
Artículo científico

DIFERENCIAS EN LA MANIFESTACIÓN DE SÍNTOMAS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD HUANGLONGBING (HLB) EN DIFERENTES ESPECIES CÍTRICAS EN CUBA*

Camilo Paredes-Tomás¹, Maritza Luis-Pantoja¹, Cyrellys Collazo-Cordero^{1*}, Inés Peña-Bárcaga¹, Daylé López-Hernández², Lochy Batista-Le Riverend¹ y Lester Hernández-Rodríguez¹

¹Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave 7ma. no. 3005, e/ 30 y 32, Playa, La Habana. Cuba.
E-mail: fitopatologia1@iift.cu

²Empresa Agroindustrial Ceballos. Carretera a Ceballos km 9 ½ Ceballos. CP 69230 Ciego de Ávila, Cuba.

*Dirección actual: Departamento de Ciencias Alimenticias y Tecnología. Universidad de Lleida. Parc de Gardeny, Edifici Fruitcentre 25003 Lleida, España.

* Recibido: 7 de septiembre de 2015. Aceptado: 15 de diciembre de 2015

RESUMEN

Huanglongbing (HLB), la enfermedad más destructiva de los cítricos, se ha asociado con la infección por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) en Cuba. Con el objetivo de identificar diferencias en la sintomatología asociada a HLB, en el periodo 2007-2013 se colectaron 627 muestras foliares de 22 especies y cultivares cítricos. La presencia de CLAs se verificó mediante PCR convencional con los cebadores OI1/OI2c, específicos para la amplificación de su ADNr 16S. Se encontraron diferencias en la manifestación de síntomas entre los cultivares y se establecieron seis grupos. Los limeros y limoneros presentaron moteado asimétrico caracterizado por manchas angulares. En los trifoliados se manifestó raramente el moteado asimétrico difuso, mientras que los naranjos dulces, tangelos, pomelos y patrones ácidos mostraron manchas de forma y tamaño variables, de color verde oscuro contrastante. Los resultados son aplicables en prospecciones para el manejo de HLB en el sistema de certificación de cítricos en Cuba.

Palabras clave: Moteado asimétrico, síntomas de HLB, manifestación diferencial

Differences in manifestation of symptoms associated to huanglongbing disease in different *Citrus* species in Cuba

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB), the most destructive citrus disease worldwide, has been associated with infection by the bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) in Cuba. In order to identify differences in the symptoms associated with HLB, in 2007-2013, 627 leaf samples from 22 species and cultivars of citrus were collected. The presence of CLAs was verified by standard PCR with primer pair specific OI1 / OI2c, specific for the amplification of its 16S rDNA. Differences were found in the manifestation of symptoms among cultivars and species tested and six groups were established. The lime and lemon trees showed blotchy mottle characterized by angular spots. Symptoms as asymmetric blotchy-mottle rarely was expressed in trifoliate while sweet oranges, tangelos, grapefruits and acid patterns showed blotches of varying shapes and sizes, dark green contrasting. The survey results are applicable to the disease management on citrus in the certification system in Cuba.

Key words: Blotchy mottle, HLB-symptoms, differential manifestation

INTRODUCCIÓN

Huanglongbing (HLB) se considera la enfermedad más destructiva de los cítricos a nivel mundial (Bové, 2014). Esta enfermedad se ha asociado con la infección por tres especies de bacterias clasificadas dentro del género '*Candidatus*' (Ca.) *Liberibacter* (L.). Estas bacterias se han nombrado como: *Ca. L. asiaticus* (CLAs), *Ca. L. africanus* (CLaf) y *Ca. L. americanus* (CLam), según la región geográfica en la cual se caracterizaron por primera vez (Garnier *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2005 a y c). Además, se han informado varios fitoplasmas asociados a síntomas similares a los de HLB en varias especies cítricas (Teixeira *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Lou *et al.*, 2013; Arrastia-Castro *et al.*, 2014; Poghosyan *et al.*, 2015).

Los síntomas de HLB comienzan a manifestarse en la planta después de un período de latencia que oscila entre seis meses y un año (Hung *et al.*, 2000). Una de las primeras manifestaciones es el amarillamiento de alguno de los brotes de la planta infectada. Este síntoma se presenta inicialmente en sectores y se extiende por todo el árbol en estadios más avanzados de la enfermedad. El síntoma más característico de los asociados a HLB es el moteado asimétrico difuso de las hojas, que se manifiesta con manchas verdes y amarillas sin bordes definidos, distribuidas de manera diferente a uno y otro lado de la nervadura central. Esta asimetría diferencia este síntoma de otros como la clorosis internervial provocada por la deficiencia de zinc (Lin, 1956; McClean y Schwarz, 1970; Bové, 2014).

HLB afecta a todos los cultivares cítricos, sin embargo, la manifestación y severidad de los síntomas son variables en las diferentes especies (Folimonova *et al.*, 2009). Trabajos previos describieron un grupo de genotipos cítricos más susceptibles a la enfermedad y demostraron diferencias significativas en la reacción de las plantas hospederas (Kim *et al.*, 2009). Se ha descrito que algunos genotipos como naranjo dulce, tangelo y mandarinos, muestran mayor grado de susceptibilidad que otras especies como los limeros y los trifoliados. Sin embargo, no se ha encontrado resistencia genética a la enfermedad (Knapp *et al.*, 2004). La manifestación de los síntomas está estrechamente relacionada con el efecto que produce el patógeno en los tejidos vegetales. La presencia de las bacterias en los vasos conductores del floema ocasiona la obstrucción de poros del sistema vascular, debido fundamentalmente a la activación del gen pp2 que participa en la deposición de calosa (Kim *et al.*, 2009).

El conocimiento de la sintomatología asociada a HLB en las plantaciones es determinante para el muestreo y posterior diagnóstico molecular de la enfermedad, debido a la distribución irregular del patógeno y su bajo título en la planta. Las diferencias en la manifestación del síntoma del moteado asimétrico difuso en las especies cítricas, impone un reto adicional a los rastreadores para identificar las plantas posiblemente afectadas por HLB en las plantaciones. La caracterización y descripción de estos síntomas foliares en una gama de genotipos distintos provee una información valiosa para el examen de la interacción hospedero-patógeno y de la tolerancia en diferentes especies y cultivares. Además constituye una herramienta de diagnóstico de la enfermedad para un mejor manejo. Teniendo en cuenta esto, el objetivo de este estudio fue caracterizar la sintomatología asociada a HLB observada en 22 especies y cultivares cítricos plantados en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prospecciones para identificar síntomas asociados a HLB y colecta de material vegetal

Durante el periodo de 2007 a 2013 se inspeccionaron 63 plantaciones adultas y de fomento de las empresas de cítricos del Grupo Empresarial Frutícola, localizadas en las provincias y localidades: Pinar del Río, Artemisa (Ceiba del Agua), Matanzas (Jagüey Grande), Cienfuegos (Arimao), Ciego de Ávila (Ceballos), Camagüey (Sola), Granma (Jiguaní), Holguín (Jíquima y Banés), Santiago de Cuba (Contramaestre) y la Isla de la Juventud. Además, se inspeccionaron jardines y patios del sector urbano de las provincias donde no había plantaciones comerciales de cítricos: La Haba-

na, Sancti Spíritus, Las Tunas, Villa Clara y Guantánamo, así como la colección de cultivares de Jagüey Grande. En cada área inspeccionada se muestrearon tanto plantaciones jóvenes (1-5 años) como adultas (más de 6 años). Se realizó una descripción detallada de la sintomatología foliar asociada a HLB (moteado asimétrico, venas cloróticas y/o corchosas) en todas las especies y cultivares analizados (Tabla I) y se fotografiaron los síntomas. Se colectaron de cinco a diez hojas de cada planta sintomática para un total de 627 muestras foliares, las que se guardaron en bolsas plásticas y se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio para la confirmación del diagnóstico visual mediante métodos de detección molecular.

Extracción de ADN foliar y ensayos de PCR para la detección de CLas

La extracción de ADN total de las hojas se realizó mediante el método de CTAB (cetil trimetil bromuro de amonio) propuesto por Murray y Thompson (1980). En las especies y cultivares analizadas se realizó la confirmación de la presencia de CLas mediante una PCR convencional, utilizando los cebadores OI1/OI2c, específicos para la amplificación del ADN_r 16S de esta bacteria (Jagoueix *et al.*, 1996). La reacción se llevó a cabo en 40 µl de volumen final y con la siguiente composición: Tampón de PCR 1X (20 µM de Tris-HCl pH 8.4 y 50 µM KCl) (Invitrogen), 2.5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0.5 µM de cada cebador, 200 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1.5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 500 ng/µl de ADN. La reacción se realizó en un termociclador de gradiente Eppendorf con el siguiente programa: 40 ciclos, cada uno de 94 °C por 40 s, 68 °C por 40 s y 72 °C por 50 s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de síntomas asociados a HLB:

En todas las especies y cultivares analizados (ver Tabla I), incluyendo tanto cultivares comerciales como los utilizados como patrón o portainjerto, la edad de las plantas no influyó en la visualización de los síntomas. Estos se localizaron fácilmente, tanto en plantaciones jóvenes (1-5 años) como adultas (más de 6 años). Los síntomas foliares observados incluyeron: brotes cloróticos, moteado asimétrico difuso y nervadura engrosada, amarilla o con apariencia corchosa. En general, las hojas afectadas tuvieron una textura coriácea. Fue frecuente encontrar hojas mostrando deficiencia de zinc. El moteado asimétrico difuso se observó de manera diferente en dependencia de la especie afectada, lo que coincide con lo descrito por otros autores (Bové, 2006; Sutton *et al.*, 2005). El síntoma de clorosis simétrica internervial asociado a la deficiencia de zinc se encontró con frecuencia, pero solo se tuvo en

Tabla 1. Especies y cultivares cítricos analizadas en las prospecciones realizadas en varias provincias del país durante el periodo 2007-2013.

Especies y cultivares	Cantidad de plantas colectadas
<i>Citrus macrophylla</i> Webster	14
<i>Poncirus trifoliata</i>	4
Citrumelo 'FCO-18' (<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>)	3
Citrango Carrizo (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb x <i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf.)	8
<i>Citrus volkameriana</i> Ten & Pasq.	19
Limero 'mexicano' (<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swing.)	30
Limero 'Persa' (<i>C. latifolia</i> Tan.)	168
Limero 'Rangpur' (<i>C. limonia</i> Osb.)	3
Mandarino 'Cleopatra' (<i>Citrus reshni</i> Hort. ex Tan.)	7
Mandarino 'Clementina' (<i>C. aurantifolia</i>)	1
Mandarino 'Maribel' (<i>C. Clementina</i> x <i>C. sinensis</i>)	2
Mandarino 'Satsuma' (<i>C. unshiu</i> Mak. Marc.)	3
Naranja Agrio (<i>C. aurantium</i> L.)	10
Naranja 'Navel' (<i>Citrus sinensis</i> L. Osb.)	16
Naranja 'Valencia' (<i>Citrus sinensis</i> cv. Valencia)	153
Naranja dulce 'Blanco' (<i>C. sinensis</i>)	1
Tangelo 'Nova' (<i>C. clementina</i> x <i>C. paradisi</i> x <i>C. tangerina</i>)	2
Tangerina 'Dancy' (<i>C. tangerina</i>)	2
Pummelo (<i>C. grandis</i>)	4
Pomelo 'Ray Ruby' (<i>C. paradisi</i> Macf.)	10
Pomelo 'Ruby Red' (<i>C. paradisi</i> Macf.)	5
Pomelo 'Marsh' (<i>C. paradisi</i> Macf.)	162
Total	627

cuenta cuando apareció el moteado asimétrico. Todas las muestras colectadas resultaron positivas para la presencia de CLas (resultados no mostrados).

Teniendo en cuenta las diferencias en la manifestación de los síntomas entre las especies y cultivares que se observaron en las prospecciones, éstas se separaron en seis grupos. En los patrones trifoliados evaluados (Grupo 1), el moteado asimétrico se manifestó con poca frecuencia en las plantas infectadas (Figura 1). Ello está en correspondencia con lo planteado por Nariani (1981), quien observó poca manifestación de síntomas en *Poncirus trifoliata* (L) Raf. e híbridos trifoliados. En estudios previos se ha informado que Citrange Carrizo presenta algún grado de tolerancia respecto a otras especies más susceptibles al considerar la manifestación de síntomas (Folimonova et al., 2009; Albrecht y Bowman, 2012). Incluso, se ha observado que la bacteria no se multiplica con facilidad en este cultivar, aunque sobrevive y se puede transmitir a otro hospedero (Folimonova et al., 2009; Stover et al., 2010). Fue más frecuente que se manifestaran síntomas de deficiencia de zinc y de clorosis generalizada en todo el limbo. La nervadura engrosada fue muy característica.

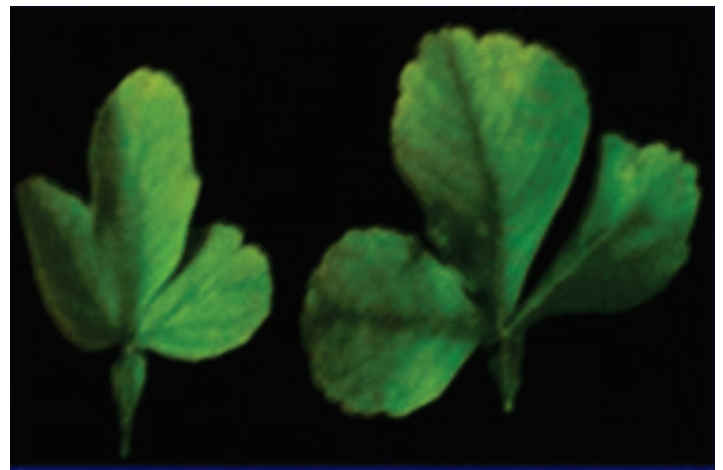


Fig 1. Manifestación de síntomas foliares asociados a HLB en plantas del Grupo 1 (*Poncirus trifoliata*).

En el caso de los mandarinos (Grupo 2), el moteado asimétrico difuso se caracterizó por pequeñas manchas redondeadas o en forma de punteadas, distribuidas en forma de mosaico por todo el limbo, sin marcada asimetría respecto a la nervadura central (Figura 2). Las manchas fueron de color verde oscuro que contrastaron con el verde más claro del resto de

la hoja. Las hojas tendieron a torcerse y enrollarse. La nervadura no fue marcadamente engrosada, pero sí se pudieron encontrar cloróticas.



Fig 2. Manifestación de síntomas foliares asociados a HLB en plantas del Grupo 2 (Mandarino Clementina).

En los naranjos dulces y tangerinos (Grupo 3), el moteado asimétrico difuso se caracterizó por manchas de formas y tamaños variables (Figura 3). Generalmente las manchas se observaron grandes, dispuestas con marcada asimetría respecto a la nervadura central y de color verde oscuro, que contrastaron con el tono más claro del resto de la hoja. Con frecuencia se pudieron observar zonas más claras hacia el margen de un hemisferio del limbo, limitadas por la nervadura secundaria marginal. Las nervaduras centrales y secundarias se observaron cloróticas o corchosas.



Fig 3. Manifestación de síntomas foliares asociados a HLB en plantas del Grupo 3 (Naranja dulce Valencia).

En los grupos 2 y 3 los síntomas tuvieron una manifestación más notable y frecuente respecto a los otros grupos. Según la literatura, son las especies más susceptibles a la enfermedad (Lopes y Frare, 2008; Folimonova *et al.*, 2009). Se han informado cambios anatómicos significativos en el floema y en el transporte de nutrientes, lo que pudiese estar relacionado con la susceptibilidad y la expresión de los síntomas (Fan *et al.*, 2013). Estudios más recientes han demostrado que la distribución de la bacteria es más uniforme en las raíces que en la copa, incluso luego de la aparición de los síntomas. Esto sugiere que la invasión temprana del tejido radical por CLas conduce al declinamiento de las raíces antes de la aparición de síntomas y constituye la causa principal de la disminución del rendimiento (Johnson *et al.*, 2014).

Los patrones de frutos ácidos (Grupo 4), se caracterizaron por manchas de formas irregulares y tamaño mediano, dispuestas con marcada asimetría respecto a la nervadura central (Figura 4). Las manchas presentaron un contraste mayor de los tonos de verde que en el caso de los naranjos dulces. La nervadura se observó engrosada, clorótica y con baja frecuencia corchosa. Se ha notificado que *C. volkameriana* y naranja Agrio presentan una tolerancia moderada, ya que permite una elevada concentración de la bacteria en sus tejidos, lo que indica que la bacteria se multiplica con facilidad en ellos y puede explicar la manifestación notable de síntomas (Folimonova *et al.*, 2009). Sin embargo, la afectación y severidad del estado de salud de la planta son amortiguadas.



Fig 4. Manifestación de síntomas foliares asociados a HLB en plantas del Grupo 4 (Naranja Agrio).

En los pomelos, pummelos y tangelos (Grupo 5) el moteado asimétrico difuso se caracterizó por manchas en formas de punteadura con bordes difusos, de muy pequeño tamaño (Figura 5). Las manchas se distribuyeron irregularmente por todo el limbo, con asimetría menos marcada respecto a la nervadura central y con poco contraste entre los colores verde y amarillo. Las nervaduras centrales se observaron engrosadas, cloróticas o corchosas. Trabajos previos informaron como un cultivar sensible al pomelo Ruby Red; sin embargo, el título bacteriano fue moderadamente elevado (Folimonova *et al.*, 2009).

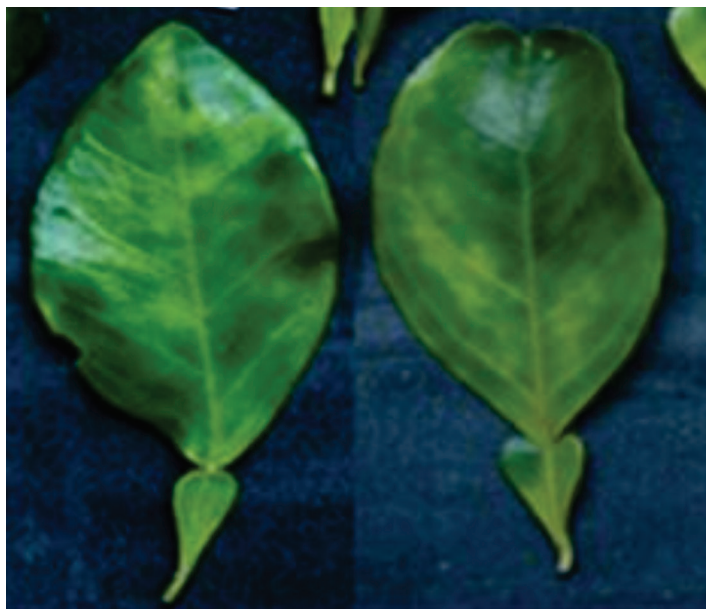


Fig 5. Manifestación de síntomas foliares asociados a HLB en plantas del Grupo 5 (Pomelo Marsh).

En los limeros ácidos y limoneros (Grupo 6) fueron frecuentes manchas angulosas, usualmente de forma triangular, dispuestas con marcada asimetría respecto a la nervadura central de la hoja (Figura 6). El color de estas se distinguió por un verde oscuro, muy contrastante respecto al verde claro o amarillo del resto del limbo. La nervadura central fue marcadamente engrosada y se manifestaron venas corchosas con mayor frecuencia que cloróticas. Folimonova *et al.* (2009), informaron moderada tolerancia a HLB en plantas de limero Mexicano con un elevado título bacteriano en sus tejidos.

Como resultado de este trabajo se elaboró un laminario que se distribuyó en las empresas citrícolas a nivel nacional y se utiliza en las prospecciones como parte de las medidas para el control de HLB. Además, constituye una herramienta auxiliar vital para los rastreadores que señalizan las plantas con HLB en los campos de fomento para su posterior erradicación.



Fig 6. Manifestación de síntomas foliares asociados a HLB en plantas del Grupo 6. (Limero Persa).

CONCLUSIONES

1. Los síntomas asociados a HLB se manifestaron diferencialmente entre las especies y cultivares evaluados, lo que permitió clasificarlos en seis grupos diferentes.
2. El laminario resultante constituye una herramienta auxiliar de gran importancia en la identificación de plantas enfermas para su posterior erradicación, contribuyendo así al manejo de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, U. & Bowman, K. D. 2012. Tolerance of trifoliate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae*, 147: 71-80.
- Arratia-Castro, A. A., Santos-Cervantes, M. E., Fernández-Herrera, E., Chávez-Medina, J. A., Flores-Zamora, G. L., Camacho-Beltrán, E., & Leyva-López, N. E. 2014. Occurrence of '*Candidatus Phytoplasma asteris*' in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection*. 62: 144-151.
- Bové J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88 (1): 7-37.
- Bové, J.M. 2014. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: Will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica* 42(5): 579-583.
- Chen, J., Pu, X., Deng, X., Liu, S., Li, H., & Civerolo, E. 2009. A Phytoplasma Related to '*Candidatus Phytoplasma asteris*' Detected in Citrus Showing Huanglongbing (Yellow Shoot Disease) Symptoms in Guangdong, PR China. *Phytopathology* 99(3): 236-242.
- Fan, J., Chen, C., Achor, D. S., Brlansky, R. H., Li, Z. G., & Gmitter Jr, F. G. 2013. Differential anatomical responses of tolerant and susceptible citrus species to the infection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 83: 69-74.

- Folimonova, S. Y., Robertson, C. J., Garnsey, S. M., Gowda, S., & Dawson, W. O. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99(12): 1346-1354.
- Garnier, M., Jagoueix-Eveillard, S., Cronje, P., Le Reoux, H., & Bové, J.M. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in Western Cape Province of South Africa. Proposal of *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50 (6): 2119-2125.
- Hung, T. H., Wu, M. L., Su, H. J. 2000. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. *J. Phytopathology* 148 (6): 321-326.
- Jagoueix, S., Bové, J. M., & Garnier, M. 1996. PCR detection of the two «*Candidatus*» liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and Cellular Probes.* 10(1): 43-50.
- Johnson, E. G., Wu, J., Bright, D. B. and Graham, J. H. 2014. Association of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' root infection, but not phloem plugging with root loss on huanglongbing-affected trees prior to appearance of foliar symptoms. *Plant Pathology* 63: 290-298.
- Kim, J. S., Sagaram, U. S., Burns, J. K., Li, J. L., & Wang, N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99 (1): 50-57.
- Knapp, J.L., Halbert, S., Lee, R., Hoy M., Clark, R., Kesinger, M. 2004. The Asian citrus psyllid and citrus greening disease. Agricultural IPM: Fruit (citrus) Florida. IFAS, University of Florida. <http://www.ipm.ifas.ufl.edu>.
- Lin, K. H. 1956. Yellow shoot of citrus. Symptomatology. Investigations in the cause of huanglongbing. Natural transmission and spread. General conclusions. *Acta Phytopathol. Sinica.* 2: 1-42.
- Lou, B., Bai, X., Bai, Y., Deng, C., RoyChowdhury, M., Chen, C., & Song, Y. 2014. detection and Molecular Characterization of a 16SrII A* Phytoplasma in Grapefruit (*Citrus paradisi*) with Huanglongbing like Symptoms in China. *Journal of Phytopathology* 162(6): 387-395.
- McClellan A.P.D., Schwarz R.E., 1970. Greening or blotchy mottle disease of citrus. *Phytophylactica.* 2: 177-194.
- Murray, M. G., & Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research.* 8(19): 4321-4326.
- Poghosyan, A., Hernandez-Gonzalez, J. A., Lebsky, V., Palacios-Carriel, C., Gallou, A., & Andrade-Michel, G. 2015. First Report of '*Candidatus Phytoplasma asteris*' in kumquat (*Citrus japonica*) with HLB-like Symptoms in La Paz, Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease.* 99 (4): 552-552.
- Stover, E., Shatters Jr, Robert, McCollum, Greg, Hall, D. G., & Duan, Yongping. 2010. Evaluation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* titer in field-infected trifoliate cultivars: Preliminary evidence for HLB resistance. *In Proc. Fla. State Hort. Soc.* 123: 115-117.
- Sutton, D.B., Duan, Y.P., Kitajima, E.W., Halbert, S., Sun, X.A., Schubert, T., Dixon, W. 2005. Detection and identification of citrus Huanglongbing (greening) in Florida, Abstract In: Proceedings of the International Workshop Huanglongbing-Greening, Orlando, Florida: 59 pp.
- Teixeira, D. C., Wulff, N. A., Martins, E. C., Kitajima, E. W., Bassanezi, R., Ayres, A. J., & Bové, J. M. 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology.* 98(9): 977-984.
- Zreik, L., Carle, P., BOV, J. M., & Garnier, M. 1995. Characterization of the Mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism "*Candidatus phytoplasma aurantifolia*". *International Journal of Systematic Bacteriology* 45(3): 449-453.

CITRIFRUT JOURNAL PUBLISHING STANDARDS (cont.)

Books: Author (s). Year. Title of the Book. Volume. City. Publisher. Pages of the Book.

Chapters of Books: Author (s) of the Chapter. Year. Title of the Chapter. In: Author(s) or Publisher (s) of the Book. Title of the Book. Volume. City. Publisher. Pages.

Periodical Publications: Author (s). Year. Title of the work. Name of the review or acknowledged abbreviation in italics according to the List of Title Word Abbreviations. Volume (number): pages.

Bulletins: Author. Year. Title and sub title. Name of the Institution that publishes it. Name and number of the series.

Digital Publications: Author (s) of the page. Date of the publication if available. Title of the page or location in italics. Recovered (date of access), from (address http or www)

Bibliography References

In the text the bibliography references will appear in the following way:

For an author: (García, 2010) or García (2010)

For two authors: (Velázquez and Batista, 2011) or Velázquez and Batista (2011)

For more than two authors: (Sosa et al., 2013) or Sosa et al. (2013)

Figures and Tables

They will be included when there are strictly essential and don't repeat the information referred in the text; they should be presented with the maximum possible printing quality and at the end of the main text: the photos should have a minimum resolution of 300 dpi in JPG or TIF format, any kind of printed image will not be accepted or those worked with Power Point and should indicate the source from where they were taken.

THE EDITORIAL COMMITTEE RESERVES THE RIGHT TO REJECT THOSE ARTICLES THAT NOT ACCOMPLISH WITH THE PUBLISHING STANDARDS OF THE REVIEW.

IT'S RESPONSIBILITY OF THE AUTHOR ALL RELATED WITH THE PUBLICATION SUBMITTED