus* en plantas de cítricos, demostrando que la localización y cantidad de la bacteria en el mismo árbol no es uniforme (Texeira et al., 2008; Tatineni et al., 2008). Se ha podido encontrar y cuantificar *Ca. L. asiaticus* en tejido de corteza, nervadura central de la hoja, raíces y en las diferentes partes frutales y florales de los árboles de cítricos variando de 14 a 137,031 células/ μ g DNA total, mientras que en el endospermo y en el embrión no se ha encontrado la bacteria (Tatineni et al., 2008). A continuación se muestra la distribución de la bacteria en la planta de acuerdo a Li, W. et al (2008):



Distribución de la bacteria *Ca. L. asiaticus* en plantas infectadas de limón. Los colores indican la cantidad de bacteria por gramo de muestra. Fuente: Tomado de Li et al., 2008.

Laflèche, D. y Bové, J.M., (1970) con ayuda del microscopio electrónico, fueron los primeros en reportar un agente patógeno dentro del floema, específicamente en los

elementos cribosos, se trataba de *Ca. L. asiaticus*. Años más tarde, Schneider (1981) observó la acumulación masiva de almidón en hojas de cítricos infectados con HLB, explicando que se debía a la necrosis provocada en el sistema vascular de las plantas, específicamente en el floema, por la presencia de la bacteria en este tejido. Se ha observado que la acumulación de almidón en hojas de limón infectado con HLB puede ser incluso 20 veces mayor en comparación con árboles sanos (Etxeberria et al., 2009). Esta acumulación excesiva de almidón en las hojas puede provocar incluso la desintegración del sistema cloroplastos-tilacoides, causando los característicos puntos amarillos en las hojas infectadas (Etxeberria et al., 2009).



Primeras observaciones de Lafleche y Bove (1970) en microscopio electrónico de *Ca. L. spp.* dentro de los tubos cribosos de plantas infectadas con HLB. Fuente: Tomado de IVIA.

El almidón es un producto natural de polimerización de azúcares sintetizados en la fotosíntesis durante la fijación del CO₂ en tejidos verdes. El almidón se forma por enlaces de glucosa α -1,4, existiendo dos tipos, la forma soluble, que consiste en una pequeña cadena de alfa amilosa sin ramificaciones, y la forma insoluble que está ramificada y que comúnmente se conoce como amilopectina (Smith, A.M., et al., 1987; Wang, T.L., et al., 1998). En células de tejido verde, el almidón se acumula durante el período de luz mientras que se moviliza durante la oscuridad o cuando la actividad fotosintética disminuye, para mantener un flujo constante hacia tejidos heterotróficos (Etxeberria, E. et al., 2009). Sin embargo, en las hojas de los cítricos, la acumulación de almidón ocurre a muy bajos niveles, a cualquier hora del período

luz- oscuridad (Yelenosky, G. y Guy, C.L., 1977). Una vez que el almidón se acumula en las hojas de los cítricos, éste no es degradado, ni siquiera durante el período de oscuridad y éste permanece indefinidamente acumulado en las hojas (Etxeberria, E. et al., 2009).

Estudios recientes han demostrado que en plantas de cítricos infectados con HLB, la acumulación de niveles anormales de almidón no está restringida a las hojas, como previamente se había sugerido, sino que existen evidencias de que también cúmulos de almidón se localizan en todos los tejidos de las partes aéreas, incluyendo peciolo, células del parénquima y en tejido vascular incluyendo el floema. Esta nueva información, refuerza la hipótesis de que la presencia de la bacteria altera el metabolismo de los carbohidratos en los cítricos (Etxeberria, E. et al., 2009). Sin embargo, resulta interesante que los niveles de almidón en las raíces de las plantas infectadas, está prácticamente abatido, en comparación con plantas sanas donde los niveles de almidón en raíces aunque mínimos, resultan ser importantes como reservas de energía. La ausencia de reservas de almidón en raíces de plantas de cítricos infectados con HLB, parecer ser resultado de una severa disminución del transporte de fotoasimilados hacia la raíz, lo que causa una inanición en la planta, disminuyendo el tiempo de vida en las plantas infectadas (Etxeberria, E. et al., 2009). Estudios realizados sobre la acumulación de almidón en otras plantas vasculares ha sido asociado con un transporte deficiente a través de los plasmodesmos (Koh et al., 2011). Una mutante de maíz, deficiente en exportación de sacarosa (*sxd1*), exhibió una acumulación de almidón en los cloroplastos de las hojas y una inhibición en el transporte simplásmico entre células del tejido vascular y las células del parénquima en venas secundarias de las hojas (Russin, W.A., et al. 1996; Botha, C.E.J., et al. 2000). Por otro lado, la sobreexpresión de proteínas de movimiento en el virus del mosaico de tabaco (TMV), interfiere en la exportación de fotoasimilados desde las hojas de tabaco, e incrementa los niveles de carbohidratos en éstas, lo que se asocia con una oclusión de los plasmodesmos (Almon et al., 1997; Rinne et al., 2005). Recientemente, fue reportado que como consecuencia de la sobreexpresión de glicoproteínas en plasmodesmos, hay una inhibición de propagación de TMV a través de los plasmodesmos, acompañado de una acumulación de almidón y de

fotoasimilados en las hojas de tabaco, sugiriendo que el transporte simplástico es necesario para la exportación de fotoasimilados (Zavaliev et al. 2010).

Aunado a la acumulación de almidón en las hojas infectadas con HLB, recientemente se ha observado que también la callosa se acumula, interfiriendo también con el transporte a través de los plasmodesmos (Koh et al., 2011). La pared celular que rodea a los plasmodesmos es rica en callosa, sin embargo altos niveles de callosa puede inhibir el transporte través de ellos. La síntesis de callosa en los plasmodesmos es inducido por estrés tanto biótico como abiótico, infecciones virales, toxicidad por metales, plasmólisis celular y por heridas (Koh et al., 2011; Rinne y Schoot, 2003; Roberts y Oparka, 2003; Sivaguru et al. 2000; Drake et al.1978; Radford et al.1998).

Acciones de control de HLB

El HLB puede ser controlado únicamente con un programa coordinado entre los viveristas, productores y agencias del gobierno. Se tienen que producir plantas de vivero libres de la bacteria y siempre es mejor mantener las plantas madres bajo malla o en invernaderos cerrados, protegidas del vector. Una práctica importante es reducir el inóculo por eliminación de las plantas infectadas (Fundecitrus, 2008).

Debe mantenerse vigilancia mediante monitoreo de las poblaciones de los vectores y aplicar medidas de control cuando sea necesario. En árboles maduros se aplican insecticidas sistémicos; aunque el control en árboles maduros no es tan efectivo. Las aplicaciones deben hacerse de tal forma que se eviten efectos adversos sobre insectos benéficos. El control biológico del vector ha tenido éxito mediante el parasitoide *Tamarixia radiata* importado de África del Sur, pero la presencia de hiperparásitos ha limitado esa forma de control en otras zonas (Ramos-Mendez, 2008).

Sin embargo, los actuales métodos de control no eliminan a la bacteria causante de la enfermedad, ya que únicamente se centran en el control del vector y en el hospedero de la bacteria. Actualmente no existe una cura para la enfermedad de HLB, debido principalmente a que la bacteria es no cultivable y a la localización dentro del floema de la bacteria, donde el transporte es altamente selectivo y

regulado por mecanismos todavía no claramente conocidos en la entrada del plasmodismo.

Expresión de antimicrobianos en plantas

La mejora de los cultivos se ha realizado por técnicas tradicionales por cientos e incluso miles de años. Sin embargo, estos métodos tienen la desventaja de ser lentos en la maduración y crecimiento de las plantas, y los frutos suelen presentar incompatibilidad postcigótica, partenocarpia y poliembriones. Además, debido a su biología, la planta no puede incorporar características deseadas de manera rápida utilizando los métodos tradicionales, esto ha sido una clara desventaja en cuanto a obtener plantas resistentes a enfermedades (Febres, V. 2011). Es por ello, que la ingeniería genética ofrece una alternativa viable, usando métodos de transformación que permita obtener en un período relativamente corto plantas genéticamente modificadas, que expresen proteínas o péptidos foráneos e introducir en las plantas característica genotípicas, como resistencia a enfermedades, resistencia a herbicidas, resistencia a sequía, etc. (During, 1996; Gurr et al., 2005; van der Vriesen, 2001; Montesinos, 2007). La estrategia que se ha propuesto en el presente trabajo para el control de HLB, es la expresión de defensina humana en las plantas de naranja, para proporcionarles resistencia a la enfermedad. Dicha defensina está dirigida a moverse a tejido vascular, con el objeto de transferirla al lugar de multiplicación de la bacteria.