

# Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México

## Yield loss caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Persian lime, in Yucatan Mexico

**Jorge Luis Flores-Sánchez, Gustavo Mora-Aguilera.** Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Texcoco, Edo. de México, C.P. 56230, México; **Emiliano Loeza-Kuk.** Centro de Investigación Regional Sureste, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Mocochoá, Yucatán. C.P. 97454, México; **J. Isabel López-Arroyo.** Campo Experimental General Terán, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Nuevo León. C.P. 67413; **Santiago Domínguez-Monge, Gerardo Acevedo-Sánchez.** Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Texcoco, Edo. de México. C.P. 56230, México; **Pedro Robles-García.** SENASICA-DGSV. Coyoacán, D.F. CP 04100. Correspondencia: morag@colpos.mx.

Recibido: Junio 22, 2015.

Aceptado: Junio 29, 2015.

Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Domínguez-Monge S, Acevedo-Sánchez G y Robles-García P. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33: 195-210.

**Resumen.** El objetivo de este estudio fue estimar pérdidas productivas inducidas por el agente asociado al Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) en limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en México, mediante la evaluación de variables morfológicas y organolépticas en frutos. En el estado de Yucatán, México, se seleccionó una huerta de limón persa de cuatro años, con árboles bajo un mismo manejo e infección, esta característica se verificó por PCR cuantitativo. El estudio se condujo bajo cuatro niveles de severidad (0=sano, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100, porcentaje de síntomas de HLB en dosel). Se evaluaron ocho variables morfológicas y organolépticas en un diseño de bloques con tratamientos apareados. Los valores de peso,

**Abstract.** The aim of this study was to estimate yield losses induced by the agent associated with Huanglongbing, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) in Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) in Mexico, by evaluating morphological and organoleptic fruit variables. A four-year old Persian lime orchard in the state of Yucatán, Mexico, was selected; the trees were under same disease management and infection; this feature was verified by qPCR. The study was conducted under four severity levels (0=healthy, 1=25, 2=50, 3=75, 4=100, percentage of canopy with HLB symptoms). Eight morphological and organoleptic variables were evaluated in a restricted random block design with healthy and CLAs infected trees. The values of weight, size, skin thickness, juice volume (JV) and pH were statistically higher in fruits from healthy trees as well as in asymptomatic branches of positive trees, in comparison with symptomatic branches (Tukey,  $P=0.05$ ). CLAs induced reduction on weight (17.3 %) and JV (18.6 %), with more damage in trees showing 100 % of canopy with HLB symptoms; the regression models were:  $Y_{weight} = 217.2 - 4.2x + 0.03x^2$ ,  $R^2 = 0.86$ ;  $Y_{volume} = 645.4 - 11.7x + 0.09x^2$ ,  $R^2 = 0.82$ .

tamaño, grosor de cáscara, volumen de jugo (VJ) y pH fueron estadísticamente mayores en frutos de árboles sanos y en ramas asintomáticas de árboles positivos, en comparación con los frutos de ramas sintomáticas (Tukey,  $P=0.05$ ). CLas indujo reducción en peso (17.3 %) y VJ (18.6%), con mayor daño en árboles con 100 % de síntomas de HLB en dosel; los modelos de regresión fueron:  $Y_{\text{peso}} = 217.2 - 4.2x + 0.03x^2$ ,  $R^2=0.86$ ;  $Y_{\text{VJ}} = 645.4 - 11.7x + 0.09x^2$ ,  $R^2=0.82$ . La reducción en peso implicó una pérdida en producción de 2.4 toneladas/ha. El efecto perjudicial se asoció al nivel de severidad y concentración de CLas, ya que se detectó que la intensidad de los síntomas de HLB están en función de la concentración bacteriana mediante el modelo  $Y_{\text{bacteria}} = 1.17 + 0.77x - 0.0067x^2$ ,  $R^2=0.91$ . El presente documento constituye el primer estudio cuantitativo del efecto de CLas en la producción del limón persa.

**Palabras clave:** Severidad, Huanglongbing, concentración bacteriana, cítricos agrios.

En México, el Huanglongbing (HLB) de los cítricos se asocia a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas); la primera detección en el país de esta enfermedad devastadora de la citricultura a nivel mundial, se realizó en julio de 2009, en Tizimín, Yucatán (Trujillo, 2010). Este patógeno se transmite y dispersa por *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Halbert y Manjunath, 2004; Hall *et al.*, 2013). En febrero 2015, 23 de los 25 estados que integran la citricultura nacional confirmaron la presencia de CLas en árboles y principalmente en vectores, con lo cual se definen dos escenarios epidémicos: 1) área de mayor intensidad y prevalencia en huertos comerciales: Región del Pacífico y 2) área de menor intensidad y prevalencia en traspatio: Península de Yucatán y Golfo de México (Mora-Aguilera *et al.*, 2013).

The weight reduction implicate a 2.4 tons/ha yield loss. The detrimental effect was associated with severity level and CLas concentration, we found that the intensity of the symptoms of HLB is a function of the bacterial concentration in the model  $Y_{\text{bacteria}} = 1.174 + 0.8x - 0.0067x^2$ ,  $R^2 = 0.91$ . This is the first quantitative study of CLas effects on production of Persian lime.

**Key words:** Severity, Huanglongbing, bacterial concentration, sour citrus.

In México, Huanglongbing (HLB) has been associated with *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas); the first report in the country of this devastating disease to citrus industries worldwide was made during July 2009, in Tizimin, Yucatan (Trujillo, 2010). This pathogen is transmitted and spreads by *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) (Halbert and Manjunath, 2004; Hall *et al.*, 2013). For February 2015, 23 of 25 citrus-producing states of the Mexican citriculture confirmed the presence of CLas in trees and mainly in vectors, defining two epidemic scenarios: 1) area of greatest intensity and prevalence in commercial orchards: Region of the Pacific, and 2) area of less intensity and prevalence in backyard: Yucatan Peninsula and Gulf of Mexico (Mora-Aguilera *et al.*, 2013).

Unlike the effects of HLB in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) in Brazil, and Florida, U.S.A. (Bassanezi *et al.*, 2011; Gottwald *et al.*, 2007; Bové, 2006), in the country the highest severity of physiological and histological symptoms caused by HLB has been found in the Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle Christm.) and Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). The symptoms in leaves of citrus trees include chlorotic spots, angular stains, corky and thickening veins, mottle and diffuse chlorosis, as

A diferencia de los efectos de HLB en naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) de Brasil, y Florida, U.S.A. (Bassanezi *et al.*, 2011; Gottwald *et al.*, 2007; Bové, 2006), en el país la mayor severidad de síntomas fisiológicos e histológicos causados por HLB se encuentran en limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle *Christm.*) y limón persa (*Citrus latifolia* Tanaka) (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Los síntomas en hojas de cítricos agrios incluyen puntos cloróticos, manchas angulares, acorchamiento y engrosamiento de nervaduras, moteado y clorosis difusa hasta el amarillamiento generalizado en la lámina foliar y defoliación. La maduración irregular sólo se ha observado en limón mexicano, la cual inicia con un color amarillento en la parte basal y eventualmente termina en la caída de frutos (Robles-González *et al.*, 2013). Histológicamente existe un incremento de almidón en el mesófilo de limón mexicano y persa. En naranja dulce se concentra en el parénquima de empalizada. En todos los casos se presenta hiperplasia, lo que ocasiona un colapso de floema (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

La información sobre el impacto destructivo del HLB con sustento cuantitativo y epidemiológico es escasa; los estudios existentes estimaron el impacto con base en el número de plantas erradicadas y costos por control del vector en cítricos dulces (Brlansky *et al.*, 2009). En Brasil, las pérdidas en producción por efecto del HLB variaron entre 41 a 100 % en naranja dulce cv. Valencia (Bassanezi *et al.*, 2009). Bassanezi *et al.* (2011) determinaron la relación de la producción con el efecto de la enfermedad e indicaron una tendencia perjudicial; además encontraron que la magnitud del impacto productivo también depende del manejo agronómico y edad de los árboles. En México, se estimaron pérdidas en producción en toda la cadena productiva de limón mexicano y limón persa (17.6 %) y naranja dulce (57.6 %) mediante métodos multivariados y

well as the generalized yellowing of the leaf and defoliation. Irregular ripening has only appeared in the Mexican lime, beginning with a yellow color in the base, and eventually falling of fruits (Robles-González *et al.*, 2013). Histologically, there is an increase in starch in the mesophyll of Mexican and Persian limes. In sweet orange, it concentrates in the palisade parenchyma. In all cases, there is hyperplasia, which causes a collapse in the phloem (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012).

Information about HLB's destructive impact with quantitative and epidemiological support is scarce; available studies estimated the impact based on the number of eradicated plants and costs of the vector control in sweet citrus plants (Brlansky *et al.*, 2009). In Brazil, losses in production due to the effect of HLB were in the range of 41 and 100 % in sweet orange cv. Valencia (Bassanezi *et al.*, 2009). Bassanezi *et al.* (2011) determined the relationship of production with the effect of the disease and indicated a damaging trend; nonetheless, they also found that the magnitude of the production impact depends on the agronomic management and tree age. In Mexico, there were estimated losses in production throughout the production chain of Mexican lime and Persian lime (17.6 %) and sweet orange (57.6 %) using multivariate methods and comparative epidemiology at 3 and 5 years since the beginning of the disease (Salcedo *et al.*, 2010). Given the current dispersion of CLAs in the citriculture of the Mexican Pacific and the Yucatan Peninsula and its prevalence in sour citrus for which mostly the effects of this pathogen was unknown (Mora-Aguilera *et al.*, 2013), there is an urgent need to know the impact on production of this citrus group. Therefore, the objective of this study was to determine the CLAs detrimental effect on the production of Persian lime, *C. latifolia*, by analyzing morphological and organoleptic variables on fruits.

epidemiología comparativa a 3 y 5 años (Salcedo *et al.*, 2010).

Ante la dispersión existente de CLas en la citricultura del Pacífico mexicano y Península de Yucatán, y debido a la prevalencia en cítricos agrios, para los cuales se desconocía en su mayoría los efectos de este patógeno (Mora-Aguilera *et al.*, 2013), surge la necesidad imperiosa de conocer el impacto en la producción de este grupo de cítricos. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto detrimental de CLas en la producción de limón persa, *C. latifolia*, mediante el análisis de variables morfológicas y organolépticas en frutos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Sitio de estudio.** Se delimitó un bloque de 0.5 ha en un huerto comercial, compuesto por 30 ha de limón persa de cuatro años de edad ubicado en Tizimín, Yucatán y con presencia de la enfermedad desde 2010. El manejo agronómico incluyó riego por goteo, fertilización, poda y control químico de *D. citri*.

**Evaluación de síntomas y severidad.** La evaluación de severidad se realizó en 388 árboles con una escala aritmética. Dicha escala consideró las clases: 0=sano, 1=25, 2=50, 3=75 y 4=100 %. El porcentaje de severidad se calculó con la división del dosel del árbol en cuatro secciones de 25 %. La severidad total (Sevt) por árbol fue la suma del porcentaje de cada sección (s) Donde  $s = 1-4$ .

**Diagnóstico y cuantificación de la concentración de CLas mediante PCR cuantitativo.** El tejido vegetal se colectó en Marzo de 2011, época favorable para la multiplicación de la bacteria y expresión de síntomas. Cada muestra consistió de ocho hojas,

## MATERIALS AND METHODS

**Place of study.** A 0.5 ha block was delimited in a commercial orchard made up of 30 ha of four-year old Persian lime trees located in Tizimin, Yucatan, attacked by the disease since 2010. Agronomic management included drip irrigation, fertilization, trimming, and chemical control of *D. citri*.

**Evaluation of symptoms and severity.** The evaluation of severity was carried out in 388 trees using an arithmetic scale, which considered the types 0=healthy, 1=25, 2=50, 3=75 and 4=100 % of canopy with HLB symptoms. The percentage of severity was calculated by dividing the canopy of the tree in four sections of 25% each. The total severity (Sevt) by tree was the sum of the percentage of each section (s) Where  $s = 1-4$ .

**Diagnostic and quantification of the concentration of CLas.** The plant tissue was collected in March 2011, a favorable time for the multiplication of the bacteria and expression of symptoms. Each sample consisted of eight leaves; samples were separated by symptomatic and asymptomatic sections in diseased trees. Likewise, healthy trees were sampled as controls. Molecular analysis consisted in isolating DNA with DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen ®) from 100 mg of plant tissue following the manufacturer's protocol. Detection and quantification was carried out in a Biorad® CFX96 thermocycler with a TaqMan® probe and specific primers for CLas that amplify a portion of the gene 16S rDNA, an positive internal control based on cytochrome-oxidase (COX) was included primers for the as reaction (DGSV-CNRF, 2008; Li *et al.*, 2006).

For the quantification of the number of genomic copies of CLas in the samples, an external

se separaron muestras por secciones sintomáticas y asintomáticas en árboles enfermos. Del mismo modo se muestrearon árboles sanos como testigos. El análisis molecular consistió en el aislamiento de ADN con DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen®) para 100 mg de tejido vegetal con el protocolo del fabricante. La detección y cuantificación se realizó en un termociclador Biorad® CFX96, con sonda TaqMan® e iniciadores específicos para CLas que amplifican una porción del gen 16S rDNA, así como una sonda e iniciadores para la enzima citocromo-oxidasa (COX) como control interno de la reacción. (DGSV-CNRF, 2008; Li *et al.*, 2006).

Para la cuantificación del número de copias genómicas de CLas en las muestras, se generó una curva de calibración externa. Se utilizó el fragmento del gen 16S rDNA clonado en un plásmido PGEM-T® Promega®). El plásmido se purificó y cuantificó por uv-espectrofotometría (Nanodrop 1000) y se realizaron diluciones seriales; estas se sometieron a amplificación con tres repeticiones por concentración y se utilizó una regresión logarítmica para estimar la concentración de CLas ( $y$ ) donde  $y = (-6.221) * \text{LN}(\text{Ct}) + 27.409$ .

La determinación de la relación de la severidad de síntomas con la concentración bacteriana, se realizó mediante el ajuste de un modelo cuadrático.

**Evaluación de variables morfológicas y organolépticas en frutos.** Los frutos se colectaron, etiquetaron y se conservaron en refrigeración a 4°C hasta su evaluación entre el segundo y quinto día después de la cosecha. Las variables morfológicas medidas fueron peso por fruto (gr), diámetro ecuatorial (DE), diámetro polar (DP), grosor de cáscara (GC) (mm) y volumen de jugo (VJ) (mL) de 10 frutos por tratamiento. Las variables organolépticas se midieron en el jugo extraído de los frutos, principalmente se determinó la concentración de grados Brix con un refractómetro digital (Palette®), pH con un potenciómetro (HACH®), y acidez titulable

calibration curve was generated. A fragment of the gene 16S rDNA was used, cloned in a plasmid PGEM-T® Promega®). The plasmid was purified and quantified using uv-spectrophotometry (Nanodrop 1000) and serial dilutions were carried out. The reaction were performed in triplicate per concentration and a logarithmic regression was used to estimate the CLas concentration ( $y$ ), in which  $y = (-6.221) * \text{LN}(\text{Ct}) + 27.409$ .

Relationship of the severity of symptoms with the bacterial concentration was determined in a quadratic model fitted.

**Evaluation of morphologic and organoleptic variables in fruits.** The fruits were harvested, labeled and kept in refrigeration at 4 °C until their evaluation was performed 2 and 5 days after harvest. The morphological variables measured were weight per fruit (gr); equatorial diameter (ED), polar diameter (PD), skin thickness (ST) (mm); and volume of juice (VJ) (mL) of 10 fruits per treatment. The organoleptic variables were measured in the juice extracted from the fruit: we determined mainly concentration of Brix degrees using a digital refractometer (Palette®), pH with a potentiometer (HACH®), and titratable acidity through the phenolphthalein method (Helrich, 1990).

**Statistical analysis.** The experiment consisted of a design in blocks with paired treatments: healthy trees (T1) adjacent to infected trees, in which branches were differentiated in asymptomatic (T2) and symptomatic (T3). Thirty-two trees were chosen, distributed in six blocks in incomplete sub repetitions with four, six, and eight trees. The blocks were selected in a directed way to disease outbreaks. This method is similar to that used by Cristóbal *et al.* (2006) to reduce the variability of the data by effects of intensity and infection periods, soil fertility, and agronomic management of the

con el método de fenolftaleína (Helrich, 1990).

**Análisis estadístico.** El experimento consistió en un diseño de bloques con tratamientos apareados, árboles sanos (T1) adyacentes a árboles enfermos, de los cuales se diferenciaron ramas asintomáticas (T2) y sintomáticas (T3). Se seleccionaron 32 árboles distribuidos en seis bloques en sub-repeticiones incompletas con cuatro, seis y ocho árboles. Los bloques se seleccionaron en forma dirigida a focos de enfermedad. Esta metodología es análoga a la empleada por Cristóbal *et al.* (2006) para reducir la variabilidad de los datos por efectos de intensidad y periodos de infección, fertilidad de suelo y manejo agronómico del huerto. Para la evaluación de las variables morfológicas y organolépticas, en cada árbol se colectaron 10 frutos en T1, T2 y T3. Las medias de cada variable por árbol se organizaron por tratamientos, severidad y bloque para un ANOVA y comparación de medias con Tukey ( $P=0.05$ ). Los análisis se realizaron con SAS V9.0. Adicionalmente, se realizó un análisis correlativo de pérdidas con 10 árboles por cada clase de severidad (50 árboles), para así incrementar la variabilidad del efecto de producción en función del daño. Previo al análisis correlativo, se detectaron posibles observaciones fuera de tendencia y se excluyeron. Los valores de cada variable evaluada y el porcentaje de severidad de cada árbol se ajustaron independientemente a distintos modelos correlativos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Descripción de los síntomas de HLB en limón persa.** Los frutos de limón persa que se evaluaron en este estudio carecieron de los síntomas característicamente atribuibles a HLB como los que se indicaron previamente para cítricos dulces (Bassanezi *et al.*, 2009) y para limón mexicano, como

orchard. For the evaluation of morphological and organoleptic variables, in each tree 10 fruits were collected in T1, T2, and T3. The averages of each variable per tree were organized by treatments, severity, and block for an ANOVA and comparison of averages using Tukey test ( $P=0.05$ ). Analyses were carried out using SAS V9.0. In addition, a correlative analysis was made of losses with 10 trees for each severity level (50 trees) for to increase the variability of the effect of production depending on the damage. Before the correlative analysis, outliers were detected and excluded. The values for each evaluated variable and the percentage of severity for each tree were independently adjusted at different correlative models.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Description of the symptoms of HLB in Persian lime.** The Persian lime fruits evaluated in this study showed no symptoms typically attributed to HLB, such as the ones indicated earlier for sweet citrus fruits (Bassanezi *et al.*, 2009) and for Mexican limes, like irregular ripening and fruit fall (Robles-González *et al.*, 2013); the above was recorded even in fruits from trees with a severity of 100% HLB severity. In this study, HLB symptoms were found in Persian lime leaves, without a distribution pattern in the canopies of studied trees. The symptoms observed (Figure 1) begin with diffuse mottled (A) that become larger until they are clearly defined and formed internerval angular spots are formed (B), which become distorted in chlorotic spots that invade the whole leaf (C). Plants with severe infections present thickening and corky of the central rib (D) with a coriaceous appearance; finally, a semi-intense and generalized yellowing can be seen in the leaf (E) without reaching the abscission, as is the case in Mexican lime and

maduración irregular y caída de frutos (Robles-González *et al.*, 2013), lo anterior se registró aún en frutos provenientes de árboles con severidad del 100%.

En el presente estudio los síntomas de HLB se detectaron en hojas de limón persa, sin un patrón de distribución en el dosel de los árboles. Los síntomas que se observaron (Figura 1) iniciaron con mo-

whose symptoms occur faster (Robles-González *et al.*, 2013). In sweet oranges these symptoms are less intense, furthermore, the generalized yellowing of the leaf occurs infrequently and no defoliation of the same is observed (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). These authors also indicated this tendency in histological symptoms, suggesting that in Mexico, sour citrus fruits present symptoms at a greater speed, intensity, and generalization in



**Figura 1.** Síntomas de HLB en limón persa (*C. latifolia*) confirmados como positivos por PCR cuantitativo. (A) Moteado difuso; (B) Manchas angulares; (C) Manchas angulares y puntos cloróticos; (D) Engrosamiento y acorchamiento de nervadura; (E) Amarillamiento generalizado de la lámina foliar; (F) Frutos de rama sintomática con amarillamiento asociado a HLB; (G) Fruto de rama sana. Tizimín, Yucatán, 2011.

**Figure 1.** Symptoms of HLB in Persian lime (*C. latifolia*) confirmed as positive by quantitative PCR. (A) Diffuse mottled; (B) Angular spots; (C) Angular and chlorotic spots; (D) Rib thickening and cork appearance; (E) Generalized yellowing of the leaf; (F) Fruits from symptomatic branch with yellowing associated with HLB; (G) Fruit from healthy branch. Tizimín, Yucatan, 2011.

teados difusos (A) que aumentaron de tamaño hasta definirse claramente y formar manchas angulares internervales (B), las cuales se distorsionan en puntos cloróticos que invaden la lámina foliar (C). En plantas con infección severa se observa engrosamiento y acorchamiento de la nervadura central (D) con un aspecto coriáceo; finalmente se apreció un amarillamiento medianamente intenso y generalizado en la lámina foliar (E) sin llegar a la abscisión como sucede en limón mexicano y cuyos síntomas ocurren con mayor velocidad (Robles-González *et al.*, 2013). En naranja dulce, estos síntomas son menos intensos ya que el amarillamiento generalizado de la lámina foliar ocurre en poca frecuencia y no se observa defoliación de las mismas (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Estos autores también indicaron esta tendencia en síntomas histológicos, lo que sugiere que en México los cítricos agrios exhiben síntomas con mayor velocidad, intensidad y generalización en el dosel que los que se registraron en otros países (Bové, 2006; Brlansky *et al.*, 2009).

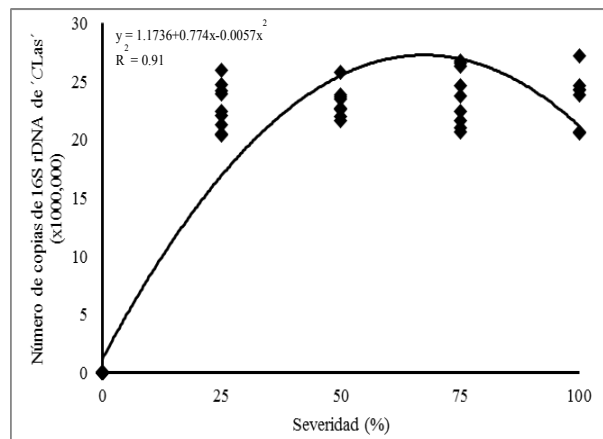
**Diagnóstico y cuantificación de la concentración de CLAs en limón persa.** Se confirmó por PCR en tiempo real la condición sanitaria de los árboles seleccionados como sanos y enfermos. Los árboles infectados mostraron diferentes concentraciones de CLAs, de manera preliminar se detectó que la intensidad de los síntomas inducidos está en función de la concentración bacteriana. La asociación de la concentración de CLAs y la severidad se demostró con el ajuste a un modelo de correlación cuadrático  $y = 1.1736 + 0.774x - 0.0057x^2$ ,  $R^2 = 0.91$  (Figura 2).

La relación de la concentración bacteriana con la severidad de HLB sugiere que la expresión de síntomas posee una relación directa con el incremento de inóculo de la bacteria en la planta, lo cual explica que a mayor severidad exista mayor efecto negativo en la producción de limón persa (Figura 4).

the canopy than those registered in other countries (Bové, 2006; Brlansky *et al.*, 2009).

**Diagnostic and quantification of the concentration of CLAs in Persian lime.** The sanitary condition of the selected trees was confirmed by PCR in real time as either healthy or infected. The latter displayed different concentrations of CLAs; the intensity of the symptoms induced were preliminarily found to depend on the bacterial concentration. The relation between the concentration of CLAs and the severity was shown to fit a quadratic correlation model  $y = 1.1736 + 0.774x - 0.0057x^2$ ,  $R^2 = 0.91$  (Figure 2).

The relation between bacterial concentration and the severity of HLB suggests that there is a direct relationship between expression of symptoms and



**Figura 2.** Correlación de la severidad del HLB en limón persa vs concentración de CLAs (número de copias del gen 16S rDNA estimada por PCR en tiempo real, en árboles sanos y enfermos con distinto grado de severidad de HLB). La línea y el modelo representan el ajuste mediante una regresión cuadrática.

**Figure 2.** Correlation of the severity of HLB in Persian lime vs concentration of CLAs (number of copies of the gene 16S rDNA estimated by quantitative PCR in healthy and infected trees with different degrees of severity of HLB severity). The line and the model represent the adjustment using a quadratic regression.



Esto confirma los resultados obtenidos con PCR de punto final en los cuales la detección es exitosa solo en muestras con síntomas evidentes de la enfermedad (Teixeira *et al.*, 2008); o lo contrario, como lo es la dificultad de realizar detecciones en infecciones latentes, cuando la concentración bacteriana es baja (Li *et al.*, 2008).

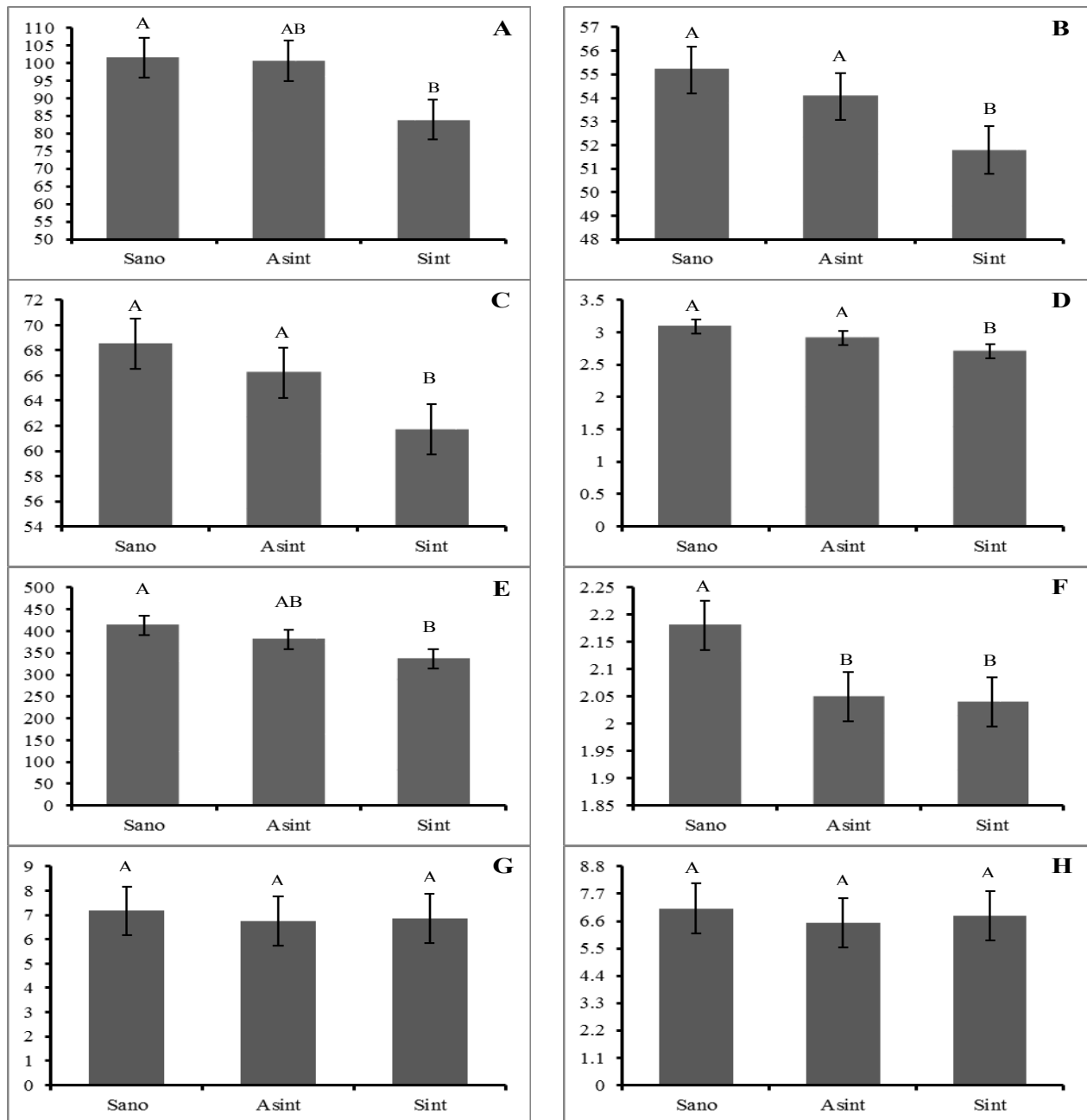
**Estimación de pérdidas con análisis de varian-za.** Las variables peso, diámetro ecuatorial y polar, grosor de cáscara, volumen de jugo y pH fueron estadísticamente mayores en árboles sanos (T1) con respecto a frutos de ramas sintomáticas (T3) (Tukey,  $P=0.05$ ) (Figura 3). Estos resultados muestran que la concentración bacteriana, aún en una infección reciente (15 meses), influye negativamente en las variables morfológicas y organolépticas que se evaluaron. En este efecto influye el patrón productivo del limón persa, ya que en los árboles, los frutos se concentran en ramas con crecimiento secundario en la parte externa del dosel aún con crecimiento activo (Agustí *et al.*, 1995; Davies y Albrigo, 1994).

Las variables de grados Brix y acidez titulable no fueron estadísticamente distintas entre T1 y T3. No se observó diferencia entre frutos de ramas asintomáticas y sintomáticas (T2 y T3), excepto en la variable diámetro, probablemente porque el efecto fisiológico no depende únicamente del alojamiento de CLas en el floema del tejido analizado, sino en la interferencia de la movilización de fotoasimilados por alojamiento de CLas en ramas primarias (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Entre T1 y T3 la mayor reducción fue en peso con 17.31 % y volumen de jugo con 18.62 %. En grosor de cáscara fue de 12.2 %, diámetro polar 10 % y diámetro ecuatorial 6.2 %. En el caso de las variables organolépticas solo se observó reducción en pH con 6.4 % (Cuadro 1).

the increase of bacterial inoculum of the bacteria in the plant, which explains why high HLB severity leads to a greater negative effect on the production of Persian lime (Figure 4). This confirms the results obtained with a standard PCR in which detection is successful only in samples with evident symptoms of the disease (Teixeira *et al.*, 2008); also, it explains the difficulty of carrying out these detections in latent infections, when bacterial concentration is very low (Li *et al.*, 2008).

**Estimation of losses with an analysis of variance.** The variables of weight, equatorial and polar diameters, thickness of skin, volume of juice and pH were statistically higher in healthy trees (T1) than in fruits from HLB symptomatic branches (T3) (Tukey,  $P=0.05$ ) (Figure 3). These results show that bacterial concentration, even in a recent infection (15 months), has a negative influence on the morphological and organoleptic evaluated variables. This effect is influenced by the productive pattern of the Persian lime, since in the trees the fruits are concentrated in branches with secondary growth in the external part of the canopy, even with active growth (Agustí *et al.*, 1995; Davies and Albrigo, 1994).

The variables of Brix degrees and titratable acidity were not statistically different between T1 and T3. No differences were observed between fruits from symptomatic and asymptomatic branches (T2 and T3), except in the variable of diameter, probably because the physiological effect does not depend only on the hosting of CLas in the phloem of the analyzed tissue, but also on the interference of the mobilization of photoassimilates due to the hosting of CLas in primary branches (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Between T1 and T3 the greatest reduction was in weight (17.31 %) and volume of juice (18.62 %). In skin thickness,



**Figura 3.** Comparación de medias de peso (A), diámetro ecuatorial (B), diámetro polar (C), grosor de cáscara (D), volumen de jugo (E), pH (F), Grados Brix (G) y acidez titulable (H) evaluadas en frutos de limón persa (*C. latifolia*) provenientes de árboles sanos y de ramas sintomáticas y asintomáticas de árboles positivos a CLAs. Para cada variable, barras con al menos una letra en común son estadísticamente iguales Tukey ( $P= 0.05$ ). Las líneas en las barras representan el error típico.

**Figure 3.** Comparison of average of weight (A), equatorial diameter (B), polar diameter (C), thickness of skin (D), volume of juice (E), pH (F), Brix degrees (G), and titratable acidity (H) evaluated in Persian lime fruits (*C. latifolia*) from healthy trees and symptomatic and asymptomatic branches of trees infected by CLAs. For each variable, bars with at least one letter in common are statistically equal, Tukey ( $P= 0.05$ ). The lines on the bars represent the standard error.

**Cuadro 1.** Efecto de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en variables morfológicas y organolépticas de frutos de limón persa (*C. latifolia*).**Table 1.** Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on morphological and organoleptic variables of Persian lime fruits (*C. latifolia*).

Factor	Peso	DE*	DP	GC	VJ	Brix	pH	Acidez
T1	101.5 a <sup>†</sup>	55.2 a	68.5 a	3.1 a	413.8 a	7.2 a	2.2 a	7.1 a
T2	100.5 ab	54.1 a	66.2 a	2.1 ab	380 ab	6.8 a	2.1 b	6.5 a
T3 <sup>††</sup>	83.9 b	51.8 b	61.7 b	2.7 b	336.8 b	6.9 a	2.0 b	6.8 a
Reducción <sup>†††</sup>	17.31	6.16	9.95	12.20	18.62	4.32	6.42	4.22

<sup>†</sup> Valores con al menos una letra en común en las columnas son estadísticamente iguales (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). <sup>††</sup> Factor T1 (sano), T2 (asintomático) y T3 (sintomático) fueron confirmados por PCR en tiempo real. <sup>†††</sup> El porcentaje se calculó con la diferencia de medias entre frutos de árboles sanos y de ramas sintomáticas. \*DE=Diámetro Ecuatorial, DP=Diámetro Polar, GC= Grosor de Cáscara, VJ= Volumen de Jugo / <sup>†</sup> Values with at least one letter in common in the columns are statistically equal (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). <sup>††</sup> Factor T1 (healthy), T2 (asymptomatic), and T3 (symptomatic) were confirmed by real time PCR. <sup>†††</sup> The percentage was calculated with the difference of averages between fruits from healthy trees and symptomatic branches. \*ED= Equatorial Diameter, PD= Polar diameter, ST= Skin Thickness and VJ= Volume of Juice.

La reducción en las variables peso y volumen de jugo se explica por la relación fisiológica directa entre ellas, ya que a mayor peso de fruto mayor es el volumen de jugo (Davies y Albrigo, 1994). El efecto de CLAs en T3 en comparación con T1 (Cuadro 1) se traduce en pérdidas en la producción del 17.3 % por año productivo, más de lo que Salcedo *et al.* (2010) estimaron en ausencia de la enfermedad, ya que en su estudio indicaron que ocurrirían pérdidas del 17.6 % en cítricos agrios y 52.7 % en naranja dulce hasta después de cinco años del ingreso de CLAs a México. Además, dichos investigadores explicaron que el mayor impacto productivo del HLB sobrevendría en naranja dulce; esta observación posiblemente obedeció a la falta de información de escenarios epidémicos en cítricos agrios y a que se utilizaron datos de epidemias en naranja dulce para fines comparativos.

En Brasil, Bassanezi *et al.* (2009) detectaron pérdidas en peso entre 17.5 % (Valencia temprana) y 42.3 % (Valencia tardía) por efecto de *Candidatus Liberibacter* spp. En esta región la enfermedad es endémica, lo que implica una exposición prolongada de los árboles a la infección bacteriana, ya

reduction was 12.2 %, in polar diameter 10 % and in equatorial diameter 6.2 %. In the case of organoleptic variables, there was only a drop in pH observed, with 6.4 % (Table1).

The reduction in variables of weight and juice is explained by the direct physiological relation between them, since a greater weight of the fruit implies more juice (Davies and Albrigo, 1994). The effect of CLAs in T3 in comparison to T1 (Table 1) translates into production losses of 17.3 % per productive year, more than what Salcedo *et al.* (2010) estimated in the absence of a disease, reporting losses of 17.6 % in sour citrus fruits and 52.7 % in sweet oranges, 5 years after CLAs entered Mexico. In addition, these researchers explained that the highest productive impact of HLB would be on sweet oranges; this observation possibly was due to lack of information on epidemic scenarios in sour citrus, and that data on sweet orange epidemic were used for comparative purpose.

In Brazil, Bassanezi *et al.* (2009) observed weight losses of 17.5 % (early Valencia) to 42.3 % (late Valencia) due to *Candidatus Liberibacter* spp. In this

que la detección se realizó en 2004. En el presente estudio, las pérdidas detectadas fueron similares a Valencia temprana (17.3 y 17.5 %) aun cuando la plantación evaluada presentó solamente un periodo de 6-15 meses de exposición a la infección bacteriana, por lo que las pérdidas en periodos de exposición y desarrollo de la enfermedad similares a los de Brasil podrían ser mayores en limón persa, máxime cuando la severidad de los síntomas visuales e histológicos son más intensos que los que se indican para naranja dulce (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Adicionalmente, la mayor frecuencia de brotación vegetativa de los cítricos agrios permite periodos de infección prolongados e incremento de la bacteria, debido a la asociación con infestaciones frecuentes de vectores infectivos (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2013; Robles-González *et al.*, 2013).

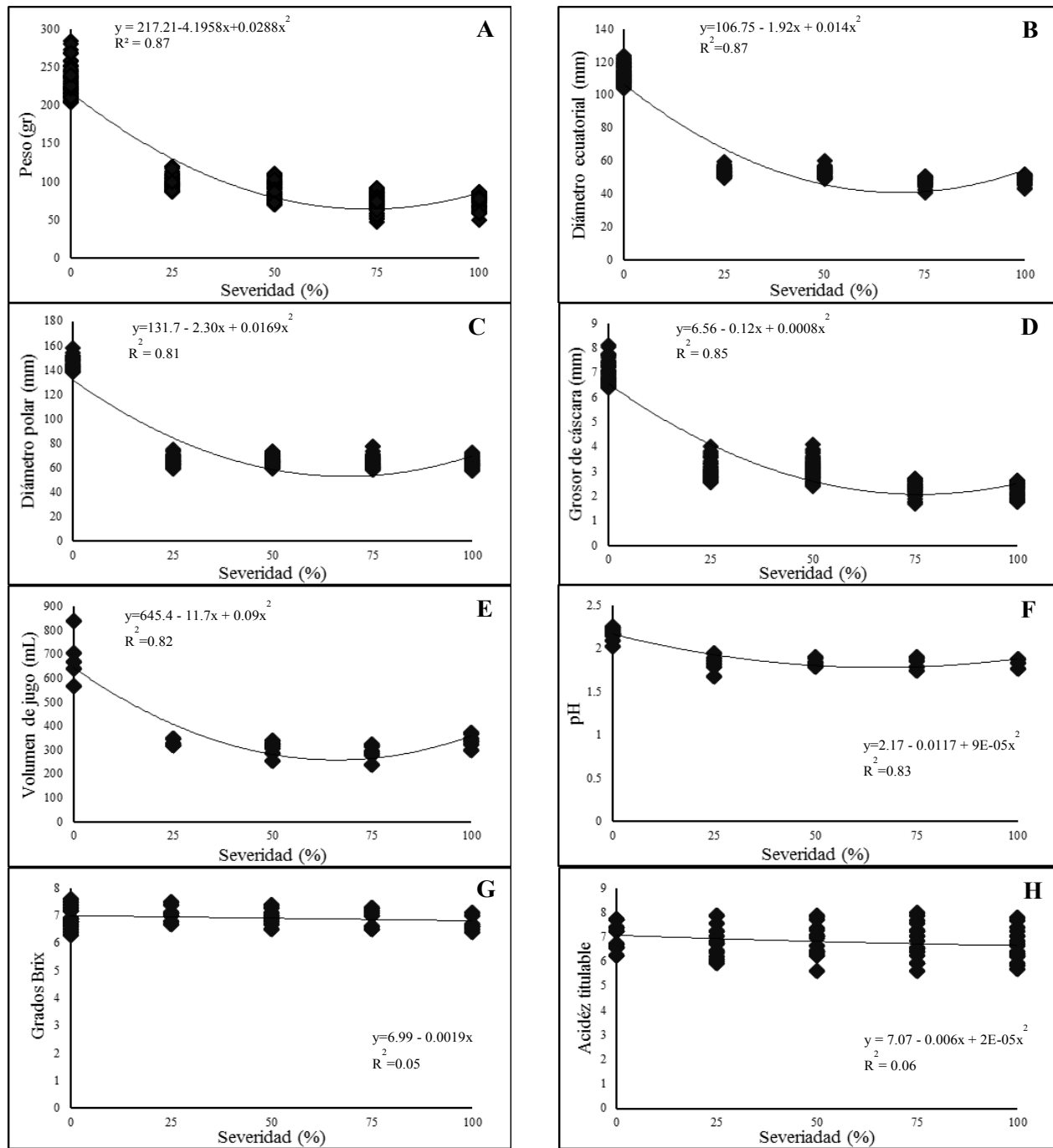
**Estimación de pérdidas con modelos correlativos.** La asociación de la severidad del HLB con variables morfológicas y organolépticas se confirmó con el ajuste a modelos cuadráticos correlativos (Figura 4). A pesar de la selección apareada de árboles sanos y enfermos para evitar efectos de variabilidad en fertilidad del suelo y manejo agronómico, fue necesario eliminar datos aberrantes los cuales se asociaron con árboles de bajo vigor (12/50); no obstante lo anterior, se mantuvo un número de árboles en observación aún superior al que utilizaron en un estudio similar Bassanezi *et al.* (2009) donde se estudiaron de 14 a 21 árboles por periodo de cosecha y variedad.

Las variables que mostraron mayor correlación con la severidad fueron las morfológicas ya que se ajustaron a los modelos cuadráticos. Los modelos obtenidos en el presente estudio fueron los siguientes:  $Y_{PESO} = 217.21 - 4.1958x + 0.0288x^2$ , ( $R^2 = 0.86$ );  $Y_{DC} = 106.75 - 1.92x + 0.014x^2$ ,

region the disease is endemic, implying a prolonged exposure of trees to the bacterial infection, since it was detected in 2004. In our study, the losses found were similar to early Valencia (17.3 and 17.5 %) even though the evaluated plantation presented only a period of 6-15 months of exposure to the bacterial infection; therefore, expected losses in periods of disease exposure and disease development similar to those of Brazil may be higher in Persian lime in Mexico, especially when the severity of visual and histological symptoms are more intense in Persian lime than those reports for sweet orange (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). In addition, the highest frequency of vegetative sprouting of the sour citrus fruits allows prolonged periods of infection and increase of the bacteria, due to the association with frequent infestations of infective vectors (Grafton-Cardwell *et al.*, 2013; Hall *et al.*, 2013; Robles-González *et al.*, 2013).

**Estimation of losses with correlative models.** The association of the severity of HLB with morphological and organoleptic variables was confirmed with the fitting of correlative quadratic models (Figure 4). Despite the paired selection of healthy and infected trees to avoid variability effects in soil fertility and agronomic management, it was necessary to eliminate outliers, which were related with low-vigor trees (12/50); however, a number of trees remained under observation even superior to that used in a similar study of Bassanezi *et al.* (2009) where 14 and 21 trees were studied for each planting period and variety.

The variables that showed the highest correlation with severity were the morphological variables, since they fitted to the quadratic models. The models obtained in this study were as follow:  $Y_{weight} = 217.21 - 4.1958x + 0.0288x^2$ , ( $R^2 = 0.86$ );  $Y_{ED} = 106.75 - 1.92x + 0.014x^2$ , ( $R^2 = 0.87$ );



**Figura 4.** Correlación entre severidad de HLB y variables morfológicas: peso (A), diámetro ecuatorial (B), diámetro polar (C), grosor de cáscara (D) y volumen de jugo (E); y organolépticas pH (F), Grados Brix (G) y acidez titulable (H), de frutos de limón persa (*C. latifolia*). La línea y el modelo representan el ajuste mediante una regresión cuadrática.

**Figure 4.** Correlation between severity of HLB and morphological variables: weight (A), equatorial diameter (B), polar diameter (C), thickness of skin (D), and volume of juice (E); Organoleptic: pH (F), Brix degrees (G) and tirtatable acidity (H), in Persian lime fruits (*C. latifolia*). The line and the model represent the adjustment using a quadratic regression.

( $R^2=0.87$ );  $Y_{DP}=131.7-2.30x+0.0169x^2$ , ( $R^2=0.87$ );  $Y_{GC}=6.56-0.12x+0.0008x^2$ , ( $R^2=0.85$ );  $Y_{VJ}=645.4-11.7x+0.09x^2$ , ( $R^2=0.82$ ). En las variables organolépticas solo pH se ajustó con el modelo  $Y_{pH}=2.17-0.0117+9E-05x^2$ , ( $R^2=0.83$ ). Grados Brix y acidez titulable no se asociaron significativamente con la severidad y tampoco se encontró un efecto claro de la bacteria sobre estas. Esto posiblemente se debió a la fisiología de frutos de limón persa, los cuales tienden a acumular bajas concentraciones de azúcares y que por la naturaleza de los desórdenes fisiológicos inducidos por CLas, se requiera un periodo de infección más prolongado para inducir una alteración detectable en estas variables (Davies y Albrigo, 1994). La variabilidad de los datos de producción debido al vigor de árboles por efectos multifactoriales de manejo se observó en un estudio similar con naranja dulce realizado en Brasil, donde la dispersión de los datos en la correlación del peso de frutos con severidad del HLB fue alta con coeficientes de determinación bajos ( $R^2=0.4$ ) (Bassanezi *et al.*, 2011); sin embargo, en ese estudio se combinaron cosechas de diferentes años (2004-2007) con periodos distintos de endemicidad (periodo de infección), lo anterior se evitó en nuestro estudio donde se obtuvo una mejoría sustancial en los coeficientes de determinación de los modelos generados.

En una infección sistémica o crónica como la que induce CLas, las pérdidas que se obtuvieron en este estudio (17.3 %) pueden aumentar con el tiempo a consecuencia del debilitamiento paulatino y muerte productiva del árbol (Da Graca, 1991; Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2011). En nuestro estudio, se estimaron pérdidas en limón persa en un monto de 17.3 % después de 15 meses de ocurrir la infección; es predecible que ante la falta de medidas efectivas para el control del patógeno, anualmente el deterioro incrementará hasta probablemente superar los registros de pérdidas

$Y_{PD}=131.7-2.30x+0.0169x^2$ , ( $R^2=0.87$ );  $Y_{S_T}=6.56-0.12x+0.0008x^2$ , ( $R^2=0.85$ );  $Y_{VJ}=645.4-11.7x+0.09x^2$ , ( $R^2=0.82$ ). In the organoleptic variables, only pH fitted the model  $Y_{pH}=2.17-0.0117+9E-05x^2$ , ( $R^2=0.83$ ). Brix degrees and titratable acidity did not associate significantly with severity and there were no clear effects found of the bacteria on such variables. This possibly was due to the physiology of Persian lime fruits that tend to accumulate low concentrations of sugar, and to the nature of the physiological disorders induced by CLas; thus, a more prolonged infection period may be required to induce a detectable alteration in these variables (Davies and Albrigo, 1994). The variability of the production data due to the vigor of trees by multifactor effects of management was observed in a similar study with sweet oranges carried out in Brazil, where the dispersion of data in the correlation of weights of fruits with a severity of HLB was high, with low determination coefficients ( $R^2=0.4$ ) (Bassanezi *et al.*, 2011); however, in that study, harvests from different years were combined (2004-2007) with different periods of endemicity (periods of infection); the above it was avoided in our study where a substantial improvement is obtained in the determination coefficients of the generated models.

In a situation of systemic or chronic infection like the induced by CLas, the estimated losses in Persian lime indicated in our study are expected to increase with time due to the gradual weakening and productive tree death (Da Graca, 1991; Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2011). Yield loss in Persian lime was estimated at an amount of 17.3% after 15 months of the beginning of HLB; it is predictable that in the absence of effective measures to control the pathogen, tree impairment would increase annually to probably overcome loss record indicated for sweet orange (Bassanezi *et al.*, 2011) furthermore, reach tree death. On the

indicados para naranja (Bassanezi *et al.*, 2011) y llegar hasta la muerte del árbol. Por otra parte, en un proceso epidémico del HLB se requieren varios ciclos de infección para alcanzar una incidencia del 100 % de los huertos. Es necesario que los modelos de pérdidas integren esta consideración para evitar sobreestimar los impactos de la enfermedad (Salcedo *et al.*, 2010).

## CONCLUSIONES

A quince meses de la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en un huerto de limón persa (*C. latifolia*) de la región de Tizimín, Yucatán, México, se encontró que el HLB produjo un efecto perjudicial en el tamaño, grosor de cáscara, pH, volumen de jugo y peso de los frutos. En las últimas dos variables, se encontró la mayor reducción con 18.62 y 17.31 %, en frutos de árboles con HLB en comparación con frutos de árboles sanos, en un ciclo productivo. La reducción en peso implicó una pérdida en producción de 2.4 toneladas/ha, la cual estuvo en función del incremento de la severidad del HLB en el dosel del árbol ( $R^2=0.8-R^2=0.87$ ), y de la concentración bacteriana, la cual se estimó por PCR cuantitativo. Este estudio constituye la primera evidencia cuantitativa del efecto de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón persa, bajo la condición de reciente ingreso en México.

### Agradecimientos

A la instancia financiadora y becaria FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591 y CONACYT; a los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de la Península de Yucatán por el apoyo logístico brindado; a Edwin Hernández Chan por su apoyo en campo y laboratorio. A miembros del GIIC por su apoyo en la planeación y Aurelia Herrera López en medición de acidez titulable.

other hand, an endemic process of HLB requires various infection cycles to achieve an incidence of 100 % of the orchards; therefore models to estimate losses must integrate this consideration to avoid overestimating the impacts of HLB. This principle has already been applied in the study (Salcedo *et al.*, 2010).

## CONCLUSIONS

Fifteen months after the detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in an orchard of Persian lime (*C. latifolia*) in the region of Tizimin, Yucatan, Mexico, it was found that HLB had a detrimental effect on the size, thickness of skin, pH, volume of juice and weight of the fruit. In the two latter variables, the greatest reduction was found with 18.62 and 17.31 % in fruit trees with HLB in comparison with fruits from healthy trees, in a productive cycle. The weight reduction implicate a 2.4 tons/ha yield loss, which is related to the severity of HLB in the canopy tree ( $R^2=0.8-R^2=0.87$ ), and on the bacterial concentration, which was estimated using quantitative PCR. This study constitutes the first quantitative evidence of the effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on Persian limes, under the condition of recent invasion of Mexico.

### Acknowledgements

For the scholarship and financing granted by FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591, and CONACYT; to the State Committees of Plant Health of the Yucatan Peninsula, for the logistical support provided; to Edwin Hernández Chan for his support on the field and in the lab. To the members of the GIIC for their support in planning, and Aurelia Herrera López for measuring titratable acidity.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## LITERATURA CITADA

- Agustí M, Zaragoza S, Bleiholder H, Buhr L, Hack H, Klose R y Staub R. 1995. Escala BBCH para la Descripción de los Estadios Fenológicos del Desarrollo de los Agrios (Gén. Citrus). Levante Agrícola 332, 189-199.
- Bassanezi RB, Montesino LH and Stuchi ES. 2009. Effects of Huanglongbing on Fruit Quality of Sweet Orange Cultivars in Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 125:565-572.
- Bassanezi RB, Montesino LH, Godoy GMC, Filho AB and Amorin L. 2011. Yield Loss Caused by Huanglongbing in Different Sweet Orange Cultivars in Sao Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130:577-586.
- Bové MJ. 2006. Huanglongbing: a Destructive, Newly-Emerging, Century-Old Disease of Citrus. *Journal of Plant Pathology* 88:7-37.
- Brlansky HR, Dewdney EMM, Rogers M and Chung RK. 2009. Florida Citrus Pest Management Guide: Huanglongbing (Citrus Greening). Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. USA. 3p.
- Cristóbal AJ, Mora AG, Manzanilla LRH, Marbán MN, Sánchez GP, Cid del Prado VI and Evans K. 2006. Epidemiology and integrated control of *Nacobbus aberrans* on tomato in Mexico. *Nematology* 8:727-737.
- Da Graca JV. 1991. Citrus greening disease. *Annu. Rev. Phytopathol* 29: 109-136.
- Davies FS and Albrigo LG. 1994. Citrus. Wallingford: CAB International. 254p.
- DGSV-CNRF. (Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria). 2008. Protocolo de Diagnóstico de *Candidatus Liberibacter* spp. mediante la Técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. DGSV. 17p.
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Flores-Sánchez JL y López-Arroyo JI. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8):769-782.
- Gottwald TR, Da Graça JV and Bassanezi RB. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Grafton-Cardwell EE, Stelinski LL, Stansly PA. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Ann. Rev. Entomol* 58:413-432.
- Halbert SE and Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllid (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87: 330-53.
- Hall DG, Richardson ML, Ammar E-D and Halbert SE. 2013. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomol. Exp. App.* 146: 207-223.
- Helrich K. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists: 2. Food composition; additives; natural contaminants. 15th Edition. AOAC: Arlington. 865-1298 pp.
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative Real-Time PCR for Detection and Identification of *Candidatus Liberibacter* Species Associated with Citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66:104-115.
- Li W, Li D, Twieg E, Hartung JS and Levy L. 2008. Optimized Quantification of Unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. In Host Plants Using Real-Time PCR. *Plant Disease* 92:854-861.
- Mora-Aguilera G, Robles-González P, López-Arroyo JI, Velázquez-Monreal JJ, Flores-Sánchez JL, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S y González-Gómez R. 2013. Situación Actual y Perspectivas de Manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(Suplemento) S6:S12.
- Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ, Manzanilla-Ramírez MA, Orozco-Santos M, Medina-Urrutia V, López-Arroyo JI y Flores-Virgen R. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) y su Dispersión en el Estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19: 15-31.
- Salcedo BDR, Hinojosa G, Mora AG, Covarrubias GI, DePaolis F, Cintora GC y Mora FS. 2010. Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Cítrica Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. 141 p.
- Teixeira DC, Saillard CC, Couture EC, Martins NA, Wulff S, Jagoueix E, Yamamoto APT, Ayres J and Bové MJ. 2008. Distribution and Quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, Agent of Huanglongbing Disease of Citrus in São Paulo State, Brasil, in Leaves of an Affected Sweet Orange Tree as Determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22:139-150.
- Trujillo AJ. 2010. Situación Actual, Regulación y Manejo del HLB en México. In: *Memorias del 2º Taller Internacional del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los cítricos*. Mérida, Yucatan, México p. 141-149.