

## ***Xylella fastidiosa* NO ES CAUSANTE DEL MOTEADO CLORÓTICO DE LA HOJA EN AGUACATE**

Zapata-Montes, Nery J.; Campos-Rojas, Eduardo; Ayala-Arreola, Juan; Acuayte-Valdés, Erik; **Barrientos-Priego, Alejandro F.**

Posgrado en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México–Texcoco. Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. MÉXICO. Correo-e: abarrien@correo.chapingo.mx

### **Resumen**

Desde los 90s se ha observado moteado clorótico de hoja en plantaciones de aguacate y por varios años se consideró como una deficiencia nutrimental. En 2008 en Costa Rica, se identificó a *Xylella fastidiosa* como el causante de síntomas similares a los observados en México. Dada su importancia económica, se planteó la determinar mediante técnicas moleculares, la presencia de *X. fastidiosa* en plantas de aguacate con síntomas de moteado de hoja y determinar si el síntoma transmite por injerto. Al injertar vareta sana en planta enferma, la variedad Hass presentó 90 % de hojas enfermas con alta severidad (80 a 90 %) y con síntomas similares observados en campo, concluyendo que el factor causal es transmitido por medio de injerto. Para la detección de la bacteria se utilizaron los iniciadores RST31, RST33, XF1-F, XF6-R, 272-1-int, 272-2-int y HL5, HL6. Todas las reacciones arrojaron resultados negativos en la detección de *X. fastidiosa*, concluyendo que los síntomas de moteado en hojas de aguacate probablemente no son causados por *X. fastidiosa*, descartando su presencia. Es necesario continuar con el estudio de esta enfermedad para determinar el agente causal y mantener vigilancia para determinar su avance y su impacto económico.

**Palabras clave:** *Persea americana* Mill., PCR, Transmisión por injerto, Enfermedad

### ***Xylella fastidiosa* DOES NOT CAUSE CHLOROTIC LEAF MOTTLE IN AVOCADO**

#### **Abstract**

Since the 90s leaf chlorotic mottle has been observed in avocado plantations and for several years it was considered as a nutritional deficiency. In 2008 in Costa Rica, *Xylella fastidiosa* was identified as the cause of symptoms similar to those observed in Mexico. Given its economic importance, it was proposed to determine by molecular techniques, the presence of *X. fastidiosa* in avocado plants with symptoms of leaf mottle and to determine if the symptom is transmitted by grafting. When grafting healthy budwood in diseased plant, the variety Hass showed 90 % of diseased leaves with high severity (80 to 90 %) and with similar symptoms observed in the field, concluding that the causal factor is transmitted by means of grafting. For the detection of the bacterium the primers RST31, RST33, XF1-F, XF6-R, 272-1-int, 272-2-int and HL5, HL6 were used. All reactions yielded negative results in the detection of *X. fastidiosa*, concluding that the symptoms of mottling of leaves on avocado probably are not caused by *X. fastidiosa*, discarding its presence. It is necessary to continue with the study of this disease to determine the causal agent and to maintain vigilance to determine its progress and its economic impact.

**Key words:** *Persea americana* Mill.; PCR; Transmission by graft; Disease

#### **Introducción**

México es el primer productor y exportador de aguacate del mundo; en el año 2019 se cosechó 2'307,971 toneladas de fruto, más del 50 % de la fruta consumida a nivel mundial, en forma permanente aporta más de 400 mil empleos, y en las empacadoras el 95 % de los trabajadores

son mujeres (SIAP, 2020a). De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SIAP, 2020b), la venta de aguacate mexicano al mundo de 2019 superó los 3193 millones de dólares.

Dada su gran importancia económica para el país se han estudiado las enfermedades principales que afectan las plantaciones de aguacate como la tristeza del aguacatero, viroide del “sunblotch”, antracnosis, entre otras, a las cuales se conoce su forma de desarrollo y manejo. Desde hace décadas se ha presentado en plantaciones de varios estados, un moteado clorótico en las hojas, el cual era relacionado comúnmente con deficiencias nutrimentales (Hernández-Váldés et al., 2012), sin embargo, en los años 90s el Dr. Michal W. Borys y Alejandro. F. Barrientos-Priego (Universidad Autónoma Chapingo, comunicación personal) en un vivero en Chiapas observaron que el moteado de hoja se transmitió a plantas sanas por medio de la injertación, por lo que se sospechó de un patógeno causante de dicha enfermedad. Síntomas similares fueron observados por Montero-Astúa et al. (2008) en plantaciones de aguacate asociadas con café y cítricos en Costa Rica, al estudiarlos encontraron a *Xylella fastidiosa*, por lo que presentó el primer reporte de esta bacteria en árboles de aguacate.

Esta bacteria es una de las más estudiadas, presenta una amplitud de hospedantes (EPPO, 2004) y actualmente provoca grandes pérdidas en el cultivo de olivo en Europa (Loconsole et al., 2014), y es una probable amenaza para cultivos de gran importancia económica como el aguacate en México, es por tal razón que se planteó el presente estudio de investigación con los siguientes objetivos: Determinar mediante técnicas moleculares (PCR) la presencia o no de la bacteria *Xylella fastidiosa* en plantas de aguacate afectadas con el moteado de la hoja y estudiar si es transmisible el moteado de hoja mediante técnicas de injertación.

## **Materiales y Métodos**

El presente estudio de investigación se llevó a cabo en los invernaderos ubicados en el campo experimental Xaltepa del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.

### **Transmisión de la enfermedad a plantas sanas mediante injerto de varetas provenientes de plantas enfermas**

Se colectó en agosto de 2015 y marzo 2016, vareta de ‘Hass’ con síntomas de moteado clorótico en hoja de la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C., Coatepec Harinas, Estado

de México. Se injertaron en 200 portainjertos de cuatro meses de emergidos y completamente sanos derivados de semilla de 'Don Cris', para determinar la transmisión de la enfermedad por medio del injerto; se utilizaron tijeras de podar y navajas desinfectando con cloro al 8 % al realizar cada corte, el riego se realizó según necesidad de la planta utilizando riego por aspersión automatizado.

### **Transmisión de la enfermedad de plantas enfermas a varetas provenientes de plantas sanas**

Se injertaron varetas provenientes de plantas sanas de las variedades Hass, Colín V-33 y Encinos en plantas con síntomas de moteado clorótico de hoja, tres injertos de enchapado lateral, en cada planta tomando éstos como los tratamientos, con 16 repeticiones considerando al patrón injertado como la unidad experimental, se utilizó un diseño completamente al azar. Se aplicaron medidas de desinfección de herramientas con cloro al 5 %.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

#### **Extracción de ácidos nucleicos**

Se utilizó el método de extracción Dellaporta et al. (1983) y CTAB (Doyle y Doyle, 1990), con algunas modificaciones. Se eligieron plantas de 'Hass', 'Duke 7' y 'Filtro 8' por presentar síntomas más fuertes, de ellos se tomó muestras de la vena central de las hojas afectadas por el moteado y peciolo, así como ramas de plantas pequeñas de cuatro meses de edad, se lavó con alcohol al 70 % y se escurrió en papel secante, se pesó en balanza analítica de 0.3 g y se colocó el tejido en un mortero estéril y congelado a ultra baja temperatura. Se adicionó nitrógeno líquido y se trituró la muestra hasta obtener una consistencia de polvo, este se depositó en un tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 mL, en el cual, previamente se había colocado 600 µl, del amortiguador de extracción (polivinilpirrolidona al 2.5 %, 20 µl de 2-mercaptoenanol en 10 µl de amortiguador), precalentado a 65 °C. Se colocó nuevamente a 65 °C y se dejó 20 minutos, se retiró del "termoblock" y se dejó enfriar, para luego centrifugarse a 21,000 xg, durante 10 minutos.

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo estéril de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), 600 µl y se agitó por 2 minutos. Se centrifugó a 12,000 xg durante 5 minutos, se separó la fase acuosa (superior) y se colocó en otro microtubo y se agregó 500 µl de isopropanol frío y se agitó por inversión suave hasta obtener el precipitado que corresponde a los ácidos nucleicos. Se colocó a -20 °C durante 30-60 minutos, se centrifugó a 12,000 xg por 5 minutos y se decantó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el

precipitado y se dejó escurrir sobre una toalla sanitaria, luego se agregó 700 µl de amortiguador cloruro de sodio-tris (hidroximetil) aminometano- ácido etilendiamino tetraacético (STE), se dejó toda la noche a 4 °C para que se disolvieran los ácidos nucleicos. El proceso continuó agregando 4 µl de RNasa, para eliminar ARN y se mezcló suavemente colocándose a 37 °C por 30 minutos, al cumplirse el tiempo se agregó 70 µl de acetato de sodio 3 M y 700 µl de isopropanol frío, se agitó por inversión hasta obtener el precipitado de ADN, este se colocó a -20 °C durante 30 minutos, se continuó centrifugando a 8,000 xg durante 10 minutos, se decantó cuidando de no perder el ADN, se agregó 500 µl de etanol al 70 % (grado reactivo), se agitó para disolver sales, se centrifugó nuevamente a 8,000 xg durante 10 minutos, se decantó y escurrió sobre una toalla sanitaria, se dejó secar el microtubo en “termoblock” a 40 °C por 10 minutos. La pastilla seca se disolvió en 50-100 µl de amortiguador Tris (hidroximetil) aminometano-ácido etilendiamino tetraacético (TE) y se guardó a 4 °C.

#### **Verificación de la integridad de los ácidos nucleicos extraídos**

Se preparó un gel de agarosa al 2 % en amortiguador tris (hidroximetil) aminometano-acetato-ácido etilendiamino tetraacético 1X y se dejó solidificar 20 minutos. Al lograr la consistencia deseada se procedió a cargar el ADN, se mezcló 4 µl de amortiguador de carga (“loading buffer” 1X) con 10 µl de las extracciones obtenidas y se colocó en el gel sumergido en amortiguador tris (hidroximetil) aminometano-acetato-ácido etilendiamino tetraacético 0.25X. Se corrió la electroforesis a 100 voltios por 40 minutos.

Transcurrido el tiempo se retiró de la cámara de electroforesis el gel y se procedió a teñir en bromuro de etidio por 15 minutos. El paso final fue observar la integridad en transluminador de luz ultravioleta.

#### **Cuantificación de ADN utilizando espectrofotometría**

Se utilizó un Nanodrop (Thermo Scientific), se colocó 3 µl de ADN y se procedió a determinar la calidad y cantidad de ADN en el espectrofotómetro, para verificar que la calidad de la muestra se encontrara entre 1.8 y 2.0 Nm.

#### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen endógeno 16S**

Se realizó con la finalidad de verificar que el ADN esté libre de inhibidores y así tener un resultado más fiable al realizar la detección de *Xylella fastidiosa* por medio de PCR, para lo cual se calcularon las respectivas concentraciones conforme al procedimiento indicado por Trejo-

Saavedra et al. (2015), así como los iniciadores específicos para cloroplasto (gen endógeno) los cuales amplifican una región del gen ribosomal 16S generando un producto de 315 pares de bases (Cuadro 1).

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores para la amplificación del gen endógeno 16S (Trejo-Saavedra et al., 2015).

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Fragmento pares de bases (pb)
16s1	TGAGAATGGATAAGAGGCTC	315
16s2	TGTTGTTCCCCTCCCAAGGG	

### Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Xylella fastidiosa*

Para realizar detección de *X. fastidiosa*, se utilizaron los iniciadores RST útiles para detectar la enfermedad de Pierce en vid (Minsavage et al., 1994), iniciadores XF para especies no relacionadas con el cultivo de vid (Firrao y Bazzi, 1994), y los iniciadores HL diseñados por Francis et al. (2006), para una mayor sensibilidad en la detección de enfermedades Pierce's Disease (vid), Clorosis Variegada de los Cítricos (CVC), Quemado de hojas en almendro (*Prunus amygdalus*) y adelfa (*Nerium oleander*) (Cuadro 2)

Cuadro 2. Secuencia de iniciadores para la detección de la bacteria *Xylella fastidiosa*.

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Fragmento (pb)
RST31	GCGTTAATTTTCGAAGTGATTCGA	733
RST33	CACCATTCGTATCCCGGTC	
XF1-F	CAGCACATTCGTAGTAATAC	404
XF6-R	ACTAGGTATTAACCAATTGC	
272-1-int	CTGCACTTACCCAATGCATCG	500
272-2-int	GCCGCTTCGGAGAGCATTCT3	
HL5	AAGGCAATAAACGCGCACTA	221
HL6	GGTTTTGCTGACTGGCAACA	

Después de calcular las concentraciones de los reactivos para la PCR se preparó la mezcla maestra, sobre hielo y en la campana de flujo laminar. Se tomó alícuota de 23 µL de la mezcla de reactivos en tubos de PCR estériles, previamente etiquetados, se colocó 2 µL del ADN de la

muestra y los controles de la reacción de PCR (control positivo y negativo), se introdujo la muestra en un termociclador automático (Eppendorf Mastercycler Mod. 5331) y se programó con las temperaturas indicadas por Loconsole et al. (2014).

Se realizó PCR utilizando los programas para el termociclador indicados por Firrao y Bazzi (1994) para los iniciadores XF1-F, XF6-R y 272-1-int y 272-2-int, recomendado por Pooler et al. (1997). Luego de sacar los tubos del termociclador (reacción de PCR), se tomaron 7  $\mu$ L del producto de PCR y se mezclaron con 3  $\mu$ L de amortiguador de carga sobre parafilm, estos se depositaron en los pozos del gel de agarosa al 2 % en amortiguador Tris (hidroximetil) aminometano-acetato-ácido etilendiamino tetraacético 1X. Se corrió la electroforesis por 40 minutos a 100 volts y se procedió a observar sobre un transluminador de luz UV.

Se usó un control positivo de *Xylella fastidiosa* proveniente de cultivo de vid, con el que se realizó PCR con los iniciadores utilizados en esta investigación.

## Resultados

### **Transmisión de síntomas de moteado clorótico a plantas sanas mediante injerto**

Tres meses después de realizar el injerto de las varetas provenientes de árboles con síntomas de moteado clorótico de hoja sobre plantas sanas se observó el 100 % de mortalidad de las varetas y la afectación del portainjerto con una muerte descendente afectando al 100 % de estos (Figura 1). La afectación de los patrones no es algo común al realizar injertos en plantas de aguacate por lo que se considera que el o los posibles patógenos presentes en las varetas se transmitieron hacia el portainjerto joven ocasionando su pérdida total.

### **Transmisión de moteado clorótico del portainjerto a varetas sanas de aguacate**

Se presentó un 13 % de supervivencia de los injertos, de estos el 67 % fueron de la variedad Colín V-33, de la variedad Hass un 33 %, la variedad Encinos no supervivió.

En la Figura 2a se puede apreciar que la variedad Colín V-33 muestra un 5 a 10 % de hojas con síntomas de moteado en un nivel muy bajo (1 a 2 %) en comparación con los síntomas de la variedad Hass (Figura 2b).

La variedad Hass presentó 90 % de hojas con síntomas de moteado, a un nivel muy alto, 80 a 90 %, similares a los presentes en campo y de donde se han colectado varetas con síntomas para

otras evaluaciones, probando de esta manera que el posible patógeno que causa el moteado de la hoja es transmitido a las varetas sanas y de esta forma se presenta el síntoma en los nuevos brotes de la vareta injertada.



Figura 1. Muerte de vareta 'Hass' proveniente de árboles con síntomas de moteado de hoja y muerte descendente del portainjerto de aguacate 'Don Cris' de cuatro meses de edad.

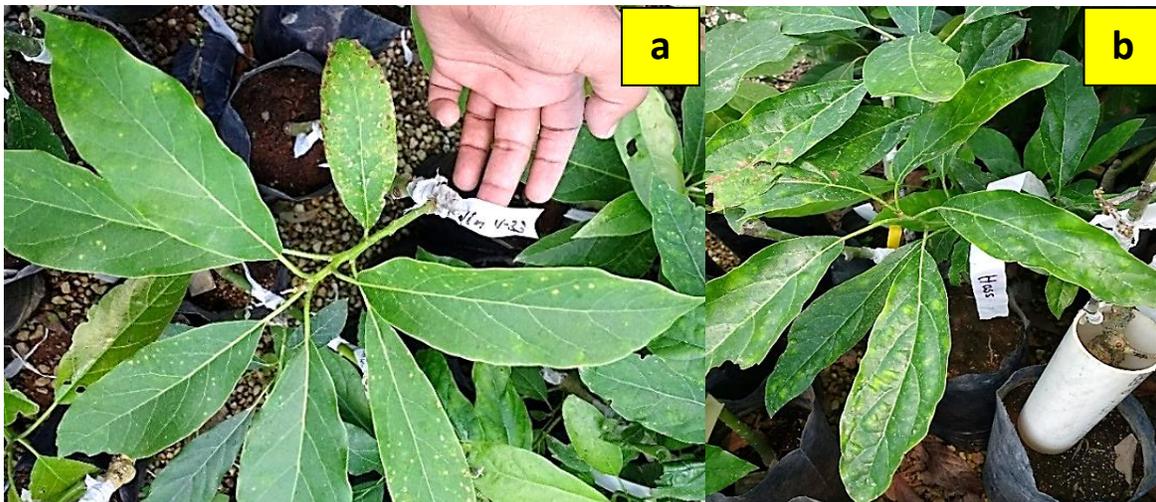


Figura 2. Injertos de 'Colín V-33' (a) con síntomas más leves y 'Hass' (b) con síntomas más severos del moteado de la hoja transmitido por una planta con síntomas.

### Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación del gen endógeno 16S con 315 pares de bases (Trejo-Saavedra et al., 2015), demostró que no existen inhibidores en el ADN obtenido de plantas de aguacate con síntomas

de moteado en las hojas ni contaminantes en la reacción (Figura 3) y por lo tanto se puede realizar PCR para detectar el posible patógeno causante de la enfermedad.

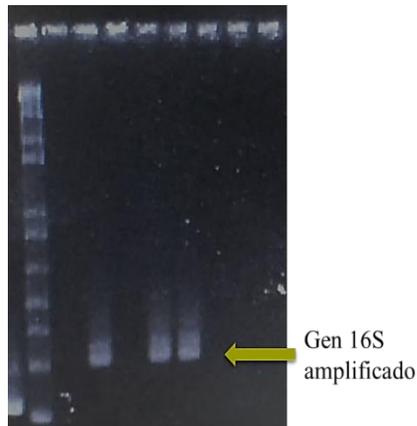


Figura 3. Amplificación de gen 16S en aguacate con síntomas de moteado clorótico de la hoja.

#### Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Xylella fastidiosa*

Todas las reacciones PCR dieron resultados negativos (Figura 4 y Cuadro 3) en la detección de *Xylella fastidiosa* en las plantas de aguacate analizadas con síntomas de moteado clorótico en las hojas.

El control positivo de *Xylella fastidiosa* que se usó es una clona que solamente amplificó con los iniciadores HL5 y HL6 (Figura 4), y se encontró en la banda de 221 pares de bases, las demás muestras no reaccionaron con los iniciadores ni mostraron bandas definidas, como en el testigo positivo. Esto indicó que los protocolos y procedimientos realizados en las PCR's fueron bien aplicados, dando pauta para confirmar que probablemente no es *Xylella fastidiosa* la que causa el moteado clorótico en las hojas de las plantas de aguacate de este estudio.

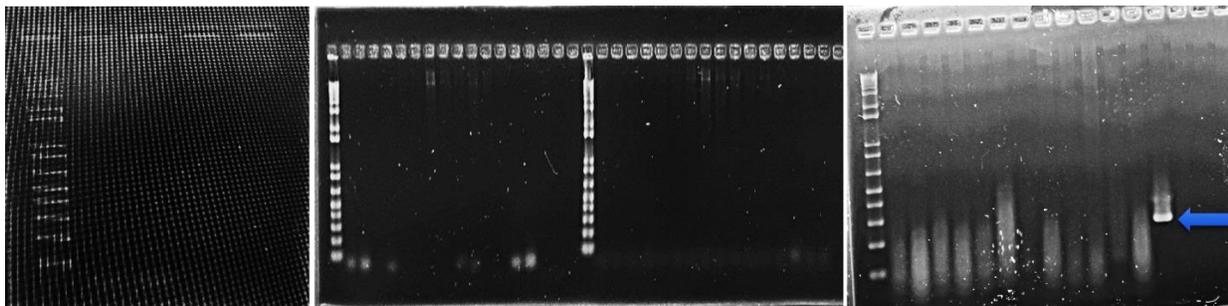


Figura 4. PCR con iniciadores XF1-F, XF6-R (izquierda), RST31, RST33, 272-1 int, 272-2 int (centro), HL5 y HL6 (derecha) para la detección de *Xillela fastidiosa* en muestras de aguacate con síntomas de moteado de hoja y control positivo de vid (flecha azul).

Cuadro 3. Resultados obtenidos de la PCR con diferentes iniciadores que detectan la bacteria *Xylella fastidiosa*.

Iniciadores	Identificación	Enfermedades	Referencias
XF1-F XF6-R	Negativa	No relacionadas con Pierce's Disease	Firrao y Bazzi (1994)
RST31 RST33	Negativa	Pierce's Disease	Minsavage et al. (1994)
272-1-int 272-2-int	Negativa	Todas las especies de <i>X. fastidiosa</i>	Pooler et al. (1997)
HL5 HL6	Negativa	Pierce's Disease, Clorosis Variegada de los Cítricos, Quemado de hojas en almendro y adelfa	Francis et al. (2006).

### Discusión

Conforme a los resultados obtenidos mediante la técnica de injertación se pudo comprobar que el patógeno que causa el moteado clorótico de la hoja de aguacate se transmite por esta vía, tal como ha sido indicado en otros cultivos como en cítricos para el caso de CVC causado por *Xylella fastidiosa* (He et al., 2005) y que para el caso de injertación de vareta infectada con el patógeno sobre portainjertos muy jóvenes (4 meses de emergidos) resultó incluso con la muerte de estos, de acuerdo con Sanderlin (2005) las plantas de semilla son más susceptibles (88 %) al ser inoculadas con *Xylella fastidiosa* que las variedades (44 %).

De las pruebas de transmisión a injerto sano de planta con síntomas, se pretendía ver la posible susceptibilidad de tres variedades con contraste en dimensiones de elementos de vaso con la idea de que al tener elementos de vaso más estrechos como es el caso de 'Colín V-33' (Reyes-Santamaría et al., 2002), podríamos pensar en que la posible bacteria no podría moverse libremente. 'Colín V-33' resultó menos afectado con el moteado clorótico de aguacate conforme a lo obtenido, mientras que 'Hass' fue muy afectado, esto tal vez sea explicado por el hecho de que tenga los elementos de vaso muy anchos comparado con otros genotipos (Reyes-Santamaría et al., 2002).

Los autores Firrao y Bazzi (1994), Minsavage et al. (1994), Pooler et al. (1997), Hopkins & Purcell (2002), Francis et al. (2006), Janse y Obradovic (2010), entre otros, han basado sus estudios en el desarrollo de protocolos y métodos moleculares para la detección de la bacteria *Xylella fastidiosa* en diferentes cultivos (vid, cítricos, almendro, adelfo, etc.), mismos que han sido

aplicados a cultivos como el olivo en Europa (Loconsole et al., 2014), cultivo de papa con síntomas de punta morada en México (Gutiérrez-Ibañez et al., 2009), existiendo asociación de *Xylella fastidiosa* con esta enfermedad y en todos estos estudios han obtenido resultados positivos en la detección de esta bacteria, dichos protocolos se aplicaron en la presente investigación, donde los resultados obtenidos son fiables y permiten descartar la presencia de *Xylella fastidiosa* en las muestras con síntomas de moteado clorótico de hoja del aguacate. Por lo tanto, queda pendiente aislar el posible patógeno que causa el moteado de hoja del aguacate y verificar mediante infección artificial si se replican los síntomas.

### Conclusiones

La enfermedad del moteado clorótico de la hoja de aguacate es transmisible por medio de injertos, donde la variedad Hass es fuertemente afectada.

La bacteria *Xylella fastidiosa* no está presente en las muestras de plantas de aguacate con síntomas de moteado clorótico de aguacate al resultar negativas en las pruebas moleculares, por lo que se concluye que no es causante de dicho síntoma.

Es necesario continuar con el estudio de esta enfermedad para determinar el agente causal y mantener vigilancia para determinar su avance y su impacto económico.

### Literatura Citada

- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- EPPO. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. *Xylella fastidiosa*. *EPPO Bull.* 34:187-192.
- EPPO. 2014. PQR-EPPO data base on quarantine pests. Recuperado de: <http://www.eppo.int>. Fecha de consulta: octubre de 2018.
- Firrao, G., and C. Bazzi. 1994. Specific identification of *Xylella fastidiosa* using the polymerase chain reaction. *Phytopathol. Mediterr.* 33:90-92.
- Francis, M., H. Lin, J. Cabrera-La Rosa, H. Doddapaneni, and E. L. Civerolo. 2006. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *Eur. J. Plant Pathol.* 115:203-213.
- Gutiérrez-Ibañez, A. T., A. Laguna-Cerda, R. I. Rojas-Martínez, R. González-Garza, M. L. Salgado-Siclán, C. Aguilar-Ortigoza, and C. González-Esquivel. 2009. Asociación molecular de *Xylella fastidiosa* en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con síntomas de punta morada, en México. *Rev. Chapingo Ser. Hort.* 15(3):275-279.

- He, C. X., W. B. Li, A. J. Ayres, J. S. Hartung, V. S. Miranda, and D. C. Teixeira. 2000. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstocks and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural root grafts. *Plant Dis.* 84(6):622-626.
- Hernández-Valdés. E. F., S. Aguilar-Campoverde, V. Aguilar-Taylor, and R. E. Pérez-Sánchez. 2012. Concentración nutrimental en hojas de aguacate 'Hass' con síntoma de moteado. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3(3):621-627.
- Hopkins, D. L., and A. H. Purcell. 2002. *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Dis.* 86:1056-1066.
- Janse, J. D., and A. Obradovic. 2010. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *J. Plant Pathol.* 92:35-48.
- Loconsole, G., O. Potere, D. Boscia, G. Altamura, K. Djelouah, T. Elbeaino, D. Frasheri, D. Lorusso, F. Palmisano, P. Pollastro, M. R. Silletti, N. Trisciuzzi, F. Valentini, V. Sabino, and M. Saponari. 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *J. Plant Pathol.* 96(1):7-14.
- Minsavage, G. V., C. M. Thompson, D. L. Hopkins, R. M. V. B. C. Leite, and R. E. Stall. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathol.* 84:446-461.
- Montero-Astúa, M., R. G. Saborio, C. Chacon-Diaz, L. Garita, W. Villalobos, L. Moreira, J. S. Hartung, and C. Rivera. 2008. First report of *Xylella fastidiosa* in avocado in Costa Rica. *Plant Dis.* 92:175.
- Pooler, M.R., I. S. Myung, J. Bentz, J. Sherald, and J. S. Hartung. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vectors by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 25:123-126.
- Reyes-Santamaría, I., T. Terrazas, A. F. Barrientos-Priego, and C. Trejo. 2002. Xylem conductivity and vulnerability in cultivars and races of avocado. *Sci. Hortic.*, 92(2): 97-105.
- Sanderlin, R. S. 2005. Cultivar and seedling susceptibility to pecan bacterial leaf scorch caused by *Xylella fastidiosa* and graft transmission of the pathogen. *Plant Dis.* 89(5):446-449.
- SIAP. 2020a. Anuarios Estadísticos de la Producción Agrícola en México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado en <http://www.siap.gob.mx>.
- SIAP. 2020b. Panorama Agroalimentario 2020. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México, México. 196 p.
- Trejo-Saavedra, D. L., E. A. Rodríguez-Negrete, and R. F. Rivera-Bustamante. 2015. Detección de transgenes en organismos genéticamente modificados (OGM) y sus subproductos. *Acta Univ.* 25(NE-3):24-39.