

SÍNTOMAS DEL HUANGLONGBING (HLB) EN ÁRBOLES DE LIMÓN MEXICANO [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] Y SU DISPERSIÓN EN EL ESTADO DE COLIMA, MÉXICO

M. Manuel Robles-González^{1*}; José Joaquín Velázquez-Monreal¹;
Miguel Ángel Manzanilla-Ramírez¹; Mario Orozco-Santos¹;
Víctor Manuel Medina-Urrutia³; J. Isabel López-Arroyo²; Rigoberto Flores-Virgen⁴

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias,
Campo Experimental Tecomán. Apartado Postal 88. Tecomán, Colima, MÉXICO. C. P. 28100.

Correo-e: robles.manuel@inifap.gob.mx (*Autor para correspondencia)

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias,
Campo Experimental General Terán. km 31 Carretera Montemorelos-China Col. Exhacienda las Anacuas.
General Terán, Nuevo León, MÉXICO. C. P. 67413.

³Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
km 15 Carretera Guadalajara-Nogales. Zapopan, Jalisco, MÉXICO. C. P. 44150.

⁴Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Colima. Colima, Colima. MÉXICO.

RESUMEN

El trabajo se desarrolló en huertas de limón Mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] en Colima, México, que fueron afectadas por el Huanglongbing (HLB). Tuvo como objetivo caracterizar los síntomas de la enfermedad en el árbol, conocer su efecto sobre el rendimiento y algunas características físicas de la fruta, así como determinar su dispersión dentro de un huerto y cuantificar los huertos afectados por HLB. Los resultados muestran que en este cítrico los brotes vegetativos nuevos crecen vigorosos y con aspecto saludable, a pesar de que emerjan de ramillas sintomáticas. Los primeros síntomas aparecen como pequeños puntos amarillentos en las hojas cuando los brotes tienen entre 45 y 60 días de edad. Después de los 60 o 70 días se puede apreciar el moteado difuso asimétrico, característico del HLB. Este daño se apreció tanto en árboles resguardados dentro de una casa de malla antiáfidos, así como en los que estuvieron a cielo abierto. Se registró fuerte reducción en el rendimiento, asociado con la proporción de la copa afectada por la enfermedad. En ramas sintomáticas la fruta tuvo menor tamaño, pero no se detectaron frutos deformes, con maduración invertida o incremento del número de semillas abortadas. En un huerto sin control del vector, en un sólo año se detectó la enfermedad en el 53 % de los árboles. Este es el primer reporte sobre los síntomas de la enfermedad del HLB en limón mexicano y sus efectos en el rendimiento y la calidad de la fruta. El HLB ya ha sido detectado en todo el estado de Colima.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Candidatus Liberibacter*, dispersión, mancha moteada, rendimiento, características de fruta.

HUANGLONGBING (HLB) DISEASE IN MEXICAN LIME TREES [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] AND ITS DISPERSION IN COLIMA STATE, MEXICO

ABSTRACT

This work was carried out in orchards of Mexican lime [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] affected by Huanglongbing (HLB) disease and located in the state of Colima, Mexico. The objectives of this work were to characterize the symptoms of the disease in the trees, to evaluate the effect of HLB on the yield and other physical characteristics of the fruit, to determine its dispersion within an orchard and quantify the total orchards affected by HLB. Results showed that in this citrus species, the new vegetative shoots grow strong and healthy looking despite having emerged from symptomatic branches. The symptoms start as small yellowish spots on the leaves when the shoots are 45 to 60 days old. And they show the asymmetric diffuse mottling characteristic of HLB disease when they are 60 to 70 days old. This damage was observed in trees located inside of a structure covered with anti-aphid mesh and also in unprotected trees in the field. There was a significant yield reduction proportional to the percentage of canopy affected by the disease. In HLB symptomatic branches of diseased trees, the fruit was smaller but no misshapen fruits, inverted ripeness or an increase in the number of aborted seeds were detected. In an orchard without HLB vector control, the disease was detected in 53 % of the trees in only one year. HLB is widely spread throughout Colima state. This is the first report on HLB disease symptoms in Mexican lime and their effects on yield and fruit quality.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Candidatus Liberibacter*, dispersion, blotchy mottle, yield, fruit characteristics.

INTRODUCCIÓN

En la región costera del Pacífico de México se cultivan 79,456 ha con limón mexicano, distribuidas principalmente en los estados de Michoacán, Colima, Oaxaca y Guerrero. La producción anual de fruta es superior a 1.12 millones de toneladas, que alcanzan un valor estimado de 254 millones de dólares (Anónimo, 2011). La producción de esta fruta genera una gran cantidad de empleos para jornaleros y profesionales en el campo, los empaques, la industria, el transporte y la comercialización interna y de exportación. Además, existe un considerable número de viveros productores de plantas y de empresas proveedoras de insumos que se benefician con el cultivo de este cítrico.

La agroindustria del limón mexicano se encuentra seriamente amenazada por la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB), la cual se detectó por primera vez en México en julio de 2009 en árboles de limón Mexicano, en áreas urbanas de la península de Yucatán. Posteriormente se reportó en árboles de la misma especie en los estados de Nayarit y Jalisco (Trujillo, 2010a). En abril de 2010 se informó de la presencia de esta enfermedad en la región productora de limón mexicano de Tecmán, Colima (Trujillo, 2010b).

El HLB es la enfermedad más devastadora para los cítricos mundialmente (Halbert y Manjunath, 2004; Bové, 2006; Manjunath *et al.*, 2008). En la actualidad no se conoce cura para los árboles infectados con HLB (Gottwald *et al.*, 2007), los que en poco tiempo se vuelven decadentes e improductivos y finalmente mueren. Se ha reportado que el HLB causó la muerte de más de 63 millones de árboles, principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil (Halbert y Manjunath, 2004; Bové, 2006).

Los síntomas del HLB están asociados con la presencia de una alphaproteobacteria, del tipo Gram-negativa, la cual está restringida al floema de las plantas hospederas y que es conocida como *Candidatus Liberibacter*. Hoy en día se conocen tres especies de esta bacteria: 1) *Candidatus Liberibacter asiaticus*, que está ampliamente distribuida en plantaciones de cítricos en Asia, y recientemente en Brasil, Florida, México y El Caribe. 2) *Candidatus Liberibacter africanus*, especie registrada en algunas regiones citrícolas de África; y 3) *Candidatus Liberibacter americanus*, que fue detectada en Brasil y recientemente en Asia (Bové, 2006).

El género *Candidatus Liberibacter* se distribuye de manera heterogénea en el floema de la corteza, en la nervadura central de las hojas, en raíces, en diferentes partes florales y en frutos. Sin embargo, esta bacteria no se encontró en el endospermo y embriones de semillas procedentes de frutos infectados, aunque se registró alta concentración en el pedúnculo del fruto (Tatineni *et al.*, 2008).

INTRODUCTION

In the Pacific Coast region of Mexico there are 79,456 hectares of Mexican lime, mainly distributed in the states of Michoacán, Colima, Oaxaca, and Guerrero. Annual fruit production is higher than 1.12 million tons, reaching an estimated value of USD \$254 million (Anónimo, 2011). This fruit production creates a large number of jobs for laborers and professionals in the field, as well as in the packaging, industry, transportation, domestic marketing, and export areas. In addition, there are a considerable number of nurseries and supply companies which benefit from this citrus crop.

The Mexican lime agribusiness is seriously threatened by the disease known as Huanglongbing (HLB), which was first detected in Mexico in July 2009 in Mexican lime trees located in urban areas of the state of Yucatan. Later on, it was reported on trees of the same species in the states of Nayarit and Jalisco (Trujillo, 2010a). In April 2010 the presence of this disease was reported in the Mexican lime producing area of Tecoman County, in the state of Colima (Trujillo, 2010b).

HLB is the most devastating disease of citrus worldwide (Halbert and Manjunath, 2004; Bové, 2006; Manjunath *et al.*, 2008). Currently there is no known cure for HLB-infected trees (Gottwald *et al.*, 2007). Infected trees soon decay and become unproductive and eventually die. It has been reported that HLB has killed over 63 million trees, primarily in Asia, South Africa and Brazil (Halbert and Manjunath, 2004; Bové, 2006).

HLB citrus disease is associated with a Gram-negative alphaproteobacterium, which is restricted to the host plant phloem and is known as *Candidatus Liberibacter*. Currently, there are three known species of this bacterium: 1) *Candidatus Liberibacter asiaticus*, which is widely distributed in citrus orchards in Asia, and also was found in Brazil, Florida, Mexico, and the Caribbean countries. 2) *Candidatus Liberibacter africanus*, which is a species found in some citrus regions of Africa, and 3) *Candidatus Liberibacter americanus*, which was detected in Brazil and was also recently discovered in Asia (Bové, 2006).

The genus *Candidatus Liberibacter* is distributed unevenly in the phloem of the bark, the midrib of the leaves, the roots, and different parts of the flowers and fruits. However, this bacterium is not found in the endosperm and embryos of seeds from infected fruits, although high concentrations of the bacterium were found in the peduncle of the fruit (Tatineni *et al.*, 2008).

HLB affects phloem tissues (Folimonova *et al.*, 2010), causing serious problems for the translocation of assimilates in host plants (Bové, 2006). In citrus, HLB symptoms

El HLB afecta los tejidos del floema (Folimonova *et al.*, 2010), lo que causa fuertes problemas para la traslocación de asimilados en las plantas hospedadoras (Bové, 2006). En los cítricos, los síntomas se presentan en las hojas como manchas amarillentas con aspecto de moteado, así como el retraso del crecimiento de plantas en desarrollo, la producción de fruta deforme, pequeña y con pobre coloración, la que además puede desprenderse del árbol prematuramente (Bové, 2006; Sagaram *et al.*, 2009).

Los síntomas de HLB en hojas pueden confundirse con deficiencias nutricionales o incluso con el daño de plagas y otras enfermedades. No obstante, se presentan características únicas que los distingue (Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007). Al principio los árboles infectados desarrollan uno o más brotes con hojas amarillas, de ahí el nombre de la enfermedad del brote amarillo (Bové, 2006). Si otras ramas del árbol permanecen sanas o asintomáticas, los daños se manifiestan sectorizados.

No es sencillo recabar información experimental precisa de las pérdidas de rendimiento que causa la enfermedad HLB, debido a que normalmente los árboles sintomáticos se eliminan tan pronto como dan positivo a dicha enfermedad. Magomere *et al.* (2009) señalan que en los cítricos de Kenya, las ramas infectadas produjeron poco o nada de fruta comercial y que además se registraron pérdidas en rendimiento del 100 %.

Estimaciones recientes sobre el impacto potencial de la enfermedad en los cítricos de México, anticipan que el HLB puede causar una reducción en el rendimiento del limón mexicano que va de 20 hasta 48 % en los primeros tres años, dependiendo del nivel de intensidad del daño; mientras que en un escenario de daño severo por HLB en los cítricos del país, puede causar la pérdida de 4.0 millones de jornales frente a un impacto bajo, y hasta 19.3 millones para un impacto alto, lo cual provocaría un grave problema social en las regiones productoras (Salcedo *et al.*, 2010).

Los reportes sobre HLB en cítricos cultivados en el trópico son escasos. La mayoría de los estudios sobre éste se han realizado en regiones de clima subtropical y en otras especies de cítricos, como es el caso de Brasil (Teixeira *et al.*, 2005; Belasque *et al.*, 2010; Bassanezi *et al.*, 2011), Florida (Manjunath *et al.*, 2008; Folimonova *et al.*, 2009) y China (Bové, 2006), entre otros.

No se conocen reportes que describan los síntomas, la diseminación y los daños de esta enfermedad en limón mexicano. Este trabajo se enfocó a caracterizar los síntomas de la enfermedad en las hojas, conocer su efecto sobre el rendimiento y otras características físicas de la fruta, así como determinar la distribución espacial de árboles con sín-

appear as a yellowish mottling on the leaves, delayed growth in developing plants, and misshapen, small and poorly-colored fruit that also may fall prematurely from the tree (Bové, 2006; Sagaram *et al.*, 2009).

HLB symptoms on leaves can be mistaken as nutritional deficiencies or even pest damage and other diseases. However, they present some unique characteristics that distinguish them (Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007). At the beginning, an infected tree develops one or more shoots with yellow leaves, hence the name "yellow shoot disease" (Bové, 2006). A diseased tree may have both asymptomatic and symptomatic branches, so the symptom of HLB has a sectorized appearance on trees.

It is not easy to collect precise experimental data for yield losses caused by HLB disease, because symptomatic trees are usually removed as soon as they test positive for the disease. Magomere *et al.* (2009) reported that in Kenya, the infected branches of citrus trees produced little or no commercial fruit and 100 % yield losses were recorded.

Recent estimates of the potential impact of HLB on citrus in Mexico, predict that this disease can cause a yield reduction in Mexican lime from 20 to 48 % in the first three years, depending on the severity of the damage. While in a severe HLB damage scenario, 4 to 19.3 million work days could be lost, which would cause a serious social problem in the citrus-producing regions of the country (Salcedo *et al.*, 2010).

Reports on HLB in citrus grown in the tropics are scarce. Most studies have been conducted in sub-tropical regions, with other citrus species different from Mexican lime, such as Brazil (Teixeira *et al.*, 2005; Belasque *et al.*, 2010; Bassanezi *et al.*, 2011), Florida (Manjunath *et al.*, 2008; Folimonova *et al.*, 2009) and China (Bové, 2006).

Reports describing the symptoms, spread and damage of HLB in Mexican lime are unknown. The objectives of this work were to characterize HLB symptoms on leaves, to estimate the effect of the disease on the yield and other physical characteristics of the fruit, and to determine the spatial distribution of trees with HLB symptoms within an orchard and the number of orchards affected by the disease in the state of Colima.

MATERIALS AND METHODS

This research was carried out in Tecmán, Colima state (a Mexican lime-producing area), located in the Central Pacific Coast region of Mexico. The climate in the region is warm semi-dry with 26 °C average annual temperature and 700 mm annual precipitation. Experiments were

tomas del HLB dentro de un huerto y del número de huertos afectados por la enfermedad en el estado de Colima.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en la zona productora de limón mexicano de Tecmán, Colima, ubicada en la región costera del Pacífico Centro de México. El clima en la región es cálido semiseco con temperatura media anual de 26 °C y precipitación media anual de 750 mm. Se utilizó un predio de limón Mexicano, ubicado en el km 15 de la carretera Tecmán-Cerro de Ortega (18° 46' 44.02" LN 103° 49' 12.22" LO), cercano a la costa, donde se hizo la primera detección de la enfermedad en Colima.

Desarrollo del HLB en árboles de limón mexicano

Se construyó una casa de malla antiáfidos (16 x 10 hilos por pulgada) de 2,500 m² y una altura de 3.5 m, con el fin mantener dentro de ella árboles de limón mexicano infectados con HLB y de esa forma estudiar de manera controlada la evolución de la enfermedad. Se implementó un programa de control del psílido asiático mediante la aplicación alternada de insecticidas sistémicos (cloronicotinilos), de contacto (organofosforados y piretroides) y aceites parafínicos, con el fin de evitar la presencia del psílido y reducir la posibilidad de transmisión del HLB al resto de árboles tanto en el interior como el exterior del recinto. De abril a septiembre de 2010, se hicieron observaciones periódicas del desarrollo y evolución de la enfermedad sobre la copa de los árboles detectados como sintomáticos. Se estimó el porcentaje de la copa que presentaba ramas con síntomas de HLB. Para ello se tomaron en cuenta todos los sectores sintomáticos individuales de cada uno de los árboles.

Síntomas del HLB en hojas

Para estudiar el tiempo de aparición y la evolución de los síntomas en las hojas de limón mexicano, en sectores con síntomas de HLB de cuatro árboles sintomáticos se eligieron y marcaron: a) ocho brotes vegetativos terminales tiernos, emergidos de manera natural y b) ocho brotes vegetativos tiernos, inducidos mediante despunte de ramillas. Los brotes vegetativos de ambos tratamientos se revisaron a intervalos de 15 días para registrar y caracterizar los síntomas de la enfermedad, hasta que las hojas alcanzaron la madurez. Este trabajo se repitió tres veces en tres periodos: el primero de junio a julio de 2010, el segundo de noviembre a diciembre 2010 y el tercero de junio a julio de 2011. Los datos del porcentaje de brotes que mostraron los síntomas de la enfermedad para cada una de la fechas, se analizaron conjuntamente en un diseño en Bloques al Azar mediante el paquete estadístico Statistix 9.0 (Anónimo, 2008).

carried out in a Mexican lime orchard near the coast, where the disease was first reported in Colima state. This orchard is located at km 15 of the Tecmán-Cerro de Ortega highway and at 18° 46' 44.02" NL and 103° 49' 12.22" WL.

HLB development in Mexican lime trees

In order to have a controlled study of the evolution of HLB disease, infected lime trees were kept within an anti-aphid mesh (16 x 10 threads/inch) structure (2,500 m² and 3.5 m height). In order to avoid the presence of the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) and thereby reduce the possibility of HLB transmission to other trees inside and outside the enclosure, a psyllid control program was implemented. This program consisted of alternate applications of systemic insecticides (chloronicotinyls), contact insecticides (organophosphates and pyrethroids) and paraffinic oils. From April to September 2010, regular observations of the development and evolution of the disease in the canopy of the symptomatic trees were made. The percentage of the canopy of the trees with HLB symptomatic branches was estimated. For these estimates, all individual symptomatic sectors of each tree were taken into account.

HLB symptoms on leaves

In order to study the time of occurrence and progression of HLB symptoms on Mexican lime leaves, in symptomatic sectors of four diseased trees, the following were selected and labeled: a) eight tender terminal vegetative shoots, which naturally emerged and b) eight tender vegetative shoots, induced by tipping symptomatic twigs. The vegetative shoots of both treatments were inspected at 15-day intervals in order to record and characterize the disease symptoms until leaves reached maturity. This work was repeated three times in three different periods: the first in June-July 2010, the second in November-December 2010 and the third in June-July 2011. The data on the percentage of shoots that showed HLB symptoms for each period were analyzed together in a randomized block design using Statistix 9.0 software (Anónimo, 2008).

HLB effect on yield

In order to relate the degree of HLB damage with yield, the trees confined in the anti-aphid mesh structure were grouped into five categories or treatments according to the degree of their canopies presenting symptoms of the disease (T1: asymptomatic, T2: 10-25, T3: 25-50, T4: 50-75, T5: 75-100 % of the tree canopy showing symptoms). By September 2010, 2, 16, 11, 7 and 4 trees were identified for each category, respectively. Fruit yield data (kg·tree⁻¹) were recorded in the last two harvests of the 2010 season.

Efecto del HLB sobre el rendimiento

Para relacionar el grado de afectación por HLB con el rendimiento, los árboles confinados en la estructura de malla antiáfidos se agruparon en cinco categorías o tratamientos de acuerdo a la proporción de su copa que presentaba los síntomas de la enfermedad (T1: asintomáticos, T2: 10 a 25, T3: 25 a 50, T4: 50 a 75, T5: 75 a 100 % de copa mostrando síntomas). En septiembre de 2010 se identificaron 2, 16, 11, 7 y 4 árboles respectivamente para cada categoría. Se registraron datos de rendimiento de fruta (kg·árbol⁻¹) en las dos últimas cosechas de la temporada de 2010.

En agosto de 2011, en otro huerto cercano donde había árboles afectados por el HLB que presentaban porcentajes variables de su copa, se muestrearon 35, 19, 13, 3 y 2 árboles respectivamente para cada una de las categorías arriba mencionadas. Se les cuantificó el número de frutos a madurez de corte por metro cuadrado de copa, al momento del muestreo. Para ello se utilizó un aro de 0.75 m² de superficie, dividido en cuadrantes. El aro se colocó frente al árbol a 1.5 m de altura y en los cuatro puntos cardinales. Se registró el número de frutos que se observaron a través del área de dicho aro. Con esos datos se calculó el número de frutos·m⁻². Los datos tanto de (kg·árbol⁻¹) registrado en árboles de la casa de malla en el 2010, como el número de frutos·m⁻² de copa en el 2011, se graficaron para observar su relación con el grado de afectación de la copa por el HLB.

Efecto del HLB sobre características físicas de la fruta

Para conocer el efecto del HLB sobre características de la fruta, de árboles sin síntomas de la enfermedad (sanos 100 %), de árboles con una proporción de 80 a 100 % de la copa enferma y de árboles cuya copa tuviera aproximadamente 50 % sin síntomas, se tomaron muestras de fruta de la parte sana (enfermo rama sana) y de la parte con síntomas (enfermo rama con HLB). El muestreo se repitió siete veces durante los meses de julio y agosto de 2011. En cada muestreo se tomaron 30 frutos a madurez de corte por cada cinco árboles en cada tratamiento. La fruta se analizó en laboratorio donde se le determinó peso, diámetro ecuatorial y polar, grosor de cáscara, número de semillas bien desarrolladas y número de semillas abortadas. También se hicieron determinaciones de porcentaje de jugo (peso muestra·peso jugo⁻¹), acidez titulable (% ácido cítrico) de acuerdo con los métodos descritos por la A.O.A.C. (Anónimo, 1990), aceite esencial, sólidos solubles (°BRIX) y ácido ascórbico determinado por el método de Tillman y reportando los datos como mg de ácido ascórbico·100 mL⁻¹ de jugo. Los datos se analizaron en un diseño de bloques completos al azar con el programa estadístico Statistix 9.0 (Anónimo, 2008).

In August 2011, in another nearby orchard where there were trees that had varying percentages of canopy affected by HLB, 35, 19, 13, 3 and 2 trees were sampled, respectively, for each of the categories listed above. The number of mature fruits (green fruits before yellowing) that were close to harvest time was estimated. For this purpose we used a ring of 0.75 m², divided into quadrants. The ring was placed in front of the tree at 1.5 m in height in the four cardinal points. The number of fruits observed throughout the area of the ring was recorded. With these data the number of fruits·m⁻² was calculated. Data from trees inside the anti-aphid mesh structure (kg·tree⁻¹) in 2010, and from the number of fruits·tree canopy m⁻² in 2011, were plotted to study their relation to the degree of tree canopy HLB damage.

HLB effect on physical fruit characteristics

In order to know the effect of HLB on fruit characteristics, samples were taken from: a) trees without disease symptoms (healthy trees), b) trees with 80 to 100 % of the canopy showing HLB symptoms (diseased trees), and c) trees whose canopy was approximately 50 % without symptoms. Fruits were sampled from the symptomless part of these trees (healthy branch on diseased tree), and also from the symptomatic part (diseased branch on diseased tree). The sampling was repeated seven times during the months of July and August 2011. In each sampling, 30 mature fruits were taken from five trees in each of the treatments. The fruit was analyzed in a laboratory for weight, equatorial and polar diameter, peel thickness, number of well-developed seeds and number of aborted seeds. Determinations were also made for juice percentage (sample weight·juice weight⁻¹), titratable acidity (% citric acid) according to AOAC methods (Anónimo, 1990), essential oil, degrees Brix and ascorbic acid determined by Tillman's method and data were reported as ascorbic acid mg·100 juice mL⁻¹. Data were analyzed in a randomized complete block design by using Statistix 9.0 software (Anónimo, 2008).

Emergence dynamics of symptomatic trees in an orchard affected by HLB

To determine the spread of the disease within a HLB affected orchard, a 10-ha section of the plantation where the first five trees showing HLB symptoms were detected in April 7, 2010 was selected. In this section there were 2,909 four-year-old Mexican lime trees, grafted on macrophylla lemon (*C. macrophylla* Wester) and spaced 8 x 4 m apart. Starting in April, visual inspections were made monthly to detect trees with HLB symptoms. The number of trees and their location within the orchard were recorded. The information was used to generate scatter plots and calculate the monthly and cumulative percentage of trees that showed characteristic symptoms of the disease.

Dinámica de aparición de árboles sintomáticos en un huerto afectado por HLB

Para determinar la dispersión de la enfermedad dentro de un huerto afectado por la enfermedad, se seleccionaron 10 ha del predio donde el 7 de abril de 2010 se detectaron los primeros cinco árboles con síntomas de HLB. Esta fracción del predio estaba plantada con 2,909 árboles de limón mexicano de cuatro años de edad, injertados sobre limón macrofila (*C. macrophylla* Wester) y establecidos a distancias de 8 x 4 m. A partir de abril, cada mes se realizaron inspecciones visuales para detectar árboles con síntomas del HLB. Se registró el número de árboles y su ubicación dentro del huerto. Con esa información se generaron gráficos de dispersión y se calculó el porcentaje mensual y acumulado de árboles que fueron presentando síntomas característicos de la enfermedad.

Detección de huertos con árboles sintomáticos

Para conocer la distribución de la enfermedad en el estado de Colima, el personal técnico del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Colima (CESAVECOL) realizó muestreos de abril del 2010 a abril del 2011 para detectar árboles con HLB y determinar el número de huertos y la distribución de la enfermedad. El muestreo dentro del huerto consistió en una revisión de los árboles comenzando en una orilla y avanzando hacia el interior del huerto. Tan pronto como se encontraron algunos árboles con síntomas de moteado asimétrico difuso en el follaje, el monitoreo se suspendió y el predio se consideró como infectado. El diagnóstico fue confirmado mediante la técnica de PCR tiempo real (qPCR).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo del HLB en los árboles de limón mexicano

Los primeros cinco árboles con síntomas de HLB y que además fueron confirmados como positivos mediante qPCR, se localizaron el 7 de abril de 2010 en un predio cercano a la playa, en el municipio de Tecmán, Colima. Estos árboles estaban ubicados junto a un dren y muy cerca del camino. Para esa fecha los árboles afectados por la enfermedad presentaban uno o dos sectores pequeños, no mayores a 1.0 m² de su copa, con apariencia clorótica, debido a que varias de sus ramillas tenían hojas con manchas amarillentas, con moteado asimétrico características del HLB (Figura 1a). Se observaron hojas con síntomas de la enfermedad en tramos de ramas que tenían entre 8 y 10 mm de diámetro y de 100 a 120 cm de longitud. Estas ramas presentaban hojas sintomáticas en toda su extensión, excepto en el brote vegetativo terminal. Los tramos de rama más gruesos y de mayor edad que presentaron síntomas de HLB, pudieron haberse desarrollado de seis a ocho meses antes, lo que sugiere que los síntomas es-

Detection of orchards with symptomatic trees

In order to determine the distribution of HLB in Colima state, the technical staff of the Colima State Committee of Plant Health (CESAVECOL) carried out samplings from April 2010 to April 2011 to identify trees with HLB and determine the number of citrus orchards infected and the distribution of the disease. Sampling each orchard consisted of inspecting the trees at one end and then moving inside the orchard. As soon as trees with asymmetric diffuse mottling symptoms on foliage were found, monitoring was discontinued and the site was considered HLB infected. The diagnosis was confirmed by real-time PCR technique (qPCR).

RESULTS AND DISCUSSION

HLB development in Mexican lime trees

The first five trees showing HLB symptoms and that were confirmed as positive by the qPCR technique were found on April 7, 2010 in an area near the beach in Tecmán, Colima. These trees were located near a drain and very close to the road. By that time the trees affected by the disease showed one or two small areas, no more than 1 m² of the canopy, with chlorotic appearance, because several of their twigs had leaves with yellow spots and asymmetric mottling, characteristic of HLB disease (Figure 1a). Leaves with disease symptoms were observed in branch sections having between 8 and 10 mm in diameter and 100 to 120 cm in length. These branches had symptomatic leaves throughout their length, except in the terminal vegetative shoot. The HLB symptoms on the thicker and older branch sections may have evolved from six to eight months before, suggesting that symptoms were present in this orchard four to five months before detection.

In July 2010, when the anti-aphid mesh structure that would confine the HLB affected trees was finished, already 15 of the 46 trees showed symptoms of the disease in some areas of their canopies. In the next three to four months, the number of affected trees was increased, as well as the number and size of these symptomatic sectors in the trees. By August, 43 of the 46 trees had at least a branch with symptomatic leaves and by September all trees had HLB symptoms. This shows that before closing the anti-aphid mesh structure, all the trees had been infected but remained asymptomatic. This is consistent with results reported by Bassanezi *et al.* (2010) indicating that when a tree with HLB symptoms is detected, already there may be from 2 to 56 trees that are infected but remain asymptomatic. This becomes more serious if there is no vector control action on the plantation, as was the case with the study site.

As previously described by Bové (2006) for other citrus species, HLB symptoms appeared by sections on the Mexican lime trees (Figure 1b). Trees with different degrees of damage were observed, which was estimated based on the

tuvieron presentes en este predio de cuatro a cinco meses antes de su detección.

En el mes de julio de 2010, al terminar de construir la estructura de malla antiáfidos que resguardaría los árboles afectados por el HLB, 15 de los 46 árboles presentaba síntomas de la enfermedad en algunos sectores de su copa. En los siguientes tres a cuatro meses, el número de árboles afectados se incrementó, así como el número y tamaño de los sectores sintomáticos en esos árboles. Para el mes de agosto, 43 de los 46 árboles presentaba al menos una

proportion of the canopy showing disease symptoms. Also trees with a few vegetative shoots showing the characteristic HLB asymmetric mottled leaves and trees with symptomatic shoots covering virtually 100 % of the canopy were detected. The difference in the degree of damage between trees was mainly due to the time from initial infection to the quantification date and to the number of HLB symptomatic sections developed in these trees.

It is important to mention that trees continued to have constant vegetative growth despite their HLB symptoms in



FIGURA 1. Síntomas del HLB en limón mexicano. A) Síntomas en ramas de un sector afectado; B) Árbol mostrando sectores de su copa con síntomas y C) evolución de los síntomas en las hojas.

FIGURE 1. HLB symptoms in Mexican lime. A) In branches of one infected section of the tree; B) Canopy sections with HLB symptoms, and C) Evolution of leaf symptoms.

ramilla con hojas sintomáticas y en septiembre todos los árboles presentaron brotes con síntomas de HLB. Lo anterior demuestra que antes de cerrar la estructura antiáfidos, todos los árboles ya habían sido infectados, pero permanecían asintomáticos. Lo que concuerda con lo señalado por (Bassanezi *et al.*, 2010) que señalan que cuando se detecta un árbol con síntomas del HLB, puede haber de 2 a 56 árboles que fueron infectados pero que permanecen asintomáticos. Esto se vuelve más grave si además no se tiene ninguna acción de control del vector en ese predio, como fue el caso del sitio de estudio.

Tal como lo describe Bové (2006) para otros cítricos, en el limón mexicano la enfermedad se presentó de manera sectorizada en los árboles (Figura 1b). Se pudo observar árboles con diferente grado de afectación, lo cual se estimó con base en la proporción de copa que mostraba síntomas de la enfermedad. También se detectaron árboles que presentaban pocos brotes vegetativos con hojas expresando el moteado asimétrico, característico del HLB, hasta aquellos árboles en que los brotes sintomáticos cubrían prácticamente el 100 % de su copa. La diferencia en el grado de afectación entre los árboles se debió principalmente al tiempo transcurrido desde la infección inicial hasta la fecha de su cuantificación y al número de sectores sintomáticos que desarrollaron estos árboles.

Es importante señalar que, no obstante que los árboles presentaron síntomas en prácticamente toda su copa, siguieron teniendo brotación vegetativa constante. El tamaño y coloración de los nuevos brotes vegetativos fue similar a lo observado en árboles asintomáticos.

Después de aproximadamente seis meses desde que se detectó la enfermedad, esta huerta dejó de recibir el manejo adecuado de nutrición, por lo que los árboles enfermos que permanecieron a cielo abierto expresaron efectos más acentuados de la enfermedad, que los descritos para los árboles confinados dentro de la casa de malla antiáfidos. En los árboles que crecieron al aire libre, los sectores afectados con HLB, presentaron defoliación y en consecuencia su follaje fue menos abundante. Las pocas hojas que permanecieron en las ramas presentaron color amarillento. El tamaño de los brotes vegetativos y de las hojas que se desarrollaron en ramas enfermas fue ligeramente menor (20 %) comparado con los brotes desarrollados en los sectores asintomáticos del mismo árbol.

En este predio los árboles eran relativamente jóvenes (menores de 4 años) y tenían brotación vegetativa constante, pero habían iniciado la etapa de alta producción de fruta. En esta propiedad el control biológico de las plagas se interrumpió y el escaso uso de insecticidas y el pobre control del psílido asiático, permitió la presencia de poblaciones relativamente altas de adultos y ninfas de este insecto. Esto creó condiciones favorables para la rápida

virtualmente all their canopies. The size and color of the new vegetative shoots was similar to that observed in asymptomatic trees.

About six months after the disease was detected, this orchard stopped receiving adequate nutrition management, so infected trees that remained in the open showed more pronounced effects of the disease than those inside the anti-aphid mesh structure. Defoliation was observed in HLB infected sections of the trees grown outdoors; therefore, they had less abundant foliage and the few remaining leaves on the branches showed yellow coloring. The size of vegetative shoots and leaves developed in diseased branches was slightly lower (20 %) compared with shoots developed in asymptomatic sections of the same tree.

In this orchard the trees were relatively young (four years old) and they had constant vegetative growth, but they had entered the stage of high fruit production. Biological pest control was being conducted at the orchard and, consequently, there was little use of insecticides and poor Asian citrus psyllid control, allowing high populations of adults and nymphs of this insect. This created favorable conditions for the disease to spread quickly within the orchard, and also multiple infections of HLB occurred in different parts of the same tree. The latter also quickly led to symptom expression in most of the affected canopies. This coincides with Bassanezi *et al.* (2011) who reported that in an endemic situation or without an effective vector control, disease progression in an orchard and the increase in the severity of symptoms in the canopies are very fast.

In contrast, in another orchard with trees of the same age and located in the same area but with better psyllid control, the frequency of trees with HLB symptoms and the proportion of the canopy that was affected by the disease were much lower. In this case, the probability of secondary infections and, consequently, multiple infections in the same tree was significantly reduced. This confirms that the proportion of the canopy affected by HLB increases rapidly as a result of multiple infections, due to high infective psyllid populations present in the orchard, rather than systemic distribution of the bacterium in the trees.

HLB symptoms on leaves

Trees diagnosed as positive for HLB showed mature vegetative shoots whose leaves had yellowish spots with a mottling pattern and asymmetrical distribution typical of this disease. The immature vegetative shoots that originated in symptomatic branches showed a vigorous appearance, green coloration and absence of HLB symptoms or nutritional deficiencies.

Previous results of the vegetative shoots studied in some way confirm the prior observations. As shown in Ta-

diseminación de la enfermedad dentro del huerto y además que ocurrieran múltiples infecciones del HLB en distintas partes de un mismo árbol. Esto propició que en poco tiempo se observaran síntomas en prácticamente toda la copa de los árboles afectados. Lo anterior coincide con lo señalado por Bassanezi *et al.* (2011) quienes señalan que en una situación endémica o sin un efectivo control del vector, la progresión de la enfermedad en el huerto y el incremento en la severidad de los síntomas en la copa del árbol, son muy rápidos.

En contraste, en otro huerto con árboles de la misma edad, ubicado en la misma zona, pero con mejor control del psílido, tanto la frecuencia de árboles con síntomas de HLB como la proporción afectada de su copa por la enfermedad, resultó mucho menor. En este caso, la probabilidad de infecciones secundarias y en consecuencia de infecciones múltiples en un mismo árbol se redujo significativamente. Esto confirma que la proporción de copa afectada por HLB se incrementó rápidamente como consecuencia de las infecciones múltiples, debidas a las altas poblaciones de psílicos infectivos presentes en el predio, más que por la distribución sistémica de la bacteria en los árboles.

Síntomas del HLB en hojas

Los árboles diagnosticados positivos para HLB presentaron brotes vegetativos maduros cuyas hojas tenían manchas amarillentas a manera de moteado y con distribución asimétrica, típicas de esta enfermedad, los brotes vegetativos inmaduros, a pesar de haberse originado en ramas sintomáticas, presentaron aspecto vigoroso, coloración verde y ausencia de síntomas del HLB o de deficiencias nutrimentales.

ble 1, the vegetative shoots that grow from branches with HLB symptoms have a vigorous appearance (from emergence until they complete their development and reach maturity), show no HLB symptoms and have a light green color very similar to the vegetative shoots of the same age from healthy trees. However, when shoots reached between 45-60 days of age, the leaves began to develop small yellowish spots distributed throughout the leaf. Then a few days later, when the vegetative shoots were between 60-70 days old, those small spots evolved to form diffuse mottling with uneven distribution on the leaf (Figure 1c). The spots that formed this mottling generally did not pass to the other side of the leaf midrib, which produced the typical asymmetrical distribution and that characterizes this disease and differentiates it from nutritional deficiency symptoms as noted by Gottwald *et al.* (2007).

When vegetative shoots were 90 days old, the yellow spots (in almost all the leaves) grew until the characteristic green color of this species disappeared. Later on, small green spots were observed on a yellowish surface and leaves were senile, so in many cases they suffered premature abscission on their articulation with the petiole, so that the affected section had lower foliage density.

Similar results were observed for vegetative shoots that were induced by pruning twigs with HLB symptoms. This shows that regardless of the method to induce new vegetative shoots, they grow strong and healthy looking, but as they mature, the HLB symptoms will develop. This behavior differs from that described for other citrus species such as oranges, in which besides the mottled symptoms on mature leaves, the terminal vegetative shoots show chlorotic or yellow appearance regardless of their age (Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007).

CUADRO 1. Frecuencia (%)^z de brotes vegetativos emergidos de manera natural o inducidos mediante poda, que presentan hojas con síntomas del HLB.

TABLE 1. Frequency (%)^z of vegetative shoots (emerged naturally or induced by pruning) showing leaves with HLB symptoms.

Tipo de brote / Shoot type	Edad del brote vegetativo (Días) / Vegetative shoot age (days)		
	45	60	75
Emergido natural	1.7 a	97.22 a	1.04 a
Naturally emerged			
Inducido por poda	0.0 a	95.84 a	4.16 a
Pruning induced			

Promedios con letra distinta dentro de columnas, difieren de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

^zPromedios de tres experimentos

Averages with a different letter within columns differ according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

^zAverages of three experiments

Los resultados registrados de los brotes vegetativos estudiados de alguna forma corrobora la observación anterior. Como lo muestran los datos en el Cuadro 1, los brotes vegetativos que crecen a partir de ramas con síntomas de HLB, desde que emergen hasta que completan su desarrollo y alcanzan su madurez, presentan aspecto vigoroso, sin síntomas del HLB y su color es verde claro, muy similar a lo observado en brotes vegetativos de la misma edad, desarrollados en árboles sanos. Sin embargo, cuando los brotes alcanzaron entre 45 y 60 días de edad, las hojas empezaron a desarrollar pequeños puntos de color amarillento, distribuidos en toda la lámina foliar. Unos días después, cuando los brotes vegetativos tenían entre 60 a 70 días, esas pequeñas manchas evolucionaron hasta formar un moteado difuso con distribución irregular en la hoja (Figura 1c). Las manchas que formaron este moteado generalmente no pasaron al otro lado de la vena central, lo que le dio la característica de distribución asimétrica, que caracteriza esta enfermedad y la distingue de síntomas de deficiencias nutricionales como lo señalan Gottwald *et al.* (2007).

Cuando los brotes vegetativos tuvieron 90 días de edad, las manchas amarillentas en la mayoría de las hojas crecieron hasta que prácticamente desapareció el color verde característico de la especie. Posteriormente se apreciaron pequeñas manchas verdes sobre una superficie amarillenta y las hojas fueron seniles, por lo que en muchos casos sufrieron abscisión prematura al nivel de su articulación con el peciolo, por lo que el sector afectado tuvo menor densidad de follaje.

Un resultado similar se observó para los brotes vegetativos que fueron inducidos mediante poda en las ramillas con síntomas de HLB. Lo anterior demuestra que independientemente de cómo se promueva la emisión de los brotes vegetativos nuevos, éstos crecerán con aspecto vigoroso y sano, pero al madurar, desarrollarán los síntomas del HLB. Este comportamiento difiere a lo descrito para otras especies de cítricos como las naranjas en las que además de los síntomas de moteado en hojas maduras, los brotes vegetativos terminales presentan aspecto clorótico o amarillo, independientemente de su edad (Bové, 2006; Gottwald *et al.*, 2007).

Efecto del HLB sobre el rendimiento

Rendimiento en árboles confinados

Se hicieron dos cosechas de los árboles confinados en la casa de malla antiáfidos. De cada árbol se colectó la fruta tanto de sectores con síntomas como sectores asintomáticos. Con los valores de rendimiento acumulado, se calcularon los promedios para cada uno de los cinco grupos de árboles que se conformaron con base en el porcentaje de copa que tenía afectada por el HLB. Como se puede apreciar en la Figura 2a, los rendimientos en estos árboles mostraron una tendencia clara a decrecer en

HLB effect on yield

Yield in confined trees

Two harvests from trees in the anti-aphid mesh structure were done. The fruit was collected from symptomatic and asymptomatic sections of each tree. With the cumulative yield values, the averages for each of the five groups of trees (that were formed based on the canopy percentage affected by HLB) were calculated. As shown in Figure 2a, the yield from these trees showed a clear tendency to decrease in terms of the canopy proportion that was affected by the disease. While asymptomatic trees had an average of 57 kg of fruit per tree, the averages were lower in HLB infected trees, reaching only 23 kg in trees with over 75 % of the canopy with disease symptoms. For the next year, all trees were symptomatic and most of them had HLB-affected canopy percentages above 50 % and the yields did not exceed 30 kg·tree⁻¹·yr⁻¹.

Yield in outdoor trees

The number of fruits that had a maturity close to harvest time per square meter was estimated for trees that remained in the open and were affected by HLB disease. With this information, the average for each group of trees was calculated. Although in this case, the number of fruits·m⁻² remained very similar between the trees that were asymptomatic and those with 10 to 50 % of the canopy affected by HLB, a strong yield reduction was observed in trees with symptoms in more than 50 % of their canopy (Figure 2b).

Magomere *et al.* (2009) reported that it is difficult to obtain an accurate assessment of yield losses caused by HLB disease, but infected branches produce little or no commercial fruits. In this study the whole trees were sampled, whether their branches were affected by the disease or not. Although no data were recorded for specific symptomatic sectors, Figure 2 shows that trees with the highest number of HLB affected branches produced less fruit. According to these observations, it is clear that when the proportion of the canopy area with HLB symptoms increases, the ability to produce fruit is reduced. It also shows that if the proportion of canopy area affected by the disease exceeds 50 %, then the yield reduction can be significant and can strongly affect the profitability of the orchards.

HLB effect on physical fruit characteristics

HLB affected some physical fruit characteristics. The fruits harvested from apparently healthy trees and from branches without HLB symptoms in symptomatic trees showed the highest values in size and weight. In contrast, the fruits from symptomatic sections or branches in trees with more than 50 % of their canopies affected by HLB had the lowest size and weight values (Table 2). The same table also shows that the fruit harvested from branches

función de la proporción de su copa que fue afectada por la enfermedad, mientras que los árboles asintomáticos alcanzaron un promedio de 57 kg por árbol. Los promedios fueron menores en árboles afectados por HLB, hasta llegar a sólo 23 kg en los árboles que tenían más de 75 % de su copa expresando síntomas de la enfermedad. Para el siguiente año, todos los árboles fueron sintomáticos y la mayoría presentaron porcentajes de copa afectada por HLB superiores al 50 % y sus rendimientos no superaron los 30 kg·árbol⁻¹·año⁻¹.

Rendimiento en árboles a cielo abierto

Por su parte, a los árboles que permanecieron a cielo abierto y que estuvieron afectados por HLB, se les cuantificó el número de frutos a madurez de corte por metro cuadrado. Con esta información, se calcularon los promedios para cada grupo de árboles. Aunque en este caso, el número de frutos·m⁻² se mantuvo muy similar entre los árboles asintomáticos y los que tuvieron desde 10 hasta 50 % de copa afectada por el HLB, observándose una fuerte reducción del rendimiento en los árboles que presentaban síntomas en más del 50 % de su copa (Figura 2b).

Magomere *et al.* (2009) señalan que es difícil obtener una evaluación exacta de las pérdidas de rendimiento por la enfermedad HLB en cítricos, pero que las ramas infectadas producen poco o nada de frutos comerciales. En este estudio se muestrearon los árboles completos, independientemente de que las ramas estuvieran afectadas o

without HLB symptoms, in diseased trees, had similar size to those fruits harvested from asymptomatic trees. This result agrees with a report for a group of orange varieties in which asymptomatic fruits, harvested from branches with HLB symptomatic leaves, had lower size and weight values (Bassanezi *et al.*, 2009). This was also observed by Baldwin *et al.* (2010) in orange trees with HLB disease in Florida. This shows that HLB reduces fruit size but only on symptomatic sections of the trees (Bassanezi *et al.*, 2011), and this is probably due to the fact that in these tree parts, the leaves have large chlorotic spots and therefore photosynthetic activity has been reduced and in some cases they present some degree of defoliation.

HLB did not affect other fruit variables such as peel thickness or number of seeds in Mexican lime. There was also no relationship of the disease with the content of aborted seeds. It also had no effect on juice percentage, acidity, and degrees Brix. However, HLB reduced ascorbic acid content (data not shown). Conversely, the results obtained by Bassanezi *et al.* (2009) suggest that HLB significantly reduced juice content and total soluble solids (TSS) in orange, but acidity was increased.

Although slight deformation and deflection from the central axis or columella could be detected in some Mexican lime fruits, this characteristic was observed in both HLB symptomatic and healthy trees from orchards without presence of the disease and therefore it was not considered a symptom related to HLB disease in this citrus species.

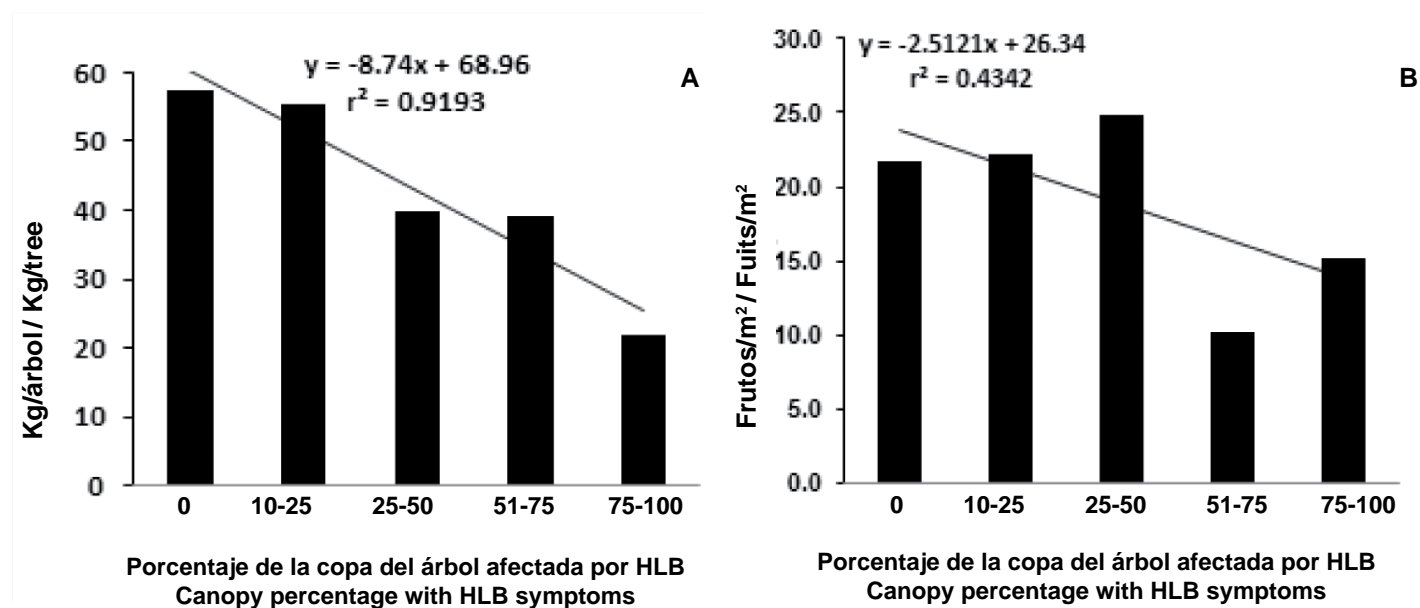


FIGURA 2. Efecto del HLB sobre la capacidad de producción de fruta en árboles de limón mexicano. a) kg por árbol en árboles confinados en la casa de malla antiafidos y b) Número de frutos·m⁻² de copa en árboles cultivados al aire libre.

FIGURE 2. Effect of HLB on Mexican lime tree production. a) kg per tree in trees confined inside the anti-aphid mesh structure, b) Number of fruits·crown m⁻² in unprotected trees grown in the field.

CUADRO 2. Tamaño, peso y contenido de semillas en fruta colectada de ramas con y sin síntomas, en árboles afectados por HLB y árboles asintomáticos.**TABLE 2. Size, weight and seed content in Mexican lime fruit collected from branches with and without HLB symptoms in both diseased and asymptomatic trees.**

TRATAMIENTOS / TREATMENTS	Peso de fruta (gr) / Fruit Weight (g)	Diámetro ecuatorial (cm) / Equatorial diameter (cm)	Diámetro polar (cm) / Polar diameter (cm)	Semillas desarrolladas (no) / Developed seeds (No)	Semillas abortadas (no) / Aborted seeds (No)
Sano 100 % / Healthy tree	43.8 a	4.2 a	4.8 a	5.38 ab	0.84 a
Enfermo rama sana / Healthy branch on diseased tree	40.4 ab	4.1 ab	4.7 ab	4.83 b	1.04 a
Enfermo rama HLB / Diseased branch on diseased tree	38.4 b	4.0 b	4.5 b	4.87 b	0.70 a
Enfermos 100% / Diseased tree	37.2 b	4.0 b	4.5 b	6.19 a	1.28 a

Cifras con la misma letra dentro de columnas no difieren de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

Figures with the same letter within columns do not differ according to the Tukey test at $P \leq 0.05$

no por la enfermedad. Aunque no se registraron datos de manera específica en sectores sintomáticos la indica que los árboles con mayor cantidad de ramas afectadas por HLB tuvieron menor cantidad de fruta. De acuerdo a estas observaciones, es claro que al incrementarse la proporción del área de copa con síntomas de HLB en el árbol se reduce la capacidad para producir fruta. También se aprecia que cuando la proporción de copa afectada por la enfermedad supera el 50 %, la reducción en el rendimiento puede ser importante y puede afectar fuertemente la rentabilidad de las huertas.

Efecto del HLB sobre características físicas de la fruta

El HLB afectó algunas características físicas de la fruta. Los frutos cosechados en árboles aparentemente sanos, como de ramas sin síntomas en árboles sintomáticos, presentaron los valores más altos en tamaño y peso. En contraste, los frutos provenientes de sectores o ramas sintomáticas en árboles que tenían entre 50 y 80 % de su copa afectada por HLB tuvieron el menor tamaño y peso (Cuadro 2). En el mismo cuadro también se puede observar que la fruta cosechada de ramas sin síntomas, en árboles sintomáticos, tuvieron un tamaño similar al obtenido por la fruta cosechada de árboles asintomáticos. Este resultado coincide con lo señalado por Bassanezi *et al.* (2009) para un grupo de variedades de naranja y en el que la fruta sin síntomas, cosechada de ramas con hojas sintomáticas,

The results obtained in this study show that the damage caused by HLB in the foliage of Mexican lime trees, even with 100 % HLB damage in the canopies, has not affected fruit shape and other characteristics such as juice percentage, acidity and degrees Brix, like in other regions and for other citrus species (Bové, 2006; Bassanezi *et al.*, 2009; 2011; Baldwin *et al.*, 2010). However, it does affect fruit size, but further studies and observations are necessary to accurately define the effects of this disease on the fruit quality in this citrus species.

Emergence dynamics of symptomatic trees in an orchard affected by HLB

The first five trees showing symptoms of HLB in the orchard under study, detected in April 2010, correspond to the initial infection, according to Bassanezi (2010). They were located near a drain and close to the road. In the following months, there was a rapid spread of the disease among the trees in this orchard. The percentage of trees with HLB reached cumulative values of 1.0, 5.5, 15.0 and 29.2 % for the months of May, June, July and August, respectively. By December 2010 the proportion of symptomatic trees in this orchard reached 42.0 % and after a year it was 53.4 % (Figure 3).

As shown in Figure 4a, the first five trees that tested HLB positive were located relatively close together forming an initial aggregate. However, beginning with the July sam-

tuvo menor tamaño y peso. Esto también fue observado por Baldwin *et al.* (2010) en árboles de naranja afectados por el HLB en Florida.

Lo anterior demuestra que la enfermedad reduce el tamaño de la fruta, solamente en los sectores sintomáticos (Bassanezi *et al.*, 2011) y probablemente se debe a que en estas partes del árbol las hojas tienen grandes manchas cloróticas y en consecuencia se ha reducido su actividad fotosintética y en algunos casos además presentan algún grado de defoliación.

La enfermedad no afectó otras variables como grosor de cáscara o el número de semillas. Tampoco se observó relación de la enfermedad con el contenido de semillas abortadas. La enfermedad no afectó el porcentaje de jugo, la acidez, contenido de ácido ascórbico ni los °Brix. (Datos no presentados). Contrariamente, los resultados obtenidos por Bassanezi *et al.* (2009) en naranjas indican que la enfermedad redujo significativamente el contenido de jugo y el total de sólidos solubles (TSS), pero incrementó la acidez.

Aunque en limón mexicano se pudo detectar algunos frutos con ligera deformación y desviación del eje central o columnela, esta característica se observó tanto en árboles sintomáticos como en árboles sanos de huertos sin presencia de la enfermedad, por lo que no se considera un síntoma relacionado con el HLB.

pling, besides increasing the size of that first aggregate, new ones were detected located at varying distances from the initial aggregate. It also shows that the distribution of trees with HLB symptoms within this orchard has a shift towards the southeast, influenced by the direction of winds coming from the ocean (Figure 4b).

By December 2010, both the initial aggregate as well as the secondary aggregates had grown so much that they began to come together and form a large patch of symptomatic trees. Also at that time, small areas formed by healthy trees were present in the orchard (Figure 4c). By May 2011, these healthy trees areas practically disappeared on the southeast side of the orchard (Figure 4d). In general the spread of the disease within the orchard was very fast and showed a dispersion pattern similar to that observed previously in Brazil (Bassanezi, 2010) and in Florida (Irey, 2010).

This is explained because in the Mexican lime orchard under study, the trees were relatively young (only four years old) and by that time they had constant and abundant vegetative flow. This favors the proliferation of *Diaphorina citri*. In addition, in April, when the first screening was done, there was a high incidence of infested shoots with nymphs and adults of this insect, due to poor pest control in this plantation.

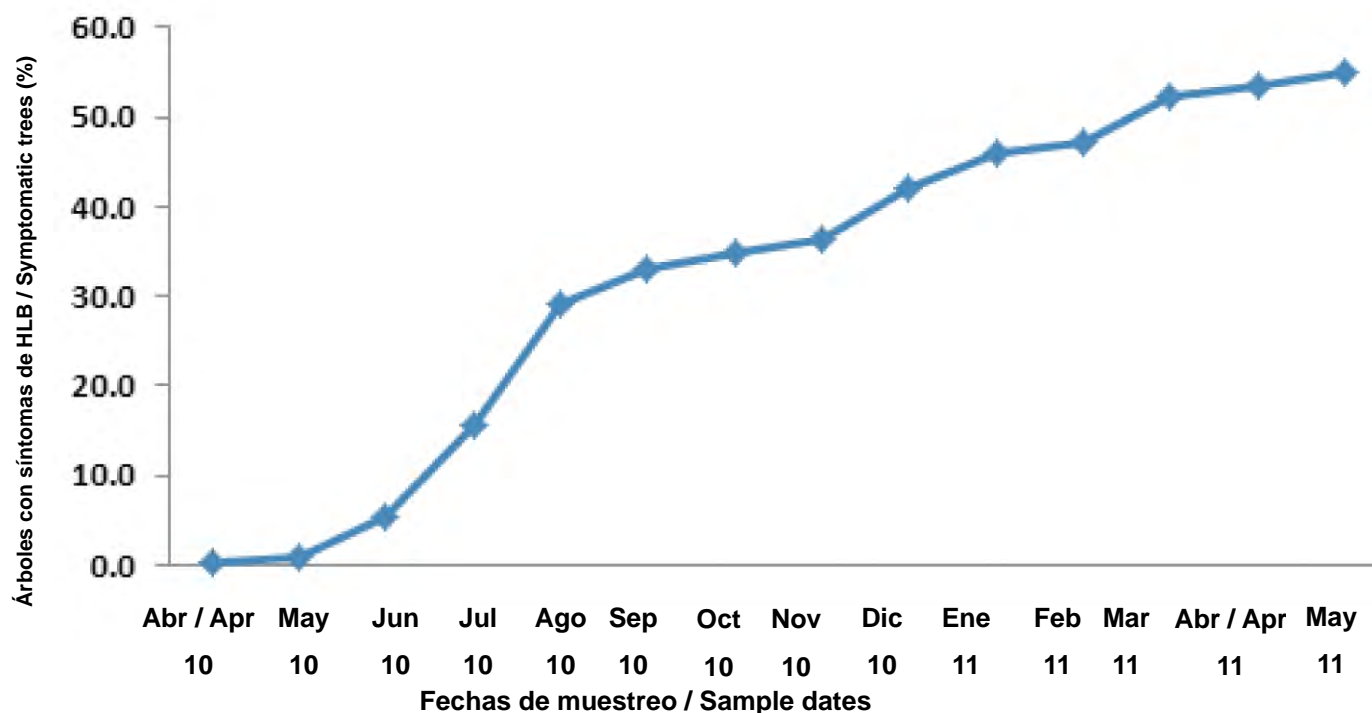


FIGURA 3. Porcentaje acumulado de árboles mostrando síntomas de HLB en un huerto de limón mexicano en Tecoman, Colima.

FIGURE 3. Cumulative percentage of trees showing HLB symptoms in a Mexican lime orchard in Tecoman, Colima, Mexico.

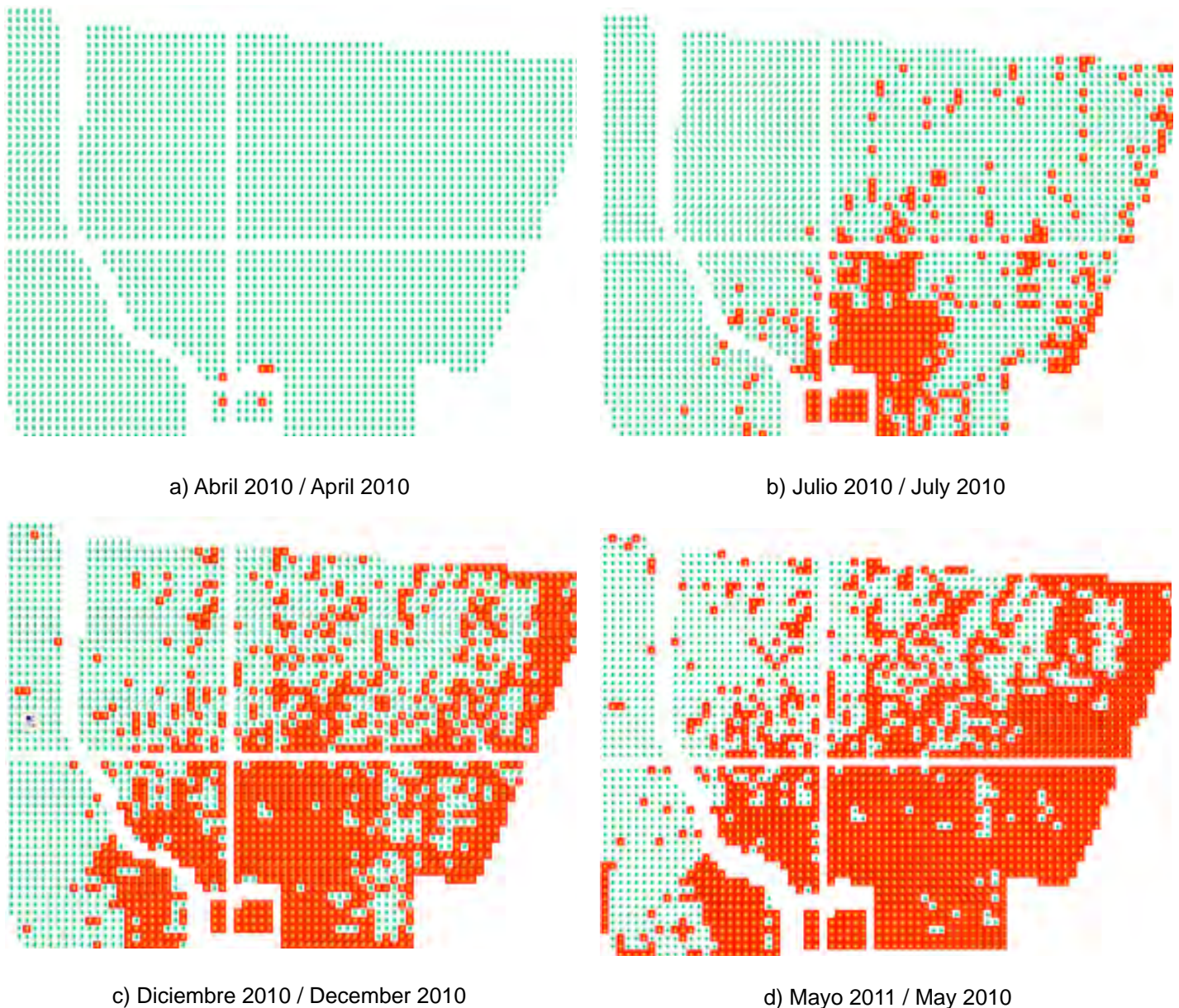


FIGURA 4. Distribución de los árboles con síntomas del HLB, observada durante un año después de la primera detección en un huerto de limón mexicano.

FIGURE 4. Distribution of trees with HLB symptoms observed over a year after the first detection in a Mexican lime orchard.

Los resultados obtenidos en este trabajo señalan que los daños causados por el HLB en el follaje de los árboles de limón mexicano, aun con niveles de afectación del 100 % de su copa, no han afectado la forma de la fruta, y otras características como porcentaje de jugo, acidez y °Brix, como ha sido reportado en otras regiones y para otras especies de cítricos Bové, 2006; Bassanezi *et al.*, 2009; Bassanezi *et al.*, 2011; Baldwin *et al.*, 2010. Sin embargo, sí tiene efecto el tamaño. No obstante, se requiere de más tiempo de in-

It is clear that the spread of HLB within this orchard was caused by the Asian citrus psyllid, as evidenced by the first aggregate formed from the initial focus of infection and subsequently by other foci that developed secondarily. According to Bové (2006), in China it took five years for HLB in an orchard without psyllid control to infect 100 % of the trees. In the orchard under study, in only a one-year period more than 50 % of the trees showed HLB symptoms and if this trend continues, it is estimated that 100 % of the trees

vestigación y mayor cantidad de observaciones para definir con precisión los efectos de esta enfermedad en la calidad de la fruta en esta especie cítrica.

Dinámica de aparición de árboles sintomáticos en un huerto afectado por HLB

Los primeros cinco árboles que mostraron síntomas de la enfermedad en el huerto bajo estudio, a la infección inicial, Bassanezi (2010) fueron detectados junto a un dren y muy cerca de la orilla que linda con un camino. En los meses siguientes se observó una rápida diseminación de la enfermedad entre los árboles de este huerto. Los porcentajes de árboles con HLB alcanzaron valores acumulados de 1.0, 5.5, 15.0 y 29.2 % para los meses de mayo, junio, julio y agosto, respectivamente. Para diciembre de 2010 la proporción de árboles sintomáticos en este huerto alcanzó el 42.0 % y al término de un año alcanzó el 53.4 % (Figura 3).

Como se muestra en la Figura 4a, los primeros cinco árboles positivos al HLB se localizaron relativamente juntos formando un agregado o foco inicial. Sin embargo, a partir del muestreo de julio, además de aumentar el tamaño de ese primer agregado, las nuevas detecciones formaron otros, que se localizaron a distancias variables a partir del foco inicial. También se aprecia que la distribución de árboles con síntomas de HLB dentro de este huerto muestra una distribución hacia el sureste, influida por la dirección de los vientos proveniente del océano (Figura 4b).

Para diciembre de 2010, tanto el agregado inicial como los agregados secundarios habían crecido tanto que empezaron a juntarse y a formar una gran mancha de árboles sintomáticos. Para ese tiempo se comenzaron a definir pequeñas áreas formadas por árboles sanos (Figura 4c). Para el mes de mayo de 2011 estas aéreas con árboles sanos prácticamente desaparecieron en el lado sureste del huerto (Figura 4d).

En términos generales la diseminación de la enfermedad en el huerto ha sido muy rápida y presenta un patrón de dispersión similar con lo reportado en Brasil (Bassanezi, 2010) y en Florida (Irey, 2010).

Lo anterior se explica debido a que en el predio bajo estudio, los árboles eran relativamente jóvenes, con sólo cuatro años de edad y que para esas fechas presentaban constantes y abundantes flujos vegetativos. Esto favorece la proliferación de *Diaphorina citri*. Además, en el mes de abril, cuando se hizo la primera detección, se observó una alta incidencia de brotes infestados con ninfas como adultos de este insecto, debido a un escaso control de plagas en esta plantación.

Resulta evidente que la diseminación del HLB en este huerto fue ocasionada por el psílido asiático, como lo de-

will be symptomatic in a shorter period than that indicated by Bové (2006).

Detection of orchards with symptomatic trees

The first Mexican lime orchard having trees with HLB symptoms, confirmed as positive by qPCR, was found on April 7, 2010. By August 2010, several orchards with symptomatic trees were already detected in areas planted with Mexican lime in the state of Colima.

Since September 2010, CESAVECOL has issued a weekly report with cumulative data on the number of inspected orchards and orchards detected with symptomatic trees. According to this information, in the period from April 2010 to December 2011, 164, 359 trees with HLB symptoms had been already detected. These infected trees were located in 1,062 commercial Mexican lime plantations, which are distributed in different growing areas of the state of Colima. This means that by that time almost a third of the orchards in this state had been diagnosed with HLB diseased trees.

CONCLUSIONS

HLB disease is widely distributed in the state of Colima and symptomatic trees were detected in all Mexican lime producing areas, from orchards located along the coast to plantations located close to 400 m above sea level.

The spread of HLB disease within and among the orchards in the region has been very fast, due to the presence of high populations of the Asian citrus psyllid and because the sources of HLB inoculum were not removed.

HLB disease was observed by sections in the canopy of Mexican lime trees. The number of sectors with disease symptoms are increased in trees with poor vector management.

In Mexican lime trees with HLB the new vegetative shoots, emerged from symptomatic twigs, grow with a vigorous and healthy appearance; however, when mature the leaves present the asymmetrical mottling that is characteristic of this disease.

Yield reduction only occurs in HLB affected branches and when the number of vegetative shoots with symptoms in a tree covers more than 75 % of the canopy area, then yield reductions can be up to 50 %.

Fruits grown in HLB-affected branches show a slightly smaller size than those grown in asymptomatic branches. But after two years of observations, no symptoms of twisted fruits, inverted ripening or seed abortion associated with HLB disease have been detected.

muestra el primer agregado que se formó a partir del primer foco de infección y posteriormente por los otros focos que se desarrollaron de manera secundaria. De acuerdo con Bové (2006), en China un huerto sin control del psílido tardó cinco años en alcanzar el 100 % de los árboles infectados. En el predio bajo estudio, tan solo en el periodo de un año se han detectado más de 50 % de los árboles presentando síntomas del HLB y de continuar esa tendencia, se estima que el 100 % de los árboles estarán sintomáticos en un periodo menor al señalado por Bové (2006).

Detección de huertos con árboles sintomáticos

El primer huerto presentando árboles con síntomas de HLB el 7 de abril de 2010 fue confirmado como positivo mediante qPCR. Para el mes de agosto de 2010 ya se habían detectado varios huertos con árboles sintomáticos a lo largo y ancho de la superficie plantada con limón mexicano en el estado.

A partir de septiembre el CESAVECOL emitió un reporte semanal con datos acumulados del número de huertos explorados y huertos donde se detectaron árboles sintomáticos. De acuerdo con esta información, en el periodo de abril de 2010 a diciembre de 2011 ya se habían detectado 164,359 árboles con síntomas atribuibles al HLB, los cuales se localizaron en 1,062 plantaciones comerciales de limón mexicano, mismas que están distribuidas en distintas zonas productoras en el estado. Lo que significa que para esa fecha prácticamente una tercera parte de las huertas ya se habían diagnosticado con árboles afectados por HLB.

CONCLUSIONES

La enfermedad del HLB está ampliamente distribuida en el estado de Colima y se han detectado árboles sintomáticos en todas las zonas productoras de limón mexicano desde las plantaciones ubicadas en la franja costera hasta plantaciones situadas cerca de los 400 m de altitud.

La diseminación de la enfermedad dentro del huerto y huertos en la región ha sido muy rápida, debido a la presencia de poblaciones altas del psílido asiático, y a que no se eliminaron oportunamente los focos de infección.

La enfermedad del HLB se presentó de manera sectorizada en la copa de los árboles de limón mexicano. El número de sectores con síntomas de la enfermedad en cada árbol se incrementó en árboles con pobre manejo del vector.

Los brotes vegetativos nuevos, emergidos de ramillas sintomáticas, crecen con apariencia vigorosa y sana, sin embargo, cuando alcanzan su madurez se presenta el moteado simétrico característico del HLB.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Produce Foundation Colima, AC., to FONSEC-SAGARPA-CONACYT and FORDECYT funds, for the financial support to carry out this study.

End of English Version

La reducción de rendimiento sólo se presenta en las ramas afectadas por HLB y cuando la cantidad de brotes vegetativos con síntomas en un árbol cubren más del 75 % de la superficie de la copa, la reducción llega a ser hasta del 50 %.

La fruta que se produce en ramas afectadas por HLB, tiene un tamaño ligeramente menor que la que se genera en ramas asintomáticas. No obstante, después de dos años de observaciones no se han detectado síntomas de torcedura de frutos, maduración invertida o aborto de semillas, asociados al HLB.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Produce Colima, AC., al FONSEC-SAGARPA-CONACYT y al fondo FORDECYT, por el apoyo económico para la realización de este estudio.

LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO. 1990. Official Methods of Analysis. Fruits and fruits products. Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C). 13th ed. Washington, D. C. 1023 p.
- ANÓNIMO. 2008. Statistix 9.0 Analytical Software. Borland International. Tallahassee Florida. USA. <http://www.statistix.com/>
- ANÓNIMO, 2011. Producción agrícola: Cíclicos y perenes 2011. Limón agrio (mexicano). SAGARPA-SIAP. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. (Fecha de consulta 20 de febrero 2010).
- BALDWIN, E.; PLOTTO, A.; MANTHEY, J.; MCCOLLUM, G.; BAI, J.; IREY, M.; CAMERON, R.; LUZIO, G. 2010. Effect of Liberibacter Infection (Huanglongbing Disease) of Citrus on Orange Fruit Physiology and Fruit/Fruit Juice Quality: Chemical and Physical Analyses. J. Agric. Food Chem. 58: 1247-1262.

- BASSANEZI R. B.; MONTESINO, L. H.; STUCHI, E. S. 2009. Effects of huanglongbing on fruit quality of sweet orange cultivars in Brazil. *Eur J Plant Pathol* 125: 565-572.
- BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GODOY GASPAROTO, M. C.; FILHO A. B.; AMORIM L. 2011. Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130(4): 577-586.
- BASSANEZI, R. B. 2010. Epidemiology of huanglongbing and its implications on disease management. Ponencias del 2° Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos. Dirección General de Sanidad Vegetal. SAGARPA. Mérida, Yucatán, México. 30 de julio. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=18380>
- BELASQUE J. JR.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE, A. R.; TANK, A. JR.; DI GIORGI F.; TERSI F. E. A.; MENEZES G. M.; DRAGONE J.; JANK R. H. JR.; BOVÉ J. M. 2010. Lessons from huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 92(2): 285-302.
- BOVÉ, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88(1): 7-37.
- FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GARNSEY, S. M.; GOWDA, S.; DAWSON W. O. 2009. Examination of the Responses of Different Genotypes of Citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) Under Different Conditions. *Phytopathology* 99(12): 1346-1354.
- FOLIMONOVA, S. Y.; D. S. ACHOR. 2010. Early Events of Citrus Greening (Huanglongbing) Disease Development at the Ultrastructural Level. *Phytopathology*, 100(9): 949-958.
- GOTTWALD, T. R.; DA GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01- RV.
- HALBERT, S. E; MANJUNATH, K. L. 2004. Asian citrus psyllids (*Sternorrhyncha*: *Psyllidae*) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Fla. Entomol.* 87(3): 330-353.
- MAGOMERE, T. O.; OBUKOSIA, S. D.; MUTITU, E.; NGICHABE, C.; OLUBAYO, F.; SHIBAIRO, S. 2009. Molecular characterization of 'Candidatus *Liberibacter*' species/strains causing huanglongbing disease of citrus in Kenya. *Electronic Journal of Biotechnology* 12(2).
- MANJUNATH, K. L., HALBERT, S. E.; RAMADUGU, C.; WEBB, S.; LEE, R. F. 2008. Detection of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and Its Importance in the Management of Citrus Huanglongbing in Florida. *The American Phytopathological Society* 98(4): 387-396.
- SAGARAM, U. S.; DEANGELIS, K. M.; TRIVEDI, P.; ANDERSEN, G. L.; LU, S. E.; WANG, N. 2009. Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected Citrus, Using PhyloChip Arrays and 16S rRNA Gene Clone Library Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 1566-1574.
- SALCEDO D.; HINOJOSA, R.; MORA, G.; COVARRUBIAS, I.; DE PAOLIS, F.; CINTORA, C.; MORA, S. 2010. Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana. IICA. 144 paginas
- TATINENI, S.; SAGARAM, U. S.; GOWDA, S.; ROBERTSON, C. J.; DAWSON, W. O.; IWANAMI, T.; WANG, N. 2008. In plant distribution of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and realtime PCR. *Phytopathology* 98:592-599.
- TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; DE JESUS, W. C JR.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. 2005. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes* 19: 17-179.
- TRUJILLO-ARRIAGA, J. 2010a. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Oficio B00.01,01,01.03.-14859. Circular No. 056. 02 de diciembre de 2009.
- TRUJILLO-ARRIAGA, J. 2010b. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Oficio B00.01,01,01.03.-02788. Circular No. 056. 16 de abril de 2010.