

ANÁLISIS HISTOLÓGICO FOLIAR DE CÍTRICOS AGRIOS Y NARANJA DULCE CON SÍNTOMAS OCASIONADOS POR *Candidatus Liberibacter asiaticus*

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF SOUR CITRUS AND SWEET ORANGE LEAVES WITH SYMPTOMS CAUSED BY *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Fabiola Esquivel-Chávez¹, Guadalupe Valdovinos-Ponce¹, Gustavo Mora-Aguilera^{1*}, Rafael Gómez-Jaimes², J. Joaquín Velázquez-Monreal³, M. Ángel Manzanilla-Ramírez³, J. Luis Flores-Sánchez¹, J. Isabel López-Arroyo⁴

¹Fitopatología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (gvapon@colpos.mx), (morag@colpos.mx). ²INIFAP. 100. Santiago Ixcuintla Nayarit. ³INIFAP. 2810. Tecomán, Colima. ⁴INIFAP. 67413. General Terán.

RESUMEN

En México, la enfermedad del Huanglongbing (HLB), provocada por *Candidatus Liberibacter asiaticus*, se reportó por primera vez en 2009 y tiene prevalencia mayor en cítricos agrios. No hay reportes formales de la respuesta histológica asociada con la expresión del síntoma foliar en cítricos agrios. El objetivo de este estudio fue caracterizar los cambios anatómicos e histoquímicos asociados con síntomas de HLB en hojas de limón persa (Lp) (*Citrus latifolia*), limón mexicano (Lm) (*C. aurantifolia*) y naranja dulce (Nd) (*C. sinensis*). Árboles sintomáticos y asintomáticos en huertos de los estados de Nayarit, Colima y Yucatán, México, se seleccionaron en julio del 2010 y el progreso de la enfermedad se evaluó durante seis meses en un brote por árbol. El área y anchura del floema, área del sistema vascular y área de tejido con almidón y proteínas se analizaron por parcelas subdivididas. Los síntomas macroscópicos se presentaron con mayor rapidez en Lm, a partir de punteado clorótico hasta amarillamiento y abscisión foliar. El floema de la nervadura central en hojas sintomáticas de Lm mostró mayor hiperplasia ($p \leq 0.05$) y en las tres especies aumentó el depósito de proteínas. El parénquima en empalizada y esponjoso de tejido sintomático de Lm presentó mayor almidón que Lp y Nd. Los índices de relación asintomático:sintomático con respecto al área y anchura del floema, y acumulación de almidón sugirieron que Lm (1:63.8, 1:2.5, y 1:1.9) es más susceptible. Este es el primer estudio histológico en cítricos agrios con síntomas de HLB en México e indica su riesgo productivo ante el reciente ingreso de la enfermedad al país.

Palabras clave: *Citrus aurantifolia*, hiperplasia, floema, almidón, P-proteína.

ABSTRACT

In México Huanglongbing disease (HLB), caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus*, was reported for the first time in 2009 and has mainly prevailed in sour citrus. There are no formal reports of histological response associated to foliar symptom expression in sour citrus. The objective of this study was to characterize the anatomical and histochemical changes related to HLB symptoms in leaves of *Persian lime* (Lp) (*Citrus latifolia*), Mexican lemon (Lm) (*C. aurantifolia*), and sweet orange (Nd) (*C. sinensis*). Symptomatic and asymptomatic trees were selected in orchards of Nayarit, Colima, and Yucatán, Mexico, in July 2010, and the progress of the disease was assessed during six months in one sprout per tree. Area and phloem width, area of vascular system and the mesophyll tissue with starch and proteins were analyzed by split plots. Macroscopic symptoms appeared more rapidly in Lm, starting with chlorotic spots unto yellowing of leaves and foliar abscission. The phloem of the central nervure in symptomatic leaves of Lm showed major hyperplasia ($p \leq 0.05$) and the three species presented increase of protein deposits. The parenchyma palisade layer and the symptomatic spongy tissue of Lm had higher starch content than Lp and Nd. Indices of asymptomatic-symptomatic relation with respect to phloem area and width, and starch accumulation suggested that Lm (1: 63.8, 1:2.5, and 1: 1.9) is more susceptible. This is the first histological study in sour citrus with HLB symptoms in México indicating the production risk facing the recent entrance of the disease into the country.

Key words: *Citrus aurantifolia*, hyperplasia, phloem, starch, P-protein.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2012. Aprobado: octubre, 2012.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 46: 769-782. 2012.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad del Huanglongbing (HLB), causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), es uno de los problemas fitosanitarios más importantes en las áreas productoras de cítricos. En México, el primer reporte de esta enfermedad fue en el Cuyo, Yucatán, en julio del 2009; en diciembre del mismo año se reportó en Nayarit en limón persa (Lp) (*Citrus latifolia*) y en abril del 2010 en Colima en limón mexicano (Lm) (*C. aurantifolia*) (Trujillo, 2010). En Colima y Nayarit, la severidad de la enfermedad en cítricos agrios fue 96 a 100 %, comparada con cítricos dulces de la Península de Yucatán (Loeza-Kuk *et al.*, 2010; Robles *et al.*, 2010). Uno de los principales síntomas macroscópicos en naranja dulce (Nd) (*C. sinensis*) es el moteado clorótico asimétrico en la lámina foliar. Las hojas pueden tener apariencia corchosa y mostrar venas dilatadas (Bové, 2006). Observaciones histoquímicas muestran acumulación alta de almidón en los tejidos epidérmico, fundamental y en células parenquimatosas del floema, con obstrucción y degeneración del floema (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010). El contenido de almidón en hojas sintomáticas de Nd puede ser 20 veces mayor que en las asintomáticas (Takushi *et al.*, 2007). Además, hay taponamiento de elementos cribosos del floema con calosa y P-proteína (Folimonova y Achor, 2010). Según Koh *et al.* (2011), el taponamiento por calosa inhibe el transporte de los fotoasimilados, contribuyendo al desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Debido a la falta de información de los cambios anatómicos e histoquímicos de los cítricos agrios infectados con CLAs, el objetivo del presente estudio fue caracterizar esos cambios en hojas de Lp, Lm y Nd asociadas a síntomas de HLB, y obtener información para explicar la velocidad y expresión mayor de síntomas en cítricos agrios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de material vegetal

En agosto del 2010 se seleccionó una superficie con 48 árboles de Lm en la plantación del Rancho Lucy en Tecomán, Colima, México. El área se aisló con una estructura metálica cubierta con malla antiáfidos para evitar la diseminación de la enfermedad, porque en esta plantación se detectó por primera vez la bacteria.

INTRODUCTION

Huanglongbing (HLB) disease, caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) bacterium, represents one of the most important phytosanitary problems in citrus producer areas. In México, the first report on this disease was made in Cuyo, Yucatán, in July 2009. In December of the same year, it was reported in Nayarit for *Persian lime* (Lp) *Citrus latifolia*, and in April 2010 in Colima for Mexican lemon (Lm) (*C. aurantifolia*) (Trujillo, 2010). In Colima and Nayarit the severity of the disease in sour citrus was 96-100 %, compared to sweet citrus of the Yucatán Peninsula (Loeza-Kuk *et al.*, 2010; Robles *et al.*, 2010). One of the principal macroscopic symptoms in sweet orange (Nd) (*C. sinensis*) is the chlorotic asymmetrically spotted leaf blade. The leaves may have corky appearance and show dilated veins (Bové, 2006). Histochemical observations present high starch accumulation in essential epidermal tissues and in parenchymatous phloem cells with obstruction and degeneration of the phloem (Etxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010). Starch content in symptomatic Nd leaves can be 20 times higher than in asymptomatic leaves (Takushi *et al.*, 2007). Furthermore, the sieve elements of the phloem are blocked up with callose and P-protein (Folimonova and Achor, 2010). According to Koh *et al.* (2011), the obstruction by callose inhibits the transport of photo-assimilates, which contributes to the development of the disease symptoms. Due to the lack of information on anatomical and histochemical changes of sour citrus, infected with CLAs, the objective of the present study was to characterize these changes in leaves of Lp, Lm, and Nd, related to HLB symptoms, and to obtain information helping to explain the speed and greater expression of symptoms in sour citrus.

MATERIALS AND METHODS

Samples of plant material

In August 2010 an area with 48 Lm trees was selected in the plantation of Rancho Lucy in Tecomán, Colima, México; the area was isolated using a metal structure covered with anti-aphid wire netting in order to avoid the dissemination of the disease, since the bacterium had been detected in this plantation for the first time. The trees were planted in 2006 on Volkameriana pattern

Estos árboles se plantaron en el 2006 sobre el patrón Volkameriana bajo un sistema de 6×8 con manejo altamente tecnificado. Ese mismo año se seleccionaron 100 árboles de un huerto comercial de Lp en Ahuacatlán, Nayarit, plantados en el 2005 sobre Volkameriana en un sistema de 5×5 altamente tecnificado. De cada huerto se seleccionaron cinco árboles asintomáticos (PCR negativos a CLas) y cinco con síntomas de HLB (PCR positivos a CLas). La confirmación de la enfermedad en estos estados se realizó por instancias oficiales y los árboles seleccionados se confirmaron por PCR en Colima y por sintomatología en Nayarit con apoyo de personal del Comité Estatal de Sanidad Vegetal.

En noviembre del 2010 en Tizimín, Yucatán, se seleccionó un árbol de Nd asintomático y otro con síntomas de HLB, confirmados por PCR. Este huerto tuvo manejo convencional y fue uno de los primeros reportes de HLB en México. No se encontraron otros árboles enfermos adicionales en la región.

Por árbol seleccionado se marcó un brote terminal, con 15 cm de longitud aproximada, de una rama con síntomas iniciales inducidos por CLas para evaluar el progreso de la enfermedad. Estas observaciones se hicieron mensualmente entre agosto del 2010 y enero del 2011 en árboles de Colima y Nayarit, y de noviembre del 2010 a enero del 2011 en el árbol de Yucatán. De estos brotes se tomaron dos hojas (lámina y peciolo) en intervalos mensuales para su análisis histológico. Las hojas se muestrearon desde la porción del brote donde se presentaron los síntomas iniciales.

Análisis histológico

De cada brote se disectaron el peciolo y la lámina foliar de dos hojas. De la base de la lámina foliar se obtuvieron cinco fragmentos (aproximadamente 1 cm²) tomando como referencia la nervadura central. Los segmentos se fijaron en FAA por 48 h, se deshidrataron gradualmente en etanol y se incluyeron en paraplast (SIGMA®). Las muestras se seccionaron longitudinal y transversalmente (10 µm de grosor), con un micrótopo rotatorio (A. O. Company mod. Spencer 820), y se obtuvieron 3500 cortes histológicos. Estos se tiñeron con safranina-verde rápido preparada en metilcelosolve según el protocolo descrito por López *et al.* (2005).

Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico (VELAB), en un microscopio compuesto (Master Olympus) con cámara (Infynitum), y en un fotomicroscopio (III Carl Zeiss) con cámara digital para microscopía (Paxcam 3).

De los cortes de Lp, Lm y Nd de cada fecha se eligieron cinco laminillas sintomáticas y cinco asintomáticas. De cada laminilla se seleccionaron el quinto y el décimo corte y se analizaron 120 cortes de cítricos agrios (Lp y Lm) y 60 de Nd. Para calcular el área y anchura del floema y área del sistema vascular, se tomaron

under a highly modernized management system of 6×8. In this very year, 100 trees were selected from a commercial Lp orchard in Ahuacatlán, Nayarit, planted in 2005 on Volkameriana, employing a highly modernized 5×5 system. Five asymptomatic trees were chosen from each orchard (PCR negative to CLas) and five trees with HLB symptoms (PCR positive to CLas). The confirmation of the disease in these states was carried out by official instances, and the selected trees were confirmed by PCR in Colima and by symptomatology in Nayarit, supported by the Committee of the State Vegetal Health Department.

In November 2010, an asymptomatic Nd tree was chosen and another one with HLB symptoms, confirmed by PCR, in Tizimín, Yucatán. This orchard was conventionally managed and corresponded to one of the first reports of HLB in Mexico. Additional diseased trees were not found in the region.

One approximately 15 cm-long terminal shoot was marked per selected tree from a branch with initial symptoms induced by CLas in order to assess the progress of the disease. These observations were made monthly in trees from Colima and Nayarit between August 2010 and January 2011, and from November 2010 to January 2011 in the tree of Yucatán. Two leaves (leaf blade and petiole) were taken from these shoots at monthly intervals for their histological analysis. The leaves were sampled from the shoot portion that presented the initial symptoms.

Histological analysis

Petiole and leaf blade of two leaves from each shoot were dissected. Five fragments of approximately 1 cm² were obtained from the base of the leaf blade, taking the central vein structure as reference. The segments were fixed in FAA for 48 h, gradually dehydrated in ethanol and included in paraplast (SIGMA®). The samples were cut longitudinally and in cross sections with 10 µm thickness using a rotary microtome (A.O. Company mod. Spencer 820); a total of 3500 histological cuts were obtained. They were dyed with green-safranin, prepared quickly in methyl-cellosolve, according to the protocol described by López *et al.* (2005).

The observations were made with an optical microscope (VELAB), a compound microscope (Master Olympus) with camera (Infynitum), and a photomicroscope (III Carl Zeiss) with a digital camera for microscopy (Paxcam 3).

Five symptomatic and five asymptomatic lamellas were chosen from the cuts of Lp, Lm, and Nd of each date. The fifth and tenth cut of each lamella were selected, analyzing a total of 120 cuts of sour citrus (Lp and Lm) and 60 of Nd. In order to calculate area and width of phloem and vascular system area, microphotographs of the cuts were made. The measurements

fotomicrografías de los cortes. Las mediciones se hicieron en las imágenes digitales con el analizador de imágenes Image Tool® ver. 3.0.

Pruebas histoquímicas

Almidones

Cortes transversales y longitudinales de las hojas de Lp, Lm y Nd se desparafinaron e hidrataron gradualmente con etanol y agua corriente. El tejido rehidratado se tiñó con yodo-yoduro de potasio durante 15 min (Curtis-Patiño, 1986) y se observó en un microscopio compuesto (Master Olympus con cámara Infynitum). De 24 laminillas obtenidas de muestras sintomáticas y asintomáticas de cada cítrico, se seleccionaron el quinto y el décimo corte por fecha de evaluación, y se analizaron 48 cortes por cítrico agrio (Lp y Lm) y 24 de Nd.

Para determinar la superficie del mesófilo con almidón acumulado se tomaron fotomicrografías de las secciones histológicas provenientes de muestras sintomáticas y asintomáticas. Las imágenes digitales se procesaron con el analizador de imágenes Image Tool® ver. 3.0. En cada imagen se identificó el área de tejido parenquimatoso con reacción positiva al lugol.

Proteínas

Cortes longitudinales de hojas sintomáticas y asintomáticas de Lp, Lm y Nd de la última fecha de evaluación se desparafinaron e hidrataron, se colocaron 30 min en azul de bromofenol mercúrico (SIGMA®), se enjuagaron con ácido acético al 0.5 % durante 20 min y se lavaron con agua de la llave. Después las muestras se deshidrataron con etanol, se colocaron 3 min en xilol absoluto y se montaron en resina sintética. De 10 laminillas de cada muestra, se seleccionaron el quinto y el décimo corte para determinar el área del floema con reacción positiva a la presencia de proteínas. Se obtuvieron fotomicrografías de esas áreas y se procesaron con la metodología ya descrita.

Análisis estadístico

El diseño estadístico fue de parcelas subdivididas para obtener los datos del área del sistema vascular, área y anchura del floema, área del mesófilo con reacción positiva al almidón y área del floema con proteínas. Se aplicó un análisis de varianza con el programa SAS ver. 9.0. La fecha de muestreo, especie cítrica y la condición de enfermedad [sintomática (+) o asintomática (-)] se asociaron con la parcela grande, mediana y chica, respectivamente. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Además, se construyeron curvas de desarrollo

were taken in digital images using the Image Tool® ver. 3.0 analyzer.

Histochemical tests

Starches

Paraffin coats were removed from the cross sections and longitudinal cuts of Lp, Lm, and Nd leaves, which were gradually hydrated with ethanol and running water. The rehydrated tissue was dyed with iodo-potassium iodine during 15 min (Curtis-Patiño, 1986) and observed under a compound microscope (Master Olympus with Infynitum camera). Symptomatic and asymptomatic samples, obtained from 24 lamellas of each citrus and the fifth and tenth cuts selected per evaluation date, and a total of 48 cuts of sour citrus (Lp and Lm) and of 24 cuts of Nd were analyzed.

In order to determine the mesophyll surface with accumulated starch, microphotographs of the histological sections from symptomatic and asymptomatic samples were taken. The digital images were processed with the ver. 3.0 Image Tool® analyzer. In each of them, the area of parenchymatous tissue with positive reaction to lugol was identified.

Proteins

Paraffin was removed from the longitudinal cuts of symptomatic and asymptomatic leaves of Lp, Lm, and Nd of the last evaluation date, and they were hydrated. After having been placed in mercuric blue bromophenol (SIGMA®) for 30 min, they were rinsed with acetic acid at 0.5 % during 20 min and washed with tap water. Subsequently, the samples were dehydrated with ethanol, placed in absolute xylol for 3 min and set in synthetic resin. Starting from 10 lamellas of each sample, the fifth and the tenth cut were selected to determine the phloem area with positive reaction to the presence of proteins. Microphotographs of these areas were obtained and processed with the previously described methodology.

Statistical analysis

The data of the area of vascular system, area and width of phloem, area of mesophyll with positive reaction to starch, and phloem area with proteins were obtained with a statistical split plots design. An analysis of variance was applied using the ver. 9.0 SAS program. Sampling date, citrus species, and condition of disease [symptomatic (+) or asymptomatic (-)] were associated to the large, medium, and small plot, respectively. The comparison of means was conducted with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

con el promedio de 10 mediciones por variable en cada fecha de evaluación. Se realizó un análisis de regresión lineal simple entre área de floema y acumulación de almidón por tipo de cítrico. Las mediciones de área de floema y de área de acumulación de proteína se usaron para calcular el índice de hiperplasia ($I_h = \bar{X}$ del área del floema de hoja sintomática / $\bar{X}$ del área del floema de hoja asintomática en μm^2), e índice de acumulación de proteínas ($I_p = \bar{X}$ del área del floema con proteína en hoja sintomática / $\bar{X}$ del área del floema con proteína en hoja asintomática) en μm^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntomas

Síntomas foliares progresivos fueron inducidos por CLAs durante el periodo de evaluación. En Lm y Lp se observó inicialmente un punteado clorótico disperso en agosto del 2010 (Figuras 1A y 2A). En septiembre y octubre se presentaron manchas angulares asimétricas (Figuras 1B y 2B), moteado difuso (Figuras 1C y 2C) y aclaramiento y engrosamiento de la nervadura central (Figuras 1D y 2D). Después, hubo acorchado de la nervadura central y amarillamiento generalizado del dosel del árbol (Figuras 1E, 1F, 2E y 2F). Estas observaciones coinciden con las de Robles *et al.* (2010), quienes además señalan deformación y caída de frutos. En los seis meses de evaluación la defoliación de árboles sólo se presentó en Lm. En Nd se observó moteado difuso, aclaramiento de nervaduras y amarillamiento tenue generalizado de las hojas. En Lm, Lp y Nd hubo amarillamiento foliar manifestado en forma de mosaicos y moteados, pero solamente en Lm el amarillamiento fue generalizado y asociado con defoliación. En otras interacciones planta-patógeno hay aumento en la liberación de etileno seguido por amarillamiento y defoliación prematura (Šutić y Sinclair, 1991). Según Kehr (2006), la síntesis de esta hormona es una de las primeras respuestas de la planta al estrés; de ser así, la defoliación en los árboles de Lm podría estar asociada con la producción inmediata de etileno, pero este aspecto debe comprobarse.

Estructura foliar

Lamina foliar

No se observaron diferencias anatómicas entre las láminas foliares sintomáticas y asintomáticas de los cítricos. El tejido epidérmico es uniestratificado

Furthermore, development curves were constructed with the mean of 10 measurements per variable at each evaluation date. An analysis of simple linear regression between phloem area and starch accumulation per citrus type was carried out. The measurements of phloem area and protein accumulation area were employed for calculating the index of hyperplasia ($I_h = \bar{X}$ of the phloem area of symptomatic leaf / $\bar{X}$ phloem area of asymptomatic leaf in μm^2 , and index of protein accumulation ($I_p = \bar{X}$ of phloem area with protein in symptomatic leaf / $\bar{X}$ of phloem area with protein in asymptomatic leaf) in μm^2 .

RESULTS AND DISCUSSION

Symptoms

Progressive foliar symptoms were induced by CLAs during the evaluation period. Initially scattered chlorotic speckles were observed in Lm and Lp in August 2010 (Figures 1A and 2A). In September and October asymmetric angular spots appeared (Figures 1B and 2B), diffuse dots (Figures 1C and 2C), and turning pale and swelling of the central vein could be observed (Figures 1D and 2D). Subsequently, the central vein structure became corky and the tree canopy went yellowing (Figures 1E, 1F, 2E, and 2F). These observations agree with those of point out Robles *et al.* (2010), who point out deformation and dropping of fruits. In the six months of assessment defoliation was perceived only in Lm. In Nd, diffuse dotting, pallor of the vein structure, and generally slight yellowing of the leaves were observed. In Lm, Lp, and Nd, there was leaf yellowing in mosaics and dotting, but only in Lm, the yellowing was generalized and associated to defoliation. In other plant-pathogen-interactions, increment in ethylene release has been observed, followed by yellowing and premature defoliation (Šutić and Sinclair, 1991). According to Kehr (2006), the synthesis of this hormone is one of the first plant responses to stress; if that is the case, the defoliation of Lm trees might be related to immediate ethylene production, but, this aspect should be proved.

Foliar structure

Leaf blade

Anatomical differences between symptomatic and asymptomatic citrus leaf blades were not observed.

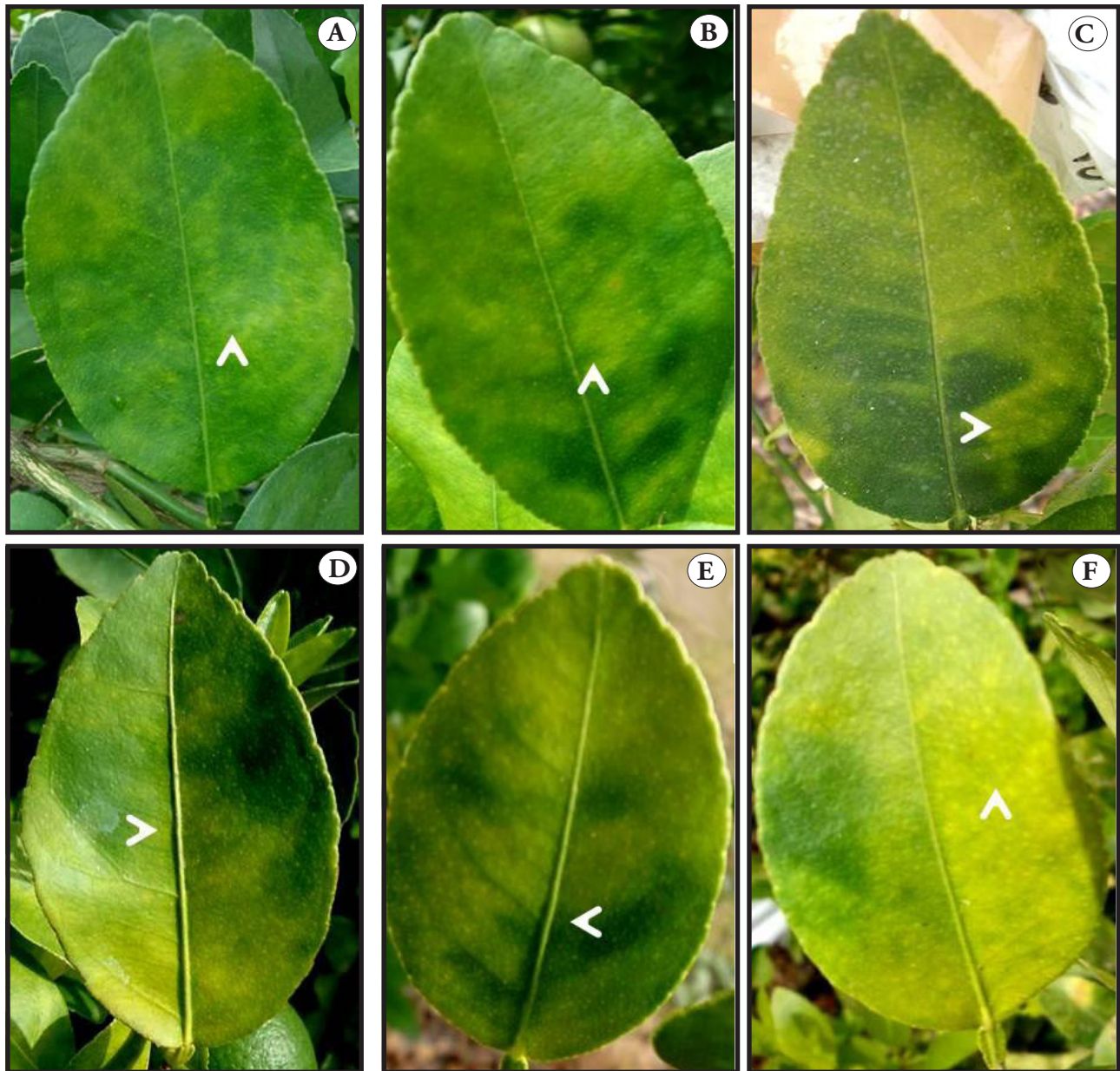


Figura 1. Síntomas foliares inducidos por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón mexicano en un huerto comercial de Tecmán, Colima. A) Punteado clorótico en agosto del 2010; B) manchas angulares asimétricas en septiembre; C) moteado difuso en octubre; D) aclaramiento de nervaduras en noviembre; E) acorchado de nervaduras en diciembre; F) amarillamiento total en enero del 2011.

Figure 1. Foliar symptoms induced to Mexican lemon trees by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in a commercial orchard of Tecmán, Colima. A) Chlorotic dotting in August 2010; B) asymmetric angular spots in September; C) diffusely dotted in October; D) pallor of vein structure in November; E) corky vein structure in December; F) total yellowing in January 2011.

y posee una cutícula gruesa que se proyecta hacia las paredes anticlinales de las células. El mesófilo es de tipo dorsiventral, formado por dos o tres estratos de células en empalizada y más de seis estratos de células

Epidermal tissue is unistratified and has thick cuticle that is cast towards the anticlinal cell walls. The mesophyll is dorsoventral, formed by two or three layers of palisade cells and another six isodiametric

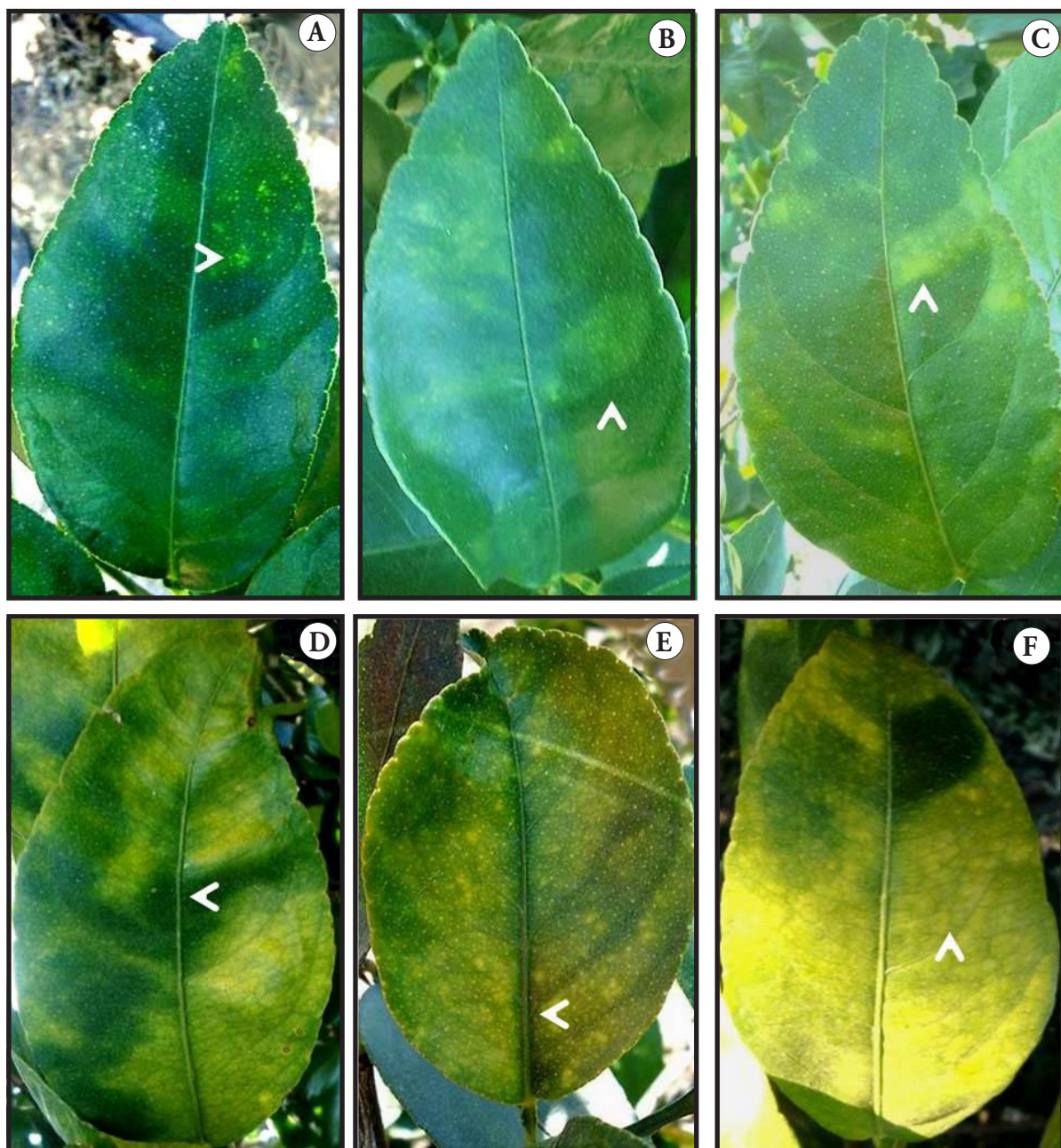


Figura 2. Síntomas foliares inducidos por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en árboles de limón persa (*C. Latifolia*) localizados en un huerto comercial de Ahuacatlán, Nayarit. A) Punteado clorótico en agosto del 2010; B) manchas angulares asimétricas en septiembre; C) moteado difuso en octubre; D) aclaramiento de nervaduras en noviembre; E) acorchado de nervaduras en diciembre; F) amarillamiento total en enero del 2011.

Figure 2. Foliar symptoms induced to Persian lime (*C. latifolia*) Lp trees by *Candidatus Liberibacter asiaticus* in a commercial orchard of Ahuacatlán, Nayarit. A) Chlorotic dotting in August 2010; B) asymmetric angular spots in September; C) diffuse dotting in October; D) pallor of vein structure in November; E) corky vein structure in December; F) total yellowing in January 2011.

parenquimatosas isodiamétricas (esponjoso) con espacios intercelulares amplios.

(spongy) parenchymatous cell strata with wide intercellular spaces.

Nervadura central de la hoja

En las tres especies el tejido vascular de la nervadura central está formado por un anillo continuo de floema y xilema rodeado por cordones de fibras (Figuras 3C, 3F, 3I).

El área del sistema vascular, la anchura y área del floema de hojas sintomáticas y asintomáticas aumentaron en las tres especies en el tiempo (Figuras 3B, 3E, 3H, 4A-4C), aunque el incremento fue mayor en tejido sintomático en todos los casos ($p \leq 0.05$). Existió interacción significativa entre las parcelas de los tratamientos ($p \leq 0.0001$), asociada directamente con el incremento en la división celular (hiperplasia) del parénquima de floema, y aumento del área total del sistema vascular (xilema y floema) (Figura 4A). Estos resultados indican que la tasa de crecimiento normal del sistema vascular pudo haberse alterado por la presencia de CLas en los tejidos foliares. La presencia de la bacteria se verificó previamente en los árboles evaluados; y sin embargo, es recomendable confirmarlo en el tejido vegetal en el cual se hará el análisis histológico. El Ih fue significativamente mayor en Lm en las tres fechas últimas de evaluación y estuvo relacionado con la severidad de síntomas en la especie (Cuadro 1). Al respecto, en Florida y Brasil los procesos epidémicos de HLB ocurren principalmente en Nd tipo Valencia (Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2011) y los síntomas son más severos en este cítrico. Los resultados muestran que CLas también afecta cítricos agrios y que su efecto se modifica por el ambiente y manejo.

Como en el floema de hojas, peciolo y tallos de naranja Valencia (Ettxeberria *et al.*, 2009; Acnor, *et al.*, 2010; Folimonova y Achor, 2010), el floema de las hojas sintomáticas de Lm, Lp y Nd se colapsó y no se observó taponamiento de los tubos ni de las células cribosas en los 3050 campos visuales revisados.

Histoquímica foliar

Lámina foliar

El tejido parenquimatoso del mesófilo y del sistema vascular de hojas sintomáticas de Lm y Lp acumularon almidón, como sucedió en Nd (Ettxeberria *et al.*, 2009), pero en la presente investigación no se detectó en el tejido vascular de la hoja de Nd. En el mesófilo de las hojas asintomáticas también

Leaf central vein structure

In the three species the vascular tissue of the central nervure is made up of a continuous ring of phloem and xylem, surrounded by fiber cords (Figures 3C, 3F, 3I).

In the three species, the area of the vascular system, width and area of the phloem of symptomatic and asymptomatic leaves increased by the time (Figures 3B, 3E, 3H, 4A-4C), although the increase was greater in symptomatic tissue ($p \leq 0.05$) in all the cases. There was significant interaction among the plots of the treatments ($p \leq 0.0001$), directly associated to the increase of cell division (hyperplasia) of phloem parenchyma and increment of the total area of the vascular system (xylem and phloem) (Figure 4A). These results indicate that the normal growth rates could have been altered because of the presence of CLas in the foliar tissues. The presence of the bacterium was previously verified in the assessed trees. Nevertheless, it is recommendable that in subsequent studies it should be confirmed in the vegetal tissue at conducting histological analysis. The Ih was considerably higher in Lm on the three last evaluation dates and related to the severity of the symptoms in the species (Table 1). Regarding this, the epidemic HLB processes in Florida and Brazil mainly occurred in the Valencia type of Nd (Gottwald *et al.*, 2007; Bassanezi *et al.*, 2011), and the symptoms in this citrus are severer. The results demonstrate that CLas also affects sour citrus and that its effect is modified by environment and management.

Like in the phloem of leaves, petioles, and stems of Valencia orange (Ettxeberria *et al.*, 2009; Achor *et al.*, 2010; Folimonova and Achor, 2010), the phloem of the symptomatic leaves of Lm, Lp, and Nd collapsed, and there was no blocking of sieve tube cells in the 3050 revised visual fields.

Foliar histochemistry

Leaf blade

The parenchymatous tissue of the mesophyll and the vascular system of symptomatic leaves of Lm and Lp accumulated starch, which as well happened in Nd (Ettxeberria *et al.*, 2009). In the present study, however, this was not detected in the vascular tissue of Nd leaves. In the mesophyll of asymptomatic

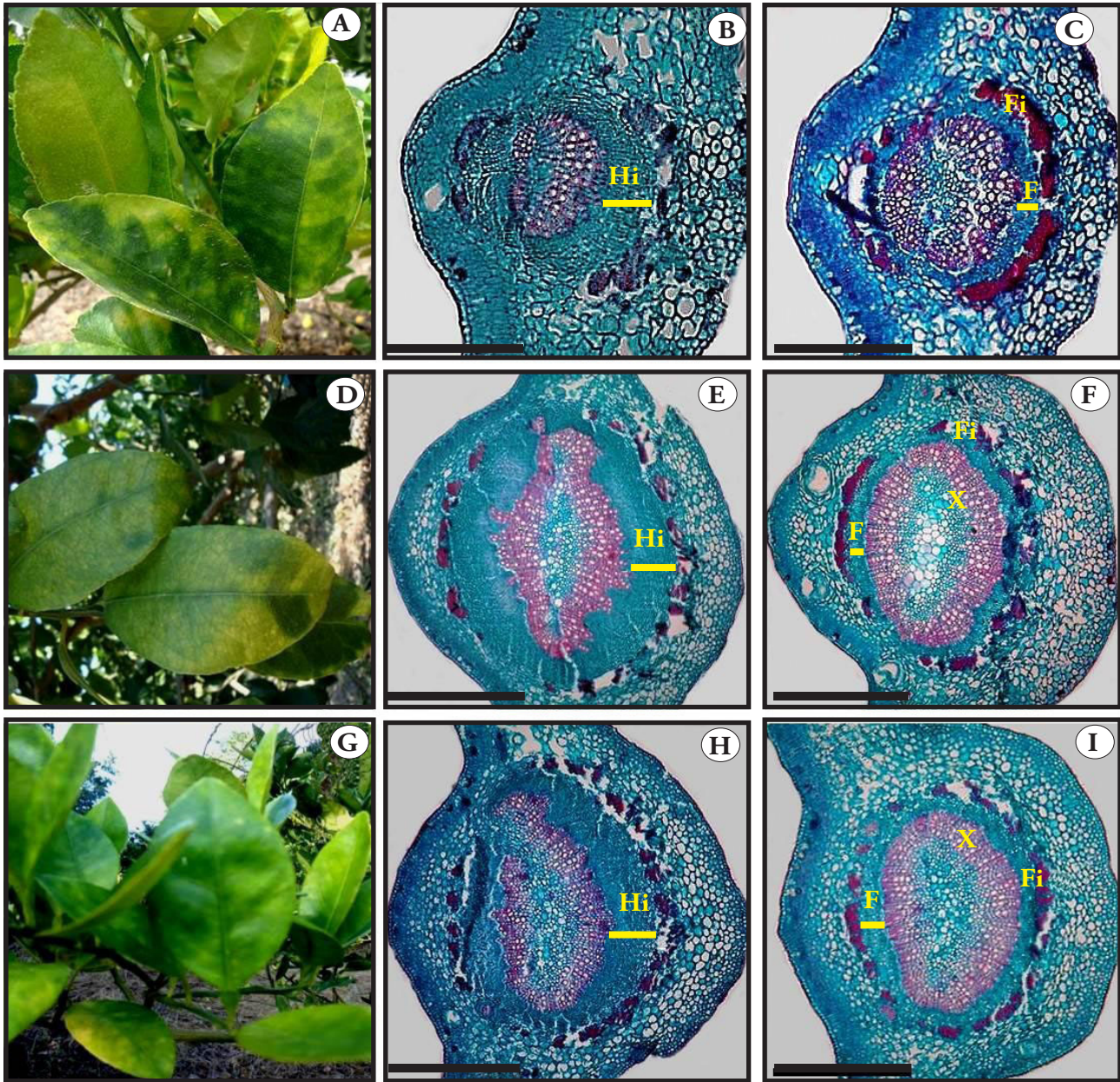


Figura 3. Síntomas macroscópicos de HLB en hojas al quinto mes de su detección en brotes de (A) limón mexicano (Lm), (D) limón persa (Lp) y (G) naranja dulce (Nd). Fotomicrografías de secciones transversales de la nervadura central correspondientes a los síntomas de A, D y G. Lm sintomático (B) y Lm asintomático (C); Lp sintomático (E) y Lp asintomático (F); y Nd sintomática (H) y Nd asintomática (I). Floema (F), fibras (Fi), hiperplasia (Hi) y xilema (X). Barras=100 μ m.

Figure 3. Macroscopic symptoms of HLB in leaves in the fifth month of its detection in shoots of A) Mexican lemon (Lm), (D) Persian lime (Lp), and G) sweet orange (Nd). Microphotographs of cross sections of central vein structure corresponding to symptoms of A, D, and G. Symptomatic Lm (B) and asymptomatic Lm (C); symptomatic Lp (E), and asymptomatic Lp (F); symptomatic Nd (H) and asymptomatic Nd (I). Phloem (F), fibers (Fi) hyperplasia (Hi) and xylem (X). Bars=100 μ m.

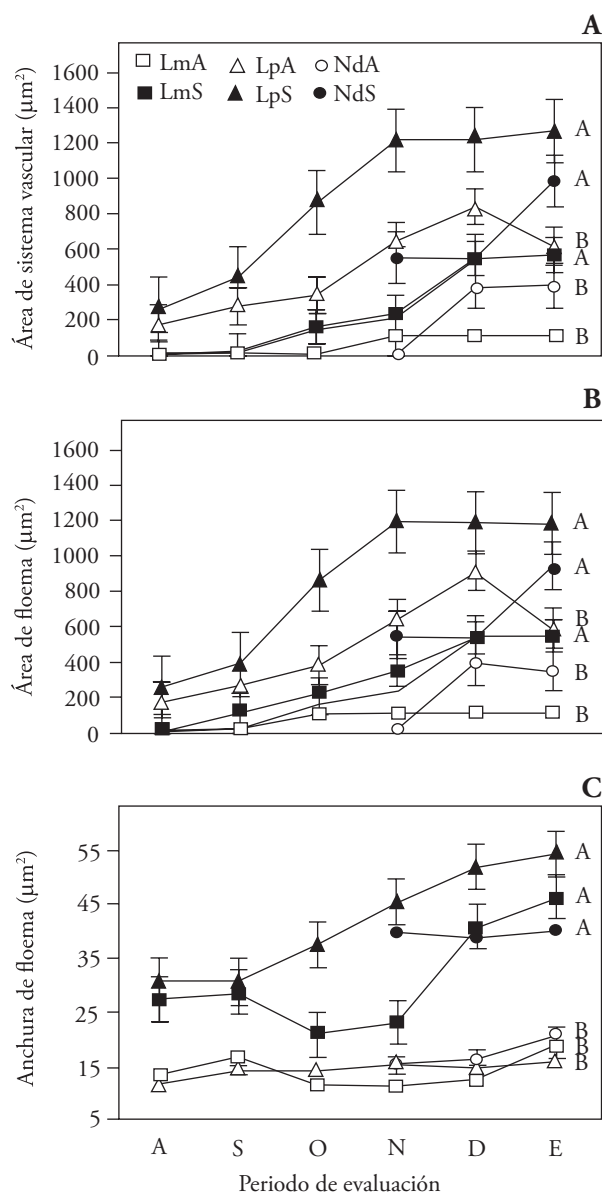


Figura 4. Curvas de desarrollo del área del sistema vascular (A) y área (B) y anchura (C) del floema de la nervadura central de hojas de brotes asintomáticos (A) y con síntomas (S) de HLB en limón mexicano (Lm), limón persa (Lp) y naranja dulce (Nd). A=agosto, S=septiembre, O=octubre, N=noviembre, D=diciembre y E=enero. Curvas de cada cítrico con letras distintas son estadísticamente diferentes que las de enero del 2011 (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 4. Development curves of vascular system area (A) and area (B) and width (C) of the central vein structure phloem of leaves of asymptomatic shoots (A) and with HLB symptoms (S) in Mexican lemon (Lm), Persian lime (Lp), and sweet orange (Nd). A=August, S=September, O=October, N=November, D=December, and E=January. Curves of each citrus with different letters are statistically different from those of January 2011 (Tukey, $p \leq 0.05$).

leaves there was also positive reaction to starch, but statistically less, compared to symptomatic leaves ($p \leq 0.05$) (Figure 5).

In the mesophyll the starch area was larger ($2989.33 \mu\text{m}^2$) in spongy and palisade parenchyma of symptomatic Lm and Lp leaves ($2674.04 \mu\text{m}^2$); in Nd it was larger in palisade parenchyma ($988.24 \mu\text{m}^2$) (Figures 5 and 6).

The highest starch accumulation in mesophyll of Lm ($p=0.05$) may probably be related to the general yellowing of the tree canopy. The yellowing could possibly be the result of the complete disorganization of thylakoids, due to starch granules (Etxeberria *et al.*, 2009). Building up of starch depended on the expression of symptoms during the evaluated period, particularly in Lm and Lp from the fourth month (Figure 5). The regression between mesophyll surface with starch depositions and the phloem area (hyperplasia) was $r^2=0.84$ and $r^2=0.51$.

Studies, mainly in sweet citrus, indicate that starch accumulation is a response associated to HLB symptoms. The results of this research suggest that it may be related with the citrus type; on the other hand, Achor *et al.* (2010) did not find differences between *C. sinensis* and *C. paradise*. Although starch evaluation was not quantitative, it was possible to

Cuadro 1. Efecto de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el floema de la nervadura central de hojas de limón mexicano (Lm), limón persa (Lp) y naranja dulce (Nd) (Estimado como área del floema de la nervadura central de hojas - hiperplasia).

Table 1. Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on phloem of the central vein structure of leaves of Mexican lemon (Lm), Persian lime (Lp), and sweet orange (Nd) (Estimated as phloem area of the central vein structure of leaves-hyperplasia).

Fecha de evaluación (2010 y 2011)	Índice de hiperplasia en área floema		
	Limón mexicano Ih	Limón persa Ih	Naranja dulce Ih
Agosto	1.5 B [†]	1.5 A	-
Septiembre	1.6 B	1.5 A	-
Octubre	1.4 B	4.7 A	-
Noviembre	48.5 C	1.9 A	31.2 B
Diciembre	101.1 B	1.3 A	1.4 B
Enero	63.8 B	2.0 A	2.7 A

[†]Medidas con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$). Ih=índice hiperplasia ♦ Means with different letter in a row are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$). Ih=hyperplasia index

hubo reacción positiva al almidón, pero fue estadísticamente menor con respecto a las sintomáticas ($p \leq 0.05$) (Figura 5).

En el mesófilo, el área con almidón fue mayor ($2989.33 \mu\text{m}^2$) en el parénquima en empalizada y esponjoso de hojas sintomáticas de Lm y Lp ($2674.04 \mu\text{m}^2$); en Nd fue mayor ($988.24 \mu\text{m}^2$) en el parénquima en empalizada (Figuras 5 y 6).

La acumulación mayor de almidón en el mesófilo de Lm ($p \leq 0.05$) probablemente esté relacionada con el amarillamiento generalizado del dosel de los árboles. Es posible que el amarillamiento sea resultado de la alteración estructural de los cloroplastos donde hay desorganización completa de los tilacoides por los gránulos de almidón (Etxeberria *et al.*, 2009). La acumulación de almidón fue dependiente de la expresión de síntomas durante el periodo evaluado, particularmente en Lm y Lp a partir del cuarto mes (Figura 5). La regresión entre la superficie de mesófilo con depósitos de almidón y el área de floema (hiperplasia) fue $r^2 = 0.84$ y $r^2 = 0.51$.

Estudios principalmente en cítricos dulces indican que la acumulación de almidón es una respuesta asociada con síntomas de HLB. Los resultados de esta investigación sugieren que la acumulación puede estar relacionada con el tipo de cítrico. Pero según, Achor *et al.*, (2010) no hay diferencias entre *C. sinensis* y *C. paradisi*. En esta investigación la evaluación de almidón no fue cuantitativa, pero fue posible la comparación estadística de su presencia en el tejido parenquimatoso del mesófilo entre los cítricos.

Proteínas

El floema de la nervadura central de hojas asintomáticas y sintomáticas de Lm, Lp y Nd mostró presencia de proteínas, pero la reacción fue mayor ($p \leq 0.05$) en hojas sintomáticas (Figura 7). Sin embargo, no se determinó la etapa o tipos celulares del floema en los cuales se inició la acumulación. Con base en la ausencia de núcleo en los elementos cribosos, se sugiere que la síntesis de proteínas tiene lugar en las células acompañantes y de ahí se translocan a los tubos cribosos. En estas células, las proteínas tienen una función fundamental en su mantenimiento y en la fisiología y desarrollo de la planta (Golecki *et al.*, 1999; Walz *et al.*, 2004) y podrían estar asociadas a las respuestas de la planta con estrés biótico y abiótico.

make the statistical comparison of its presence in parenchymatous mesophyll tissue among citrus.

Proteins

The phloem of the central vein structure of symptomatic and asymptomatic leaves of Lm, Lp, and Nd presented proteins, but the reaction was higher ($p \leq 0.05$) in symptomatic leaves (Figure 7). However, the phase or cell types of the phloem where the accumulation began, was not determined. As the sieve elements do not possess a nucleus, we suggest that protein synthesis takes place in the coexisting cells, from where they move to the sieve elements. The proteins play a fundamental role in the sustenance of these cells, as well as in physiology and development of the plant (Golecki *et al.*, 1999; Walz *et al.*, 2004) and could be associated to plant response with biotic and abiotic stress.

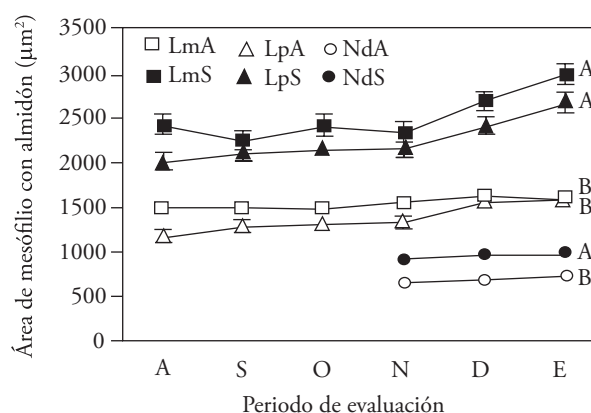


Figura 5. Desarrollo del área del mesófilo con acumulación de almidón en hojas asintomáticas (A) y con síntomas (S) de HLB en limón mexicano (Lm), limón persa (Lp) y naranja dulce (Nd). A=agosto, S=septiembre, O=octubre, N=noviembre, D=diciembre y E=enero. Progresiones sintomáticas y asintomáticas dentro de cada cítrico con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$).

Figure 5. Development of the mesophyll area with starch accumulation in asymptomatic leaves (A) and with symptoms (S) of HLB of Mexican lemon (Lm), Persian lime (Lp) and sweet orange (Nd). A=August, S=September, O=October, N=November, D=December, and E=January. Symptomatic and asymptomatic progressions within each citrus with at least one letter in common are statistically different (Tukey; $p \leq 0.05$).

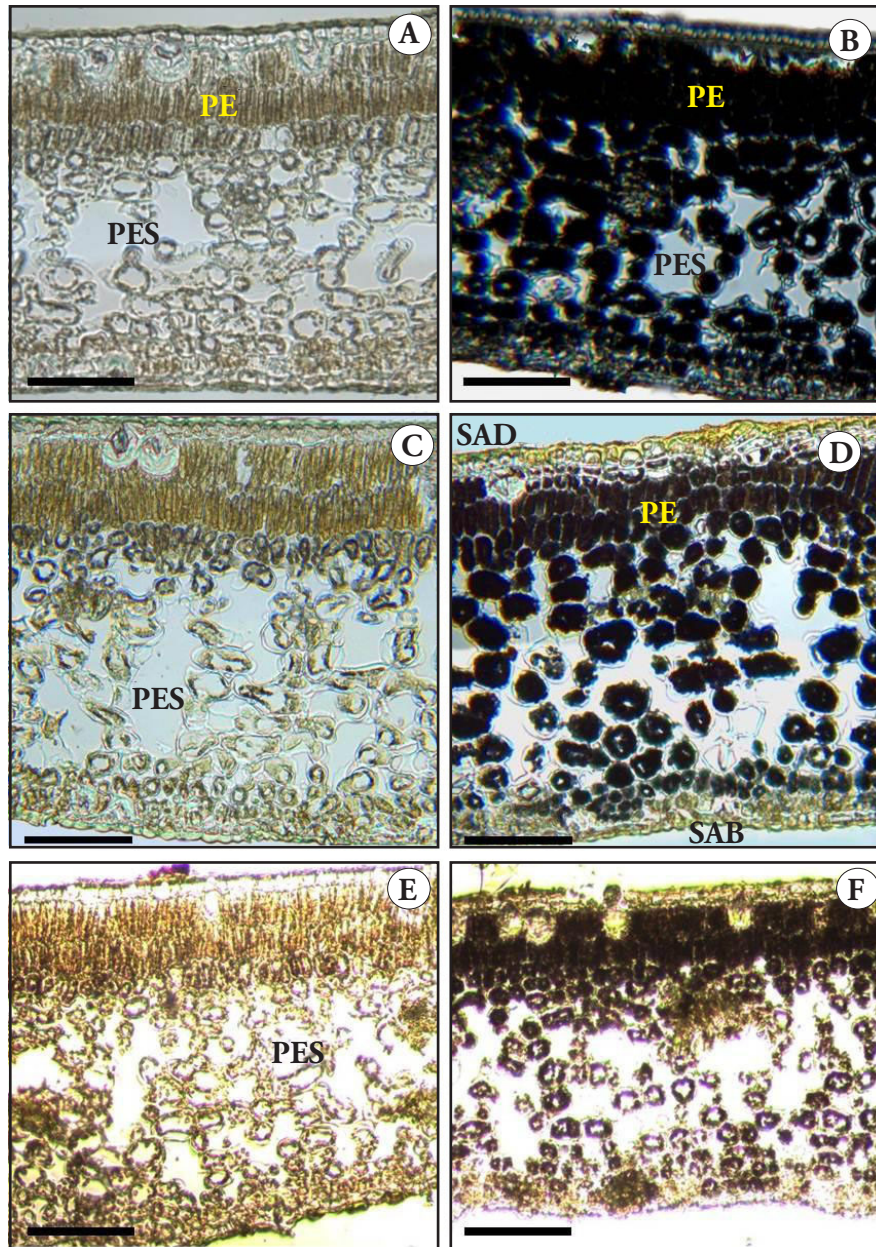


Figura 6. Fotomicrografías de secciones transversales de hojas de limón mexicano (Lm), limón persa (Lp) y naranja dulce (Nd) en el quinto mes de la detección de síntomas de HLB. Hoja asintomática de Lm (A), Lp (C) y Nd (E). Hoja sintomática de Lm (B), Lp (D) y Nd (F). Parénquima empalizada (PR), parénquima esponjoso (PES), superficie adaxial (SAD) y superficie abaxial (SAB). El color oscuro en las células indica la acumulación de almidón. Barras =100 μ m.

Figure 6. Microphotographs of cross sections of leaves of Mexican lemon (LM), Persian lime (Lp), and sweet orange (Nd) in the fifth month of detection of HLB symptoms. Asymptomatic leaf of Lm (A), Lp (C), and Nd (E); symptomatic leaf of Lm (B), Lp (D), and Nd (F). Palisade parenchyma (PR), spongy parenchyma (PES), adaxial surface (SAD) and abaxial surface (SAB). The dark color in the cells indicates starch accumulation. Bars=100 μ m.

El taponamiento de los elementos cribosos con material similar a la proteína-p (PP1 y PP2) y calosa se ha observado en hojas maduras de Nd infectadas

The blocking of the sieve tubes with material, similar to P-protein (PP1 and PP2) and callose has been observed in mature Nd leaves, infected with

con CLas (Kim *et al.*, 2009; Folimonova y Achor 2010) y de manzano (*Malus domestica*) infectadas con '*Candidatus Phytoplasma mali*' (Musetti *et al.*, 2010). Dicho taponamiento involucra la polimerización de las proteínas del floema, PP1 y PP2, asociado con la síntesis de calosa (Kim *et al.*, 2009). El presente estudio es el primer reporte de la presencia de proteínas en el floema de hojas de cítricos agrios con síntomas de HLB. La prueba histoquímica aplicada no permite determinar el tipo de proteína acumulada, como la PP1 en Nd infectada con CLas (Folimonova y Achor 2010). Por tanto, es necesario cuantificar las proteínas acumuladas y su función en los mecanismos de protección de la planta.

CONCLUSIONES

El estudio reveló que *Candidatus Liberibacter asiaticus* indujo Ih y acumulación de almidón superiores en Lm y Lp en comparación con Nd. En contraste, las diferencias de la proteína acumulada son función del tejido asintomático y sintomático. Estos cambios estructurales e histoquímicos, evaluados durante la progresión sintomatológica, se asociaron con la severidad mayor en cítricos agrios, particularmente en Lm, el cual expresó amarillamiento generalizado y abscisión foliar.

AGRADECIMIENTOS

A la institución financiadora del proyecto y becaria FONSEC SAGARPA-CONACYT 2009-108591 y CONACYT, respectivamente. A los Comités Estatales de Nayarit, Colima y Yucatán por el apoyo logístico brindado. A los miembros del GIIC por su apoyo en la planeación.

LITERATURA CITADA

- Achor, D., E. Etxeberria, N. Wang, S. Y. Folimonova., K. R. Chung, and G. Albrigo, 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with Huanglongbing disease. *Plant Pathol. J.* 9: 56-64.
- Bassanezi, B. R., L. H. Montesino, G. M. C. Gasparoto, B. A. Filho, and L. Amorim. 2011. Yield loss caused by Huanglongbing in different sweet orange cultivars in São Paulo, Brazil. *Eur J Plant Pathol.* DOI 10.1007/s10658-011-9779-1.
- Bove, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88: 7-37.
- Curtis-Patiño, J. 1986. *Microtecnica Vegetal*. Editorial Trillas. 106 p.

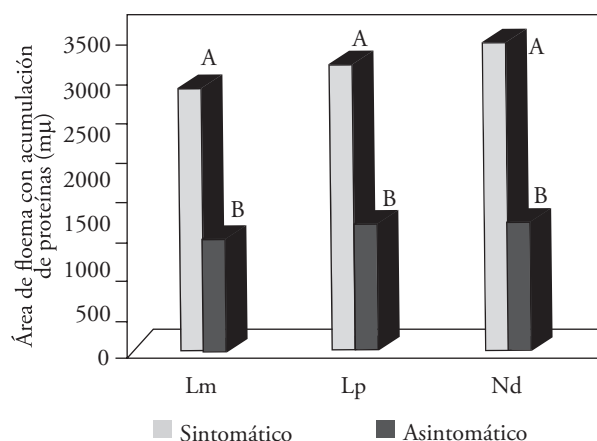


Figura 7. Área del floema con acumulación de proteínas en hojas de limón mexicano (Lm), limón persa (Lp) y naranja dulce (Nd) al sexto mes de la detección de síntomas inducidos por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Cada barra representa el promedio de 20 mediciones. Para cada cítrico, barras con letra distinta son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.5$).

Figure 7. Phloem area with protein accumulation in leaves of Mexican lemon (Lm), Persian lime (Lp), and sweet orange (Nd) in the sixth month from the detection of symptoms induced by *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Each bar represents the mean of 20 measurements. For each citrus, bars with different letter are statistically different (Tukey; $p \leq 0.5$).

CLas (Kim *et al.*, 2009; Folimonova and Achor, 2010) and apple trees (*Malus domestica*) infected with '*Candidatus Phytoplasma mali*' (Musetti *et al.*, 2010). Blocking involves polymerization of phloem proteins, PP1 and PP2, related to callose synthesis (Kim *et al.*, 2009). The present study is the first report of protein presence in phloem of sour citrus leaves with HLB symptoms. The histochemical test applied did not allow determining the protein type that accumulates, as PPI in Nd infected with CLas, (Folimonova and Achor 2010). Therefore, in future studies we expect to quantify the accumulating proteins and their role in plant protection mechanisms.

CONCLUSIONS

The study revealed that *Candidatus Liberibacter asiaticus* induced Ih and higher starch accumulation in Lm and Lp, compared to Nd. On the other hand, the differences of accumulated protein represent

- Etzeberria, E., P. González, D. Achor, and G. Albrigo. 2009. Anatomical distribution of abnormally high levels of starch in HLB-affected Valencia orange trees. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74: 76-83.
- Folimonova, S. Y., and S. D. Achor. 2010. Early events of citrus greening (huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology* 100: 09-49.
- Golecki, B., A. Schulz, and G. A. Thompson. 1999. Translocation of structural Pproteins in the phloem. *Plant Cell* 11: 127-140.
- Gottwald, T. R., J. V. da Graça, and R. B. Bassanezi. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progr.* doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV.
- Jankiewicz L. S. 2003. *Reguladores de Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas*. Universidad Autónoma Chapingo. Ediciones Mundi Prensa. México, D. F. 487 p.
- Kehr, J. 2006. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *J. Exp. Bot.* 57(4): 767-774.
- Kim, J. S., U. S. Sagaram, J. K. Burns, J. L. Li, and N. Wang. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99: 50-57.
- Koh, J. E., L. Zhou, D. S. Williams, J. Park, N. Ding, Y. P. Duan, and B. H. Kang. 2011. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". DOI 10.1007/s00709-011-0312-3.
- López C., L., G. J. Márquez, y S. G. Murguía. 2005. *Técnicas para el Estudio del Desarrollo en Angiospermas*. Editorial Las prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias UNAM. 178 p.
- Loeza-Kuk, E., J. Jasso-Argumedo, M. Lozano-Contreras, and E. Hernández-Chan. 2010. Dispersión de *Candidatus Liberibacter* spp. en huertas citrícolas de Yucatán, México. *In: Memorias del 1er Simp. Nal. Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Críticos y el Huanglongbing en México*. Monterrey, Nuevo León. pp: 125-134.
- the function of asymptomatic and symptomatic tissue. The structural and histochemical changes, assessed during symptomatologic development were associated to the high severity in sour citrus, especially in Lm, which expressed generalized yellowing and foliar abscission.
- End of the English version—
- *---
- Musetti, R., A. Paolacci, M. Ciaffi, O. A. Tanzarella, R. Polizzotto, F. Tubaro, M. Mizzau, P. Ermacora, M. Badiani, and R. Osler. 2010. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Am. Phytopathol. Soc.* 100 (4): 390-399.
- Robles G., M. M., M. J. J. Velázquez, R. M. A. Manzanilla, S. M. Orozco, V. R. Flores, y U. V. M. Medina. 2010. Síntomas del Huanglongbing en limón mexicano. Primeras observaciones. *In: Memorias del 1er Simp. Nal. sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Críticos y el Huanglongbing en México*. Monterrey, Nuevo León. pp: 141-149.
- Šutić, D. D., and J. B. Sinclair. 1991. *Anatomy and Physiology of Diseased Plants*. CRC Press, Boca Raton Florida. 232 p.
- Takushi, T., T. Toyozato, S. Kawano, S. Taba, A. Ooshiro, and M. Numazawa. 2007. Starch method for simple, rapid diagnosis of citrus huanglongbing using iodine to detect high accumulation of starch in citrus leaves. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 73: 3-8.
- Trujillo A., J. 2010. Situación actual, regulación y manejo del HLB en México. *In: Memorias del 2º Taller Internacional del Huanglongbing y el Psílido Asiático de los cítricos*. Mérida, Yucatán, México. pp: 141-149.
- Walz, C., P. Giavalisco, W. Scliad, W. Juenger, J. Klose, and J. Kelir. 2004. Proteomics of cuar bit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* 65(12): 1795-1804.