

Progress and spatial pattern of huanglongbing in Persian lime in Nayarit, Mexico

Progreso y patrón espacial del huanglongbing en limón Persa en Nayarit, México

Márquez-Pérez, F. J.¹, Flores-Sánchez, J. L.², Rodríguez Mejía, L.¹, Márquez Gómez, J.³, Michereff, S. J.⁴, Ancona, V.⁵, Robles-Bermúdez, A.⁶, Domínguez-Monge, S.^{2*}

¹Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, 56230 Texcoco, Estado de México, México.

²Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad, 56230 Texcoco, Estado de México, México.

³Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Nayarit, 63000 Tepic, Nayarit, México.

⁴Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brasil.

⁵Texas A&M University-Kingsville Citrus Center, 78599 Weslaco, TX, USA.

⁶Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura, 63155 Xalisco, Nayarit, México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Márquez-Pérez, F. J., Flores-Sánchez, J. L., Rodríguez Mejía, L., Márquez Gómez, J., Michereff, S. J., Ancona, V., Robles-Bermúdez, A., Domínguez-Monge, S. (2018). Progress and spatial pattern of huanglongbing in Persian lime in Nayarit, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 5(nesp1), e351. doi:<https://doi.org/10.15741/revbio.05.nesp.e351>



ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), causes severe losses to citrus (*Citrus* spp.) growers in Mexico since it was first detected in 2009. This study aimed at analyzing the temporal and spatial progression of the disease at four commercial orchards with HLB presence cultivated with Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) located in Xalisco, Nayarit, Mexico. The evaluation of the disease incidence was done by visual inspection of all trees for six months. The epidemics were fitted through the flexible model Weibull ($y = 1 - [t/b]^c$), with respect to initial incidence (y_0), final incidence (y_f), rate of disease progression (b^{-1}), and area under disease progress curve (AUDPC). The spatial pattern of the disease was analyzed by geostatistical maps, "ordinary runs" and fitting the beta-binomial distribution. The analysis of the progress

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 18th 2017.

Accepted/Aceptado: May 5th 2018.

Available on line/Publicado: October 11th 2018.

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB), ocasionado por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), causa pérdidas severas a los productores de cítricos (*Citrus* spp.) en México desde que se detectó por primera vez en 2009. Este estudio tuvo como objetivo analizar el progreso temporal y espacial de la enfermedad en cuatro huertos comerciales de limón Persa con presencia de HLB en Xalisco, Nayarit, México. La evaluación de la incidencia de la enfermedad se realizó mediante inspección visual de todos los árboles durante seis meses. Las epidemias fueron ajustadas con el modelo flexible de Weibull ($y = 1 - [t/b]^c$), con respecto a la incidencia inicial (y_0), incidencia final (y_f), tasa de progreso de la enfermedad (b^{-1}), y área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC). El arreglo espacial de la enfermedad fue analizado mediante mapas geoestadísticos interpolativos, "ordinary runs" y ajuste a la distribución beta-binomial. El análisis de las curvas de progreso de la enfermedad mostró que la epidemia fue más rápida en la huerta ED-2, asociado a una proporción de incidencia inicial mayor, árboles relativamente jóvenes (<3 años) y posiblemente a una mayor exposición

*Corresponding Author:

Domínguez Monge, Santiago, Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, C.P.56230 Texcoco, Estado de México, México. Phone: (595) 1101 657. E-mail: dominguez.santiago@colpos.mx

curves showed that the epidemic was faster in orchard ED-2, associated with a higher initial incidence proportion, relatively young trees (<3 years) and probably with increased exposure to asian psyllid. Disease incidence increased in all orchards ranging from 1.9 to 32.4 % during the evaluation period. The within rows aggregation increased along with the time and the increase in the disease incidence in EM-1, ED-2 and HM-3 orchards. In orchards IP-4 and HM-3, there was a slight predominance of aggregation within the rows while, in orchard EM-1 and ED-2 the across rows aggregation of diseased trees was prevalent.

KEY WORDS

Epidemiology, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus latifolia*, Sampling.

Introduction

Huanglongbing (HLB) is currently the most devastating disease of the citrus worldwide (Bové, 2006; Bassanezi *et al.*, 2013; Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2017). Currently, three species of *Candidatus Liberibacter* associated with HLB are known: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. africanus*, and *Ca. L. americanus*, (López, *et al.*, 2009; Gottwald, 2010; Santivañez, *et al.*, 2014). In Mexico, HLB is caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a) and transmitted by Asian citrus psyllid (ACP) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Libiidae) (Hall *et al.*, 2013; Torres-Pacheco *et al.*, 2013). The infected trees show Mottling on the leaves, deformed fruits, premature fruit fall and premature mortality in plants (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013). The losses in production are affected by 18 % in Persian lime and between 60 to 80 % in Mexican lime (Bassanezi *et al.*, 2011; Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2015), which represents a true threat for the Mexican citrus industry.

The temporal and spatial dynamics of HLB have been studied in different countries. For the HLB progress, models that describe the temporal increase of the incidence of HLB at orchard level have been fitted. These models indicate that incidence can reach more than 95 % in a period from three to thirteen years after the first appearing of the symptoms (Bassanezi *et al.*, 2006; Gatineu *et al.*, 2006; Gottwald *et al.*, 2007; Gottwald *et al.*, 2010). Also, it has been observed

al psílido asiático. La incidencia de la enfermedad aumentó en todas las huertas, variando entre 1.9 a 32.4 % durante el periodo de evaluación. La agregación dentro de los surcos aumentó con el tiempo e incremento de la incidencia de la enfermedad en las huertas EM-1, ED-2 y HM-3. En los huertos IP-4 y HM-3 hubo un ligero predominio de la agregación dentro de los surcos, mientras que en los huertos EM-1 y ED-2 predominó de manera marcada la agregación de árboles enfermos entre surcos.

PALABRAS CLAVE

Epidemiología, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Citrus latifolia*, Muestreo.

Introducción

El Huanglongbing (HLB) es actualmente la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial (Bové 2006; Bassanezi *et al.*, 2013; Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2017). Hoy en día se conocen tres especies de *Candidatus Liberibacter* asociadas con HLB: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. africanus*, y *Ca. L. americanus* (Lopes *et al.*, 2009; Gottwald 2010; Santivañez *et al.*, 2014). En México, el HLB es causado por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a) y transmitido por el psílido asiático de los cítricos (ACP) *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Libiidae) (Hall *et al.*, 2013; Torres-Pacheco *et al.*, 2013). Los árboles infectados presentan moteado en las hojas, frutos deformes, caída prematura de fruta y mortalidad prematura (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles-González *et al.*, 2013). Las pérdidas en producción se ven afectadas hasta en un 18 % en limón Persa y hasta 60-80 % en limón mexicano (Bassanezi *et al.*, 2011; Robles-González *et al.*, 2013; Flores-Sánchez *et al.*, 2015) lo que representa una verdadera amenaza para la industria mexicana de cítricos agrios.

Las dinámicas temporales y espaciales de HLB han sido estudiadas en diferentes países. Para el progreso de HLB se han ajustado modelos que describen el incremento temporal de la incidencia de HLB a nivel parcela. Estos modelos indican que la incidencia puede alcanzar hasta más del 95 % en 3 a 13 años después de la primera aparición de los síntomas (Bassanezi *et al.*, 2006; Gatineu *et al.*, 2006; Gottwald *et al.*, 2007; Gottwald *et al.*, 2010). Además, se ha observado que las áreas donde la enfermedad es endémica y hay abundante fuente de inculo,

that the areas in which the disease is endemic and there is an abundant source of inoculum, the disease's progress rates are faster in young plantations, even with the use of insecticides (Bassanezi *et al.*, 2013). About spatial patterns of HLB, in previous studies performed in China, Brasil and Florida, USA, it has been found that the adding of initial foci of infected trees with HB is associated with secondary focus to a distance from 25 to 50 meters (Gottwald *et al.*, 1991; Bassanezi *et al.*, 2005; Gottwald *et al.*, 2010).

Since CLas was detected for the first time in Yucatan in 2009 (Salcedo *et al.*, 2010; Trujillo-Arriaga, 2010), 24 citrus growing states have been confirmed with presence of infected trees by HLB (SENASICA, 2018). Despite widespread HLB, in most states of central Mexico and Gulf, where approximately 80 % of citrus is produced, HLB is regionally restricted to foci (Flores-Sánchez *et al.*, 2017). Therefore, epidemiologic studies should be reinforced in order to reduce the risk of introduction, establishment, and spread of CLas. To this effect, the study of the progress curve and the spatial pattern constitutes an important tool for the understanding of epidemic dynamics, revealing the way the disease disseminates and helping with the development of control programs (Madden *et al.*, 2007). Thus, this study aimed to analyze spatial and temporally the progress of Huanglongbing at orchard level, as well as determining the rates of incidence per orchard. This way, it is intended to understand the behavior of this disease and which factors contribute to its dispersion.

Materials and Methods

The study was carried out during the period from November, 2010, to February, 2011 in the municipality of Xalisco, Nayarit, Mexico. Four commercial orchards of Persian lime were randomly chosen with presence of HLB and little efficient control of psyllids (Table 1). The collecting of samplings of vegetal tissue for the molecular identification of CLas, as well as the recording of HLB data, were monthly done in all of the sites. In each orchard, a plot of 10 x 10 trees was chosen, consisting of $N_1 = 10$ rows and $N_2 = 10$ trees per row, to have a total population of 100 trees per orchard. The criteria to consider for the selection of the plots were: low number of missing trees, high number of visually healthy trees, and absence of defined foci of HLB (Pérez-Hernández) *et al.*, 2004). On each plot, the trees were inspected through

las tasas de progreso de la enfermedad son más rápidas en las plantaciones jóvenes, incluso con aplicación de insecticidas (Bassanezi *et al.*, 2013). Sobre patrones espaciales de HLB, en estudios previos realizados en China, Brasil y Florida, se ha encontrado que la agregación de focos iniciales de árboles infectados con HB está asociada con focos secundarios a una distancia de hasta 25 a 50 m (Gottwald *et al.*, 1991; Bassanezi *et al.*, 2005; Gottwald *et al.*, 2010).

Desde que CLas fue detectada por primera vez en Yucatán en el 2009 (Salcedo *et al.*, 2010; Trujillo-Arriaga, 2010), 24 estados productores de cítricos se han confirmado con presencia de árboles afectados por HLB (SENASICA, 2018). A pesar de esta amplia dispersión, en la mayoría de los estados del centro y Golfo de México, donde se produce ≈ 80 % de los cítricos, el HLB está restringido regionalmente a focos (Flores-Sánchez *et al.*, 2017). Por consiguiente, se deben reforzar estudios epidemiológicos para reducir el riesgo de introducción, establecimiento y dispersión de CLas. En este sentido, el estudio de la curva de progreso y del patrón espacial constituye una herramienta importante para el entendimiento de la dinámica de epidemias, revelando la forma de como la enfermedad se disemina y ayudando en el desarrollo de programas de control (Madden *et al.*, 2007). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue analizar espacial y temporalmente el progreso del huanglongbing a nivel parcelario, así como determinar las tasas de incidencia por huerto. De esta manera se pretende conocer el comportamiento de esta enfermedad y que factores influyen en su dispersión.

Materiales y Métodos

El estudio se llevó a cabo durante noviembre 2010 a febrero 2011 en el municipio de Xalisco, Nayarit, México. Se seleccionaron cuatro huertas comerciales de limón Persa de manera aleatoria con presencia de HLB y un control de psílidos poco eficiente (Tabla 1). La colecta de las muestras de tejido vegetal para la identificación molecular de CLas, así como el registro de datos de HLB, fueron realizados mensualmente en todos los sitios. En cada huerta, se eligió un bloque de 10 x 10 árboles, consistiendo de $N_1 = 10$ surcos y $N_2 = 10$ árboles por surco, para tener una población total de 100 árboles por huerto. Los criterios que se consideraron para la selección de los bloques fueron: bajo número

typical symptoms of HLB (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Leaf samples were taken from the symptomatic trees in order to confirm CLAs. Each sample was composed of for leaves collected from each cardinal point of the tree canopy. For the molecular analysis and diagnosis, the samples composed of vegetal tissue were analyzed in the lab of Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). DNA of vegetal tissue was isolated through the CTAB (cetyl tri-methylammonium bromide) method (Dellaporta *et al.*, 1983). CLAs detection was done through qPCR following the protocol described by Li *et al.*, (2006).

The disease epidemics were characterized using incidence per plot with the Weibull distribution model (Pennypacker *et al.*, 1980) modified at two parameters (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). This model ($y = 1 - [t/b]^c$) was chosen due to its flexibility; where "y" represents the proportion of the disease incidence, "t" is time in months, "b" is the epidemic rate parameter estimated to its inverse form (b^{-1}) and "c" is the curve shape parameter (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). The estimations of b and c were done using the nonderivative method DUD of PROC NLIN of SAS 9.0 (Jesus *et al.*, 2004). In each evaluation, the proportion of diseased plants was considered as the dependent variable, while as for the time passed in months after the first evaluation was

de árboles faltantes o ausentes, alto número de árboles visualmente sanos y ausencia de focos definidos de HLB (Pérez-Hernández *et al.*, 2004). En cada bloque, los árboles fueron inspeccionados mediante síntomas típicos del HLB (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). Se tomaron muestras de hojas de los árboles sintomáticos a HLB para confirmación de CLAs. Cada muestra se compuso de cuatro hojas colectadas de cada punto cardinal de la copa del árbol. Para el diagnóstico y análisis molecular, las muestras compuestas de tejido vegetal fueron analizadas en el laboratorio del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA. El DNA del tejido vegetal fue aislado con el método de CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) (Dellaporta *et al.*, 1983). La detección de CLAs fue realizada mediante qPCR siguiendo el protocolo descrito por Li *et al.*, (2006).

Las epidemias de la enfermedad se caracterizaron utilizando la incidencia por bloque con el modelo de distribución de Weibull (Pennypacker *et al.*, 1980) modificado a dos parámetros (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). Este modelo ($y = 1 - [t/b]^c$) fue seleccionado debido a su flexibilidad; donde "y" corresponde a la proporción de incidencia de la enfermedad, "t" al tiempo en meses, "b" es el parámetro de tasa estimado en su forma inversa (b^{-1}), y "c" al parámetro de la forma de la curva (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). Las estimaciones de b y c se realizaron con el método no derivativo DUD

Table 1.
Characteristics of the 4 orchards evaluated to determine the spatial and temporal progress in Xalisco, Nayarit, Mexico between 2010 and 2011.

Tabla 1.
Características de las 4 huertas evaluadas para determinar el progreso espacial y temporal en Xalisco, Nayarit, México entre 2010 y 2011.

Field	Trees Num.	Area (ha)	Spacing (m)	Age (years)	Trees + HLB ¹	Incidence (%) ²	Root-stock ³	Altitude (masl)	Latitude	Longitude
EM-1	267	1.5	5x5	7	10	3.75	SO	902	21.317	104.925
ED-2	105	0.5	5x5	2	8	7.62	Volka	1,032	21.331	104.916
HM-3	185	1.2	5x5	5	7	3.79	SO	1,053	21.243	104.920
IP-4	144	1	5x5	6	2	1.38	Volka	1,013	21.356	104.889

¹Number of initial positive trees. ²Percentage of initial incidence. ³Rootstock type: SO-Sour Orange; Volka-Volkameriana.

¹Numero inicial de arboles positivos. ²Porcentaje de incidencia inicial. ³Tipo de patrón: SO-Sour Orange; Volka-Volkameriana.

considered as the independent variable. The model fitted for each epidemic was determined through values of the coefficient of determination (R^2) between observed and expected values, and the existence or lack of patterns in the graphic of residuals versus expected values (Campbell and Madden, 1990). Additionally, AUDPC was calculated through original data of incidence (Madden et al., 2007).

The analysis of the spatial adjustment was monthly performed in each plot through interpolative geostatistic maps, *ordinary runs*, and *fitting the beta-binomial distribution* (Madden et al., 2007). To examine the spatial pattern using the frequencies to the beta-binomial distribution, the plots were divided in 25 quadrants with four trees in each one (2 furrows for every two trees).

The geostatistic maps were done considering the position of each tree (presence or absence of disease) in the plot with the program Surfer® 10 (Golden Software Inc., Golden, Colorado, USA, 2011).

The analysis of *ordinary runs*, allowed to define the existence of aggregation among adjacent symptomatic trees inside each row and between rows. A *run* (U) is described as a succession of one or more symptomatic or non-symptomatic trees. The expected number of *runs* $E(U)$ under the null hypothesis of randomness, is given for $E(U) = 1 + [2m(N-m)/N]$, where “ m ” is the number of trees with symptoms and “ N ” is the total numbers of trees per row or between rows. The standard deviation of U , under the null hypothesis, is given for $S(U) = \{[(2m(N-m))(2m(N-m)-N)]/(N^2(N-1))\}$. For determining the significance of the symptomatic trees aggregated, a normal test of Z was used, where $Z(U) = \{(U+0.5) - E(U)\}/S(U)$, when the values of Z are lower than -1.67 ($p = 0.05$), indicate a rejection of the null hypothesis (random arrangement) and the alternate hypothesis is accepted (aggregated arrangement) (Kranz, 1993). With the results obtained, the percentage of rows that showed aggregation between symptomatic trees inside each plot, was analyzed.

To examine the presence of aggregation in the quadrants, the data of the symptomatic trees frequency in the quadrants were used to adjust the beta-binomial distribution with the program BBD (Madden and Hughes, 1994). The analysis provides the standard normal value (Z) and the respective probability (P) for the test $C(\alpha)$, associated to the beta-binomial distribution, where the

del PROC NLIN de SAS 9.0 (Jesus et al., 2004). En cada evaluación, la proporción de plantas enfermas se consideró como la variable dependiente, mientras que el tiempo transcurrido en meses después de la primera evaluación se consideró como la variable independiente. El modelo ajustado para cada epidemia se determinó mediante los valores del coeficiente de determinación (R^2) entre los valores observados y esperados, y por la ausencia de patrones en las gráficas de valores predichos versus errores residuales (Campbell y Madden, 1990). Adicionalmente, se calculó el AUDPC mediante los datos originales de incidencia (Madden et al., 2007).

El análisis del arreglo espacial se realizó mensualmente en cada bloque a través de mapas geoestadísticos interpolativos, *ordinary runs*, y mediante el ajuste de la distribución beta-binomial (Madden et al., 2007). Para examinar la presencia de agregación espacial por el ajuste de las frecuencias a la distribución beta-binomial, los bloques fueron divididos en 25 cuadrantes con cuatro árboles cada uno (2 surcos x 2 árboles).

Los mapas geoestadísticos fueron realizados considerando la posición de cada árbol (presencia o ausencia de enfermedad) en el bloque con el programa Surfer® 10 (Golden Software Inc., Golden, Colorado, USA, 2011).

El análisis de *ordinary runs*, permitió definir la existencia de agregación entre árboles sintomáticos adyacentes dentro de cada surco y entre surcos. Un *run* (U) se describe como una sucesión de uno o más árboles sintomáticos o asintomáticos. El número esperado de *runs* $E(U)$ bajo la hipótesis nula de aleatoriedad es dada por $E(U) = 1 + [(2m(N-m)/N)]$, donde “ m ” es el número de árboles con síntomas y “ N ” el número total de árboles por surco o entre surcos. La desviación estándar de U , bajo la hipótesis nula, fue dada por $S(U) = \{[(2m(N-m))(2m(N-m)-N)]/(N^2(N-1))\}$. Para determinar la significancia de los árboles sintomáticos agregados, se utilizó una prueba normal de Z , donde $Z(U) = \{(U+0.5) - E(U)\}/S(U)$, cuando los valores de Z son menores a -1.67 ($p = 0.05$), indican rechazo de la hipótesis nula (arreglo aleatorio) y se acepta la hipótesis alternativa (arreglo agregado) (Kranz, 1993). Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de surcos que mostraron agregación entre árboles sintomáticos dentro de cada bloque.

Para examinar la presencia de agregación en los cuadrantes, los datos de frecuencia de árboles sintomáticos

values $Z \geq 1.64$ o $P(Z) \leq 0.05$, indicate that the arrangement of symptomatic trees follows the beta-binomial distribution (aggregated), while values of $Z < 1.64$ o $P(Z) > 0.05$, indicate that the arrangement of the symptomatic trees follows the binomial distribution (random).

Results and Discussion

The analysis of the progress curves, the incidence of HLB in the four orchards varied from 1.9 to 32.4 % in the months (Figure 1). In general terms, the dissemination of the disease has been fast and presents a pattern of dispersion similar to the one reported in Brazil (Gottwald *et al.*, 2007) and Florida, USA (Gottwald *et al.*, 2010), where the incidence of HLB increased from 6 to 27 % in 9 to 10 months and from 2 to 39 % in 10 months, respectively.

The progress of the disease was adequately described by the Weibull model with a coefficient of determination (R^2) from 0.84 to 0.95 % (Table 2). On the analysis of epidemics, it was verified that there was a marked increase of the rate in orchard ED-2, compared to the other orchards (Table 2). That difference can be attributed to the fact that a proportion

en los cuadrantes fueron utilizados para ajustar la distribución beta-binomial con el programa BBD (Madden y Hughes 1994). El análisis proporciona el valor normal estándar (Z) y la respectiva probabilidad (P) para la prueba $C(\alpha)$, asociado a la distribución beta-binomial, siendo que valores de $Z \geq 1.64$ o $P(Z) \leq 0.05$, indican que el arreglo de árboles sintomáticos sigue la distribución beta-binomial (agregado), mientras valores de $Z < 1.64$ o $P(Z) > 0.05$, indican que el arreglo de los árboles sintomáticos sigue la distribución binomial (aleatorio).

Resultados y Discusión

En el análisis de las curvas de progreso, la incidencia de HLB en las cuatro huertas varió de 1.9 a 32.4 % en los 6 meses (Figura 1). En términos generales la diseminación de la enfermedad ha sido muy rápida y presenta un patrón de dispersión similar con lo reportado en Brasil (Gottwald *et al.*, 2007) y Florida (Gottwald *et al.*, 2010), en donde la incidencia de HLB aumentó de 6 a 27 % en 9 a 10 meses y de 2 a 39 % en 10 meses, respectivamente.

El progreso de la enfermedad fue descrito adecuadamente por el modelo de Weibull con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.84 a 0.95 % (Tabla 2). En el análisis de las epidemias,

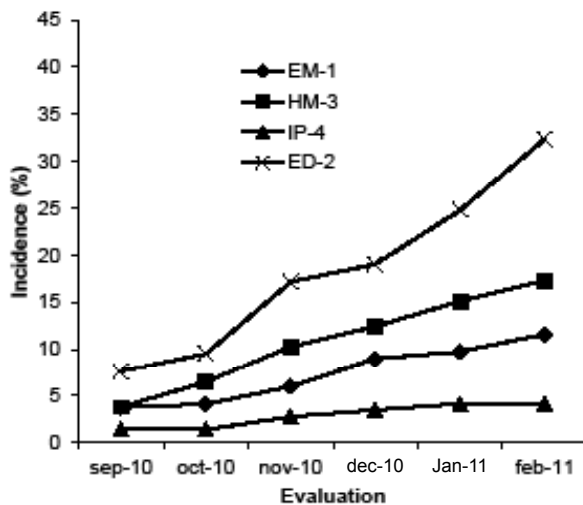


Figure 1. Progress curves of the incidence of Huanglongbing in four Persian lime orchards in Xalisco, Nayarit, Mexico.

Figura 1. Curvas de progreso de la incidencia de Huanglongbing en cuatro huertos de limón Persa en Xalisco, Nayarit, México.

Table 2.
Parameters estimated by fitting incidence of HLB with Weibull distribution model, in four citrus orchards in Xalisco, Nayarit, Mexico from September 2010 to February 2011.

Tabla 2.
Parámetros estimados mediante el ajuste de la incidencia de HLB con el modelo de distribución de Weibull, en cuatro huertos de cítricos en Xalisco, Nayarit, México de Septiembre 2010 a Febrero 2011.

Orchard	(epidemic)	Weibull model ^a			AUDPC	y ₀	y _f
	y=1-(t/b) ^c	c	b ⁻¹	R ²			
EM-1	y=1-(t/962.8) ^{0.53}	0.53	0.001	0.84	10.92	0.04	0.12
ED-2	y=1-(t/90.93) ^{1.08}	1.08	0.011	0.89	27.05	0.08	0.32
HM-3	y=1-(t/305.9) ^{0.62}	0.62	0.003	0.95	16.41	0.04	0.17
IP-4	y=1-(t/13439.4) ^{0.45}	0.45	0.00007	0.84	4.36	0.01	0.04

^aThe model parameters were estimated by nonlinear regression with model Weibull equation $y=1-(t/b)^c$, where c is the curve shape and b is the epidemic rate parameter, y is the disease measured as the incidence of diseased trees, t is the time in months. y_0 is the proportion of initial incidence and y_f is the proportion of final incidence of HLB in Persian lime orchards (*Citrus latifolia*) evaluated in Xalisco, Nayarit, Mexico.

^aLos parámetros del modelo se estimaron mediante regresión no lineal con el modelo de la ecuación de Weibull $y=1-(t/b)^c$, donde c es la forma de la curva; b es el parámetro de frecuencia, y es la enfermedad medida como la incidencia de árboles enfermos; t es el tiempo en meses. y_0 es la proporción de incidencia inicial y y_f es la proporción de la incidencia final de HLB en los huertos de limón persa (*Citrus latifolia*) evaluados en Xalisco, Nayarit, México.

of initial major incidence was found in that orchard. This hypothesis is backed up because the source of the inoculum plays a major role on the progress rate of the disease (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). Also, in this orchard the trees were relatively young (younger than three years old) and had constant vegetal growth, which created favorable conditions for the presence of high population of adults and nymphs of the ACP (Gottwald *et al.*, 2007).

While mapping the contour graphics it was possible to distinguish the possible patterns of spatial arrangement of the disease only in the first evaluations until the fourth month (Figure 2). In the orchards IP-4 and HM-3 the tree foci with symptoms were more evident inside the rows (among the trees), while as for the orchards EM-1 and ED-2 between rows (Figure 2). The mapping of the orchards provided a quick visualization of the arrangement of the trees with and without symptoms of HLB, being considered by this as the first element of an analysis.

Through the analysis of *ordinary runs*, in the orchards EM-1, ED-2, and HM-3 the percentage of rows showing aggregation symptomatic trees inside the rows was elevated overtime, seeing that in the last evaluation (sixth month), 13, 32 and 13 % of rows with aggregation were

se verificó que hubo un aumento acentuado de la tasa en el huerto ED-2, comparado a los otros huertos (Tabla 2). Esa diferencia puede ser atribuida al hecho de que se encontró una proporción de incidencia inicial mayor en ese huerto. Esa hipótesis es sustentada debido a que la fuente de inóculo juega un importante rol en la tasa de progreso de la enfermedad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014a). Además, en este huerto los árboles eran relativamente jóvenes (menores de 3 años) y tenían brotación vegetativa constante, lo que creó condiciones favorables para la presencia de poblaciones altas de adultos y ninfas del ACP (Gottwald *et al.*, 2007).

Al mapear las gráficas de contorno fue posible distinguir los posibles patrones de arreglo espacial de la enfermedad solamente en las primeras evaluaciones y hasta el mes cuatro (Figura 2). En los huertos IP-4 y HM-3 los focos de árboles con síntomas de la enfermedad fueron más evidentes dentro de los surcos (entre árboles), mientras en los huertos EM-1 y ED-2 entre los surcos (Figura 2). El mapeo de los huertos proporcionó rápida visualización del arreglo de los árboles con y sin síntomas de HLB, siendo por ello considerado como el primer elemento de un análisis.

Por el análisis de *ordinary runs*, en las huertas EM-1, ED-2 y HM-3 el porcentaje de surcos mostrando agregación de

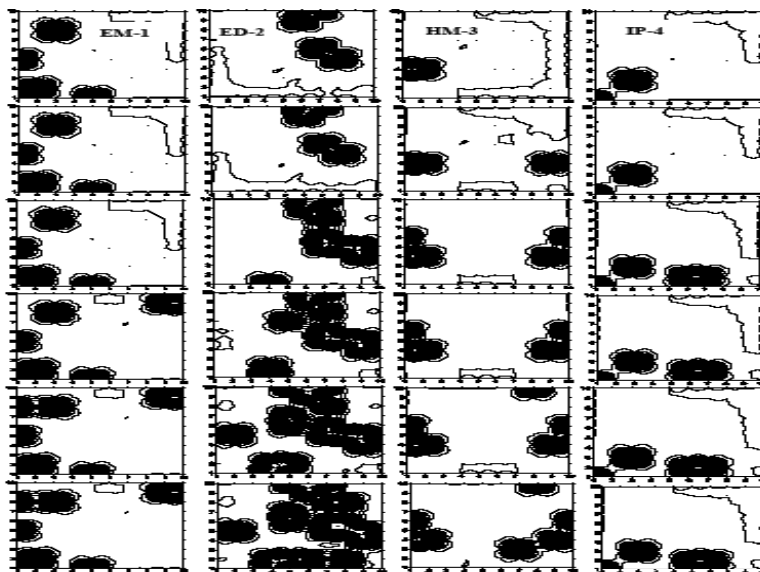


Figure 2. Geostatistical maps of four orchards of Persian lime showing trees with symptoms of HLB, evaluated during September 2010 to February 2011, in Xalisco, Nayarit, Mexico. Dark areas indicate diseased trees.

Figura 2. Mapas geoestadísticos de cuatro huertas de limón Persa mostrando árboles con síntomas de HLB, evaluados durante Septiembre 2010 a Febrero 2011, en Xalisco, Nayarit, México. Puntos oscuros indican árboles enfermos.

registered, respectively (Table 3). In the orchards IP-4, the percentage was maintained from the third month (7.7 %).

By the fitting to the beta-binomial distribution, and considering quadrants with four trees, in the orchards IP-4 all the evaluations evidenced a random arrangement of trees with HLB symptoms, while in the other orchards a pattern in the form of aggregated was evident from the third one (ED-2 and HM-3) and fourth one (EM-1) evaluation (Table 3). On the other hand, it was verified that, on low levels of incidence of the disease, as reported in Shantou, China (Gottwald *et al.*, 1991), a random arrangement of diseased trees predominated, because the results obtained from Z were not significant ($p > 0.05$) for the test $C(\alpha)$, giving that there was no fit on the beta-binomial (Madden and Hughes, 1994). According to Bassanezi *et al.*, (2005), the spatial arrangement of trees with HLB are influenced by the interaction of several factors, mainly by the source of available inoculum and the vector populations.

The predominance of the aggregated arrangement indicates that the infection of the trees with HLB could be originated from a close source of inoculum or from one inside the orchard. This most probable hypothesis is that the infections mainly occurred through the primary

árboles sintomáticos dentro de los surcos se elevó a lo largo del tiempo, siendo que en la última evaluación (sexto mes) fueron registrados 13, 32 y 13 % de surcos con agregación, respectivamente (Tabla 3). En la huerta IP-4 se mantuvo su porcentaje a partir del tercer mes (7.7 %).

Por el ajuste a la distribución beta-binomial, considerando cuadrantes con cuatro árboles, en la huerta IP-4 todas las evaluaciones evidenciaron un arreglo aleatorio de árboles con síntomas de HLB, mientras que en las otras huertas, un patrón en forma de agregados fue evidente a partir de la tercera (ED-2 y HM-3) y cuarta (EM-1) evaluación (Tabla 3). Por otro lado, se verificó que en bajos niveles de incidencia de la enfermedad, como lo reportado en Shantou, China (Gottwald *et al.*, 1991), predominó un arreglo aleatorio de árboles enfermos, ya que los resultados obtenidos de Z no fueron significativos ($p > 0.05$) por la prueba $C(\alpha)$, al no haber ajuste a la distribución beta-binomial (Madden y Hughes 1994). De acuerdo con Bassanezi *et al.*, (2005), los arreglos espaciales de árboles con HLB son influenciados por la interacción de varios factores, principalmente por la fuente de inoculo disponible y las poblaciones de vectores.

La predominancia del arreglo agregado indica que la infección de los árboles con HLB pudo haber sido originaria de una

Table 3.
Spatial arrangement of HLB in four plots of Persian lime, in Xalisco, Nayarit, Mexico, analyzed by the techniques of “ordinary runs” and fitting the beta-binomial distribution [test C(α)].

Tabla 3.
Arreglo espacial de HLB en cuatro huertas de limón Persa, en Xalisco, Nayarit, México, analizados mediante las técnicas de *ordinary runs* y ajuste a la distribución beta-binomial [prueba C(α)].

Orchard	Evaluation ^a	Ordinary runs ^b Aggregated lines (%)	Test C(α) ^c	
			Z	P(Z)
EM-1	Sep	7.7	na ^d	na
	Oct	7.7	na	na
	Nov	7.7	na	na
	Dec	11.3	2.320	0.029
	Jan	13.0	2.620	0.014
	Feb	13.0	2.620	0.014
ED-2	Sep	7.7	1.67	0.106
	Oct	9.5	1.65	0.112
	Nov	18.0	2.69	0.012
	Dec	21.1	2.96	0.006
	Jan	26.9	3.65	0.001
	Feb	32.0	3.84	0.0007
HM-3	Sep	3.9	0.920	0.368
	Oct	5.8	1.320	0.198
	Nov	9.5	2.000	0.056
	Dec	9.5	2.000	0.056
	Jan	11.3	2.320	0.029
	Feb	13.0	2.620	0.014
IP-4	Sep	3.9	1.430	0.166
	Oct	3.9	1.430	0.166
	Nov	7.7	na	na
	Dec	7.7	na	na
	Jan	7.7	na	na
	Feb	7.7	na	na

^aEvaluation period. ^bCalculated according Kranz (1993), considering 10 trees/line and 10 lines per orchard. Percent of symptomatic trees lines with aggregation. ^cNormal distribution pattern (Z) of the test C(α) and associated probability [P(Z)]. Values Z>1.64 or P(Z)<0.05 indicate rejection of H₀; arrangement follows the binomial distribution (random) and H₁; arrangement follows the beta-binomial distribution (aggregate). Estimated values with the help of the BBD program (Madden and Hughes 1994). ^dNot applicable.

^aPeríodo de evaluación. ^bCalculado según Kranz (1993), considerando 10 árboles/línea y 10 líneas por huerta. Porcentaje de líneas de árboles sintomáticos con agregación. ^cPatrón de distribución normal (Z) de la prueba C(α) y probabilidad asociada [P(Z)]. Los valores Z>1.64 o P(Z)<0.05 indican rechazo de H₀; el arreglo sigue la distribución binomial (aleatoria) y H₁; el arreglo sigue la distribución beta-binomial (agregado). Valores estimados con la ayuda del programa BBD (Madden y Hughes 1994). ^dNo aplicable.

inoculum transmitted by the Asian psyllids of the citrus, coming from the near infected orchards with HLB. On the other hand, the secondary transmission from tree to tree by the ACP inside the orchards had an influence on the epidemic, mainly on the orchard ED-2, where the aggregation of diseased trees was detected in great proportions. Studies performed in China, Brazil, and Florida (USA), also corroborated that the ACP showed an aggregated distribution on the fields (Gottwald *et al.*, 1991; Bassanezi *et al.*, 2005; Gottwald *et al.*, 2010). This pattern of dispersion is associated with diseases caused by systemic pathogens in which the vectors are the main way of mode of dispersion (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b).

The spatial relationship between diseased trees, when is combined with biological knowledge about the pathosystem, helps with the comprehension of the temporal process of the diseases and the factors that influence the dispersion on the field (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). The spatial mapping indicated that the occurrence of secondary dispersion of HLB in the orchards, with the participation of the ACP as vector, up to 40 meters long, a behavior similar to the one found in Brazil (Bassanezi *et al.*, 2005).

The establishment of area-wide management of ACP (ARCO), a current strategy applied in Mexico (SENASICA, 2012, 2016), is a viable alternative that can drastically reduce the source of inoculum and the vector insect population (Flores-Sánchez *et al.*, 2017). The use of the ARCOs can be a way to minimize the incidence of HLB and to modify the pattern of dispersion of the insect, decreasing the aggregation of the pathogen by its transmission.

Conclusions

The rate of incidence of the trees with HLB symptoms in the orchards evaluated in the municipality of Xalisco, Nayarit, Mexico, increased up to 32.4 % in a six-month period (September, 2010 – February, 2011). The trees between two and five years old were the most susceptible. The spatial studies of HLB in Mexico at parcel level has been restricted to the use of distribution maps of diseased trees, with no quantitative analysis. This research confirms this aspect and demonstrates that the spatial arrangement of trees of Persian lime with HLB symptoms is aggregated predominant.

fuelle de inóculo cercana, o misma, dentro de la huerta. La hipótesis más probable es que las infecciones ocurrieron principalmente a través de inóculo primario transmitido por el psílido asiático de los cítricos, proveniente de huertas infectadas con HLB cercanas. Por otro lado, la transmisión secundaria de árbol a árbol por el ACP dentro de las huertas ejerció influencia en la epidemia, principalmente en el huerto ED-2, donde la agregación de árboles enfermos, fue detectada en grandes proporciones. Estudios realizados en China, Brasil y Florida, también constataron que el ACP presentó una distribución agregada en los campos (Gottwald *et al.*, 1991; Bassanezi *et al.*, 2005; Gottwald *et al.*, 2010). Este patrón de dispersión está asociado con enfermedades causadas por patógenos sistémicos en el que los vectores son el principal modo de dispersión (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b).

La relación espacial entre árboles enfermos, cuando es combinada con conocimientos biológicos sobre el patosistema, auxilia en la comprensión del proceso temporal de la enfermedad y de los factores que influyen la dispersión en el campo (Mora-Aguilera *et al.*, 2014b). El mapeo espacial indicó una ocurrencia de dispersión secundaria del HLB dentro de las huertas, con la participación del ACP como vector, de hasta 40 metros de distancia, comportamiento similar a lo encontrado en Brasil (Bassanezi *et al.*, 2005).

La implementación de las áreas regionales de control del ACP (ARCO), una estrategia actualmente operada en México (SENASICA, 2012, 2016), es una alternativa viable que puede reducir drásticamente la fuente de inóculo y la población del insecto vector (Flores-Sánchez *et al.*, 2017). La utilización de las ARCOs puede ser una manera de minimizar la incidencia del HLB y de modificar el patrón de dispersión del insecto, disminuyendo la agregación del patógeno por la transmisión de éste.

Conclusiones

La tasa de incidencia de árboles con síntomas de HLB en las huertas evaluadas en el municipio de Xalisco, Nayarit, México, se incrementó hasta un 32.4 % en un periodo de 6 meses (Septiembre, 2010 - Febrero, 2011). Los árboles de entre 2 y 5 años fueron los más susceptibles. Los estudios espaciales de HLB en México a nivel parcela se han restringido al uso de mapas de distribución de árboles enfermos, sin análisis cuantitativos. Este estudio confirma este aspecto y demuestra que el arreglo espacial de árboles de limón Persa con síntomas de HLB es predominantemente agregado.

References

- Bassanezi, R.B., Bergamin Filho, A., Amorim, L. and Gottwald, T.R. (2006). Epidemiology of huanglongbing in São Paulo. In: Proceedings of Huanglongbing Greening International Workshop. Ribeirão Preto, Brasil.
- Bassanezi, R.B., Busato, L.A., Bergamin Filho, A., Amorim, L. and Gottwald, T.R. (2005). Preliminary spatial pattern analysis of Huanglongbing in São Paulo, Brazil. In: Proc. 16th Conf. IOCV. 341-355. Riverside, California. <https://cloudfront.escholarship.org/dist/prd/content/qt76s629f9/qt76s629f9.pdf>
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Gimenes-Fernandes, N., Yamamoto, P.T., Gottwald, T.R., Amorim, L. et al. (2013). Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. *Plant Disease* 97: 789-796. doi: [10.1094/PDIS-03-12-0314-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0314-RE)
- Bassanezi, R.B., Montesino, L.H., Godoy, M.C., Filho, A.B. and Amorim, L. (2011). Yield loss caused by huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 130: 577-586. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9779-1>
- Bové, J.M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88: 7-37. https://www.jstor.org/stable/41998278?seq=1#page_scan_tab_contents
- Campbell, C.L. and Madden, L.V. (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York: John Wiley & Sons.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02712670.pdf>
- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J.J., Manzanilla-Ramírez, M.A. et al. (2012). Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000800003
- Flores-Sánchez, J.L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J.I., Domínguez-Monge, S. and Acevedo-Sanchez, G. (2015). Yield loss caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Persian lime, in Yucatan Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 33: 195-210. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000200195&lng=es&tlng=es.
- Flores-Sánchez, J.L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J.I., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Domínguez-Monge, S. et al. (2017). Diffusion model for describing the regional spread of Huanglongbing from first-reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101: 1119-1127. doi: [10.1094/PDIS-04-16-0418-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE)
- Gatineau, F., Loc, H.T., Tuyen, N.D., Tuan, T.M., Hien, N.T. and Truc, N.T.N. (2006). Effects of two insecticide practices on population dynamics of *Diaphorina citri* and huanglongbing incidence in south Vietnam. Proceedings of Huanglongbing-Greening International Workshop, Ribeirão Preto, Brazil. p.110.
- Gottwald, T.R. (2010). Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48: 119-139. doi: [10.1146/annurev-phyto-073009-114418](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114418)
- Gottwald, T.R., Aubert, B. and Huang, K.L. (1991). Spatial pattern analysis of citrus greening in Shantou, China. In: Proc. 11th Conf. IOCV. 421-427. Riverside, California. <https://cloudfront.escholarship.org/dist/prd/content/qt9rz5x2kw/qt9rz5x2kw.pdf>
- Gottwald, T.R., da Graça, J.V. and Bassanezi, R.B. (2007). Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress*. <https://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/HuanglongbingImpact.aspx>
- Gottwald, T.R., Irey, M.S., Gast, T., Parnell, S.R., Taylor, E.L. and Hilf, M.E. (2010). Spatio-temporal analysis of an HLB epidemic in Florida and implications for spread. In: Proc. 17th Conf. IOCV. 84-97. Riverside, California. <https://cloudfront.escholarship.org/dist/prd/content/qt0jq6d375/qt0jq6d375.pdf>
- Hall, D.G., Richardson, M.L., Ammar, E. and Halbert, S.E. (2013). Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 146: 207-223. doi: [10.1111/eea.12025](https://doi.org/10.1111/eea.12025)
- Jesus, W.C., Jr., Pozza, E.A., Vale, F.X.R. and Mora-Aguilera, G. (2004). Análise Temporal de Epidemias. Pages 127-191 In: Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas. F.X.R. Vale, W.C. Jesus Jr. and L. Zambolim, eds. Perffil Editora, Brasil.
- Kranz, J. (1993). Introduction to sampling in crop protection. In: Kranz J, Holz F, eds. Basics of decision-making and planning

- for integrated pest management (IPM). Feldafing: Food and Agriculture Development Centre. 33-45.
- Li, W.B., Hartung, J.S. and Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal Microbiology Methods* 66: 104-115. doi: [10.1016/j.mimet.2005.10.018](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018)
- Lopes, S.A., Frare, G.F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N.G., Ayres, A.J. et al. (2009). Liberibacters associated with citrus huanglongbing in Brazil: "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" is heat tolerant, *Ca. L. americanus* is heat sensitive. *Plant Disease* 93: 257-262. doi: [10.1094/PDIS-93-3-0257](https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0257)
- Madden, L.V. and Hughes, G. (1994). BBD – Computer software for fitting the beta-binomial distribution to disease incidence data. *Plant Disease* 78: 536-540. doi: [10.1094/PD-78-0536](https://doi.org/10.1094/PD-78-0536)
- Madden, L.V., Hughes, G. and Van den Bosch, F. (2007). The study of plant disease epidemics. St. Paul: *The American Phytopathological Society*, 432 pp. <http://hortsci.ashspublications.org/content/44/7/2065.2.full>
- Mora-Aguilera, G., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S., Oropeza-Salín, C., Gonzalez-Gómez, R. et al. (2014a). Epidemiological surveillance and current status of lethal yellowing coconut, potato purple top and citrus huanglongbing (HLB) in Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology* 32: 120-131. http://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_04.pdf
- Mora-Aguilera, G., Nieto-Angel, D., Campbell, C.L., Téliz, D. and García, E. (1996). Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86: 70-78. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1996Articles/Phyto86n01_70.pdf
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., Lopez Arroyo, J. I., Velázquez Monreal, J., Flores-Sanchez, J., Acevedo-Sánchez, G., et al. (2014b). Current situation and prospects for management of citrus HLB. *Mexican Journal of Phytopathology* 32: 108-119 http://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf
- Pennypacker, S.P., Knoble, H.D., Antle, C.E. and Madden, L.V. (1980). A flexible model for studying plant disease progression. *Phytopathology* 70: 232-235. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1980Articles/Phyto70n03_232.pdf
- Pérez-Hernández, O., Góngora-Canul, C.C., Medina-Lara, M.F., Oropeza-Salín, C., Escamilla-Bencomo, J.A. and Mora-Aguilera, G. (2004). Patrón espacio-temporal del amarillamiento letal en cocotero (*Cocos nucifera* L.) en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 231-238 <http://www.redalyc.org/html/612/61222210/>
- Robles-González, M.M., Velázquez-Monreal, J.J., Manzanilla-Ramírez, M.A., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V.M., López-Arroyo, I., et al. (2013). Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19: 15-31. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- Salcedo, B.D., Hinojosa, R., Mora-Aguilera, G., Covarrubias, I., De Paolis, J.R.F., Mora, S., et al. (2010). Evaluación del Impacto Económico de Huanglongbing (HLB) en la Cadena Citrícola Mexicana. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). México. Doi: [10.13140/RG.2.1.2123.0487](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2123.0487)
- Santivañez, C.T., Vernal, H.P., Mora-Aguilera, G., Diaz, P.G. and Lopez-Arroyo, J.I. (2014). Marco Estratégico para la Gestión Regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. FAO, Rome, Italy. Online publication: <http://www.fao.org/3/a-i3319s.pdf>
- SENASICA. (2012). Protocolo para establecer Areas Regionales de Control del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los Cítricos (ARCOs). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). México, D.F. Last checked: May 1st 2018. <http://www.siafeson.com/sitios/simdia/docs/protocolos/ProtocoloparaestablecerAreasRegionalesARCOSDICIEMBRE2012.pdf>
- SENASICA. (2016). Acciones contra el Huanglongbing y su vector en México. Report of December, 2016. Last checked: May 1st 2018. http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/186023/12_Informe_nacional_HLB_diciembre.pdf
- SENASICA. (2017). Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) en México. Last checked: May 1st 2018. <https://www.gob.mx/senasica>
- Torres-Pacheco, I., Lopez-Arroyo, J.I., Aguirre-Gómez, J.A., Guevara-González, R.G., Yanez-López, R., Hernández-Zul, M.I. et al. (2013). Potential distribution of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) vector of huanglongbing in Mexico. *Florida Entomologist* 96: 36-47 <https://doi.org/10.1653/024.096.0105>

Trujillo-Arriaga, J. (2010). Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. In: Proceedings 2° International Workshop on Citrus Huanglongbing and the Asian Citrus Psyllid. Julio 19-23. Mérida, Yucatán, México. <http://calcitrusquality.org/wp-content/uploads/2009/05/MEMORIA-DE-TALLER-DE-MERIDA.pdf>