

## Endosymbionts associated with *Diaphorina citri*, vector of *Candidatus Liberibacter asiaticus*

## Endosimbiontes asociados a *Diaphorina citri*, vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Mireya Paloma López-San Juan<sup>1</sup>; Laura Delia Ortega-Arenas<sup>1</sup>; José Abel López-Buenfil<sup>2</sup>; José Manuel Cambron-Crisantos<sup>2</sup>; Marco Antonio Magallanes-Tapia<sup>3</sup>; Cristian Nava-Díaz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Programa de Fitosanidad-Fitopatología. Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

<sup>2</sup>Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Unidad Integral de Servicios, Diagnóstico y Constatación. Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, Tecámac, Estado de México, C. P. 55740, MÉXICO.

<sup>3</sup>Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología Agrícola. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes, núm. 250, Guasave, Sinaloa, C. P. 81101, MÉXICO.

\*Corresponding author: [cnav@colpos.mx](mailto:cnav@colpos.mx), tel. 55 29 70 91 57.

### Abstract

*Diaphorina citri* is considered the most dangerous citrus pest because it transmits *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the causal agent of Huanglongbing (HLB). Like other hemiptera insects, *D. citri* has developed mutualistic interactions with prokaryotic organisms known as endosymbionts. This symbiosis can be obligatory, when the interaction occurs with a primary endosymbiont, or facultative, when it is a secondary endosymbiont. Symbiosis is essential for various physiological functions, but some endosymbionts can adversely affect the psyllid's abilities. *D. citri* is associated with a great diversity of endosymbionts, with *Candidatus Carsonella ruddii*, *Candidatus Proffella armatura*, *Candidatus Wolbachia* spp. and *Candidatus Liberibacter* spp standing out. The aim of this review was to explore the importance and function of endosymbionts associated with *D. citri*, as well as their role in the transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

**Keywords:** symbiotic relationship, prokaryotes, *Candidatus Wolbachia*, transmission.

### Resumen

*Diaphorina citri* se considera la plaga más peligrosa de los cítricos debido a que transmite a *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal del Huanglongbing (HLB). Al igual que otros insectos hemípteros, *D. citri* ha desarrollado interacciones mutualistas con organismos procariontes conocidos como endosimbiontes. Esta simbiosis puede ser de tipo obligatoria, cuando la interacción se da con un endosimbionte primario, o no obligatoria, cuando se trata de un endosimbionte secundario. La simbiosis es indispensable para diversas funciones fisiológicas, pero algunos endosimbiontes pueden afectar de manera adversa las capacidades del psílido. *D. citri* se asocia a una gran diversidad de endosimbiontes, en donde sobresale *Candidatus Carsonella ruddii*, *Candidatus Proffella armatura*, *Candidatus Wolbachia* spp. y *Candidatus Liberibacter* spp. El objetivo de la presente revisión fue explorar la importancia y función de los endosimbiontes asociados a *D. citri*, así como su papel en la transmisión de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

**Palabras clave:** relación simbiótica, procariontes, *Candidatus Wolbachia*, transmisión.



## Introduction

The nutritional imbalance that occurs in insects, due to a diet based solely on sap, has resulted in a mutualistic association with prokaryotic or endosymbiont organisms found within the insect in specialized cells called bacteriocytes (Baumann et al., 1995; Buchner, 1965; Dixon, 1998). Endosymbionts have been shown to be involved in metabolic processes such as food synthesis and digestion, as well as in the recycling of nitrogenous waste (Subandiyah, Nikoh, Tsuyumu, Somowiyarjo, & Fukatsu, 2000; Su, Zhou, & Zhang, 2013). However, some of these bacteria negatively interfere with the metabolic functions of their host or activate the plant's defense mechanism during the feeding process (Chaudhary, Atamian, Shen, Briggs, & Kaloshian, 2014; Feldhaar & Gross, 2009).

Endosymbionts are classified, according to their function, into two groups: primary and secondary. The primary ones have an obligatory-mutualistic relationship with the host insect and are transmitted vertically from mother to offspring, while the secondary ones may or may not be necessary for the insect's survival; their transmission is horizontal, but once inside the insect it becomes vertical (Eleftherianos, Atri, Accetta, & Castillo, 2013; Su et al., 2013).

The presence of a great diversity of endosymbionts associated with *Diaphorina citri*, mainly *Candidatus Carsonella ruddii*, *C. Proffrella armatura*, *C. Wolbachia* spp. and *C. Liberibacter* spp., has been found (Gill, Chu, & Pelz-Stelinski, 2016; Hussain et al., 2017; Subandiyah et al., 2000). The Asian citrus psyllid, *D. citri* Kuwayama (Liviidae), is considered the most dangerous pest of this crop because it transmits *C. Liberibacter* spp., the causal pathogen of Huanglongbing (HLB) (Hall, Richardson, Ammar, & Halbert, 2013). *D. citri* was first described in 1907 with the name of *Euphalarus citri* (Halbert & Manjunath, 2004). In India, the transmission efficiency of *C. Liberibacter asiaticus* (CLas) by *D. citri* was determined by observing the first symptoms in plants between 25 and 40 days after exposure to psyllids that previously fed on infected plants. These insects also carried the citrus tristeza virus (CTV); however, they were unable to transmit it, which demonstrated their close relationship with the bacterium (Capoor, Rao, & Viswanath, 1967).

In Mexico, HLB is associated with CLas and mainly affects sour citrus fruits such as Mexican lime (*Citrus aurantifolia* [Christm] Swingle) (Esquivel-Chávez et al., 2012), contrary to reports from Brazil and the United States, where this disease has a greater impact on sweet citrus fruits (Bové, 2006; Gottwald, da Graça, & Bassanezi, 2007). Mexico's Pacific region is considered to be at high risk of suffering an HLB epidemic and its

## Introducción

El desequilibrio nutricional que ocurre en los insectos, debido a una dieta basada únicamente en savia, ha resultado en una asociación mutualista con organismos procariontes o endosimbiontes que se encuentran dentro del insecto en células especializadas denominadas bacteriocitos (Baumann et al., 1995; Buchner, 1965; Dixon, 1998). Se ha demostrado que los endosimbiontes se involucran en procesos metabólicos como la síntesis y digestión de alimento, así como en el reciclaje de desechos nitrogenados (Subandiyah, Nikoh, Tsuyumu, Somowiyarjo, & Fukatsu, 2000; Su, Zhou, & Zhang, 2013). No obstante, algunas de estas bacterias interfieren negativamente en las funciones metabólicas de su hospedero o activan el mecanismo de defensa de la planta durante el proceso de alimentación (Chaudhary, Atamian, Shen, Briggs, & Kaloshian, 2014; Feldhaar & Gross, 2009).

Los endosimbiontes se clasifican, de acuerdo con su función, en dos grupos: primarios y secundarios. Los primarios presentan una relación obligatoria-mutualista con el insecto hospedero y se transmiten verticalmente de madre a hijos, mientras que los secundarios pueden o no ser necesarios para la supervivencia del insecto; su transmisión es horizontal, pero una vez dentro del insecto se vuelve vertical (Eleftherianos, Atri, Accetta, & Castillo, 2013; Su et al., 2013).

Se ha encontrado la presencia de una gran diversidad de endosimbiontes asociados a *Diaphorina citri*, principalmente *Candidatus Carsonella ruddii*, *C. Proffrella armatura*, *C. Wolbachia* spp. y *C. Liberibacter* spp. (Gill, Chu, & Pelz-Stelinski, 2016; Hussain et al., 2017; Subandiyah et al., 2000). El psílido asiático de los cítricos, *D. citri* Kuwayama (Liviidae), se considera la plaga más peligrosa de este cultivo debido a que transmite a *C. Liberibacter* spp., patógeno causal del Huanglongbing (HLB) (Hall, Richardson, Ammar, & Halbert, 2013). *D. citri* se describió por primera vez en Shinchiku, Taiwan, en 1907 con el nombre de *Euphalarus citri* (Halbert & Manjunath, 2004). En India, se determinó la eficiencia de transmisión de *C. Liberibacter asiaticus* (CLas) por *D. citri* al observar los primeros síntomas en plantas entre los 25 y 40 días después de la exposición a psílicos previamente alimentados de plantas infectadas. Dichos insectos también portaban al virus de la tristeza de los cítricos (CTV); sin embargo, no fueron capaces de transmitirlo, lo que evidenció su estrecha relación con la bacteria (Capoor, Rao, & Viswanath, 1967).

En México, el HLB se asocia a CLas y afecta principalmente a cítricos agrios como el limón mexicano (*Citrus aurantifolia* [Christm] Swingle) (Esquivel-Chávez et al., 2012), contrario a lo reportado

consequent commercial impact due to the occurrence and intensity of the disease (Mora-Aguilera et al., 2014; Salcedo et al., 2010).

Endosymbionts, as well as their role in the insect vector and in the transmission of CLas, belong to one of the least studied lines of research today. Therefore, the aim of this review was to explore the importance and function of endosymbionts associated with *D. citri*, and their role in the transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

## Methodology

The information in this paper was obtained from the following databases, search engines, journals and full-text books: ACSESS, Agris, Agricola, American Association for the Advancement of Science, Annual Reviews Sciences Collection, Association for Computing Machinery Base, BioOne, Cold Spring Harbor Laboratory, CORE, CRC net BASE, CRC Press, Crossref, Dimensions, EBSCO, ELSEVIER, Europe PubMed Central, Global NDLTD, Google Scholar, Harvard Dataverse, JSTOR, Microsoft Academic, Nature, Oxford Academic, PNAS, PROQUEST, PubMed, Redalyc, Scholixplorer, SciELO, Science, ScienceOpen, Scopus, SpringerLink, SpringerNature, Taylor and Francis, Web of Science Group, Wiley-Blackwell, Wisdom and Zenodo.

## Transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by *D. citri*

The damage caused by *D. citri* adults and nymphs feeding on citrus trees consists of a distortion in shoots and an alteration in the growth of young trees. However, its main importance lies in its function as a transmitter of CLas (Ortega-Arenas, Villegas-Monter, Ramírez-Reyes, & Mendoza-García, 2013). The insect acquires the bacterium between 5 and 7 hours after feeding on diseased plants, with a transmission efficiency of 40 % (Ammar, Ramos, Hall, Dawson, & Shatters, 2016). *D. citri* adults have an 8-h probing period in 40 % of CLas-infected plants, while in healthy plants it is shorter (Luo et al., 2015). This behavior can be attributed to the histological change that the leaves undergo due to infections caused by CLas, since it causes a thickening of the leaf cuticle and the accumulation of starch, which could explain the long period spent probing for ideal feeding sites (Cen et al., 2012a; Luo et al., 2015).

CLas establishes a persistent circulative relationship in its transmitter (Inoue et al., 2009). When adults free of the bacterium feed on CLas-positive trees, they require from 1 to 25 days to be able to transmit it to a healthy tree, while individuals from nymphs fed on positive trees are infected as soon as they emerge (Ammar et al., 2016), this because the bacterial load in nymphal stages increases considerably in a shorter period than in

en Brasil y Estados Unidos, donde esta enfermedad presenta mayor impacto en cítricos dulces (Bové, 2006; Gottwald, da Graça, & Bassanezi, 2007). La región del Pacífico en México se considera de alto riesgo epidémico e impacto comercial por el HLB debido a la ocurrencia e intensidad de la enfermedad (Mora-Aguilera et al., 2014; Salcedo et al., 2010).

Los endosimbiontes, así como su papel en el insecto vector y en la transmisión de CLas, pertenecen a una de las líneas de investigación menos estudiadas en la actualidad. Por ello, el objetivo de la presente revisión fue explorar la importancia y función de los endosimbiontes asociados a *D. citri*, y su papel en la transmisión de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

## Metodología

La información del presente documento se obtuvo de las siguientes bases de datos, buscadores, revistas y libros de texto completo: ACSESS, Agris, Agricola, American Association for the Advancement of Science, Annual Reviews Sciences Collection, Association for Computing Machinery Base, BioOne, Cold Spring Harbor Laboratory, CORE, CRC net BASE, CRC Press, Crossref, Dimensions, EBSCO, ELSEVIER, Europe PubMed Central, Global NDLTD, Google Scholar, Harvard Dataverse, JSTOR, Microsoft Academic, Nature, Oxford Academic, PNAS, PROQUEST, PubMed, Redalyc, Scholixplorer, SciELO, Science, ScienceOpen, Scopus, SpringerLink, SpringerNature, Taylor and Francis, Web of Science Group, Wiley-Blackwell, Wisdom y Zenodo.

## Transmisión de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por *D. citri*

El daño que ocasiona la alimentación de adultos y ninfas de *D. citri* en árboles de cítricos es la distorsión en brotes y la alteración en el crecimiento de árboles jóvenes. No obstante, su principal importancia radica en su función como transmisor de CLas (Ortega-Arenas, Villegas-Monter, Ramírez-Reyes, & Mendoza-García, 2013). La adquisición de la bacteria por el insecto ocurre entre las 5 y 7 h después de alimentarse de plantas enfermas, con una eficiencia de transmisión de 40 % (Ammar, Ramos, Hall, Dawson, & Shatters, 2016). Los adultos de *D. citri* tienen un periodo de sondeo de 8 h en plantas infectadas con CLas, mientras que en plantas sanas es menor (Luo et al., 2015). Este comportamiento se puede atribuir al cambio histológico que sufren las hojas debido a las infecciones ocasionadas por CLas, ya que provoca un engrosamiento de la cutícula foliar y la acumulación de almidón, lo que podría explicar la prolongada duración de búsqueda de sitios idóneos de alimentación (sondeo) (Cen et al., 2012a; Luo et al., 2015).

CLas establece una relación persistente circulatoria en su transmisor (Inoue et al., 2009). Cuando los adultos

adults (Ammar et al., 2016; Inoue et al., 2009). Likewise, the transmission efficiency of CLas is higher in *D. citri* adults from infected nymphs than in insects that were exposed to Las in the adult stage. These facts suggest that the midgut and salivary glands act as a barrier to the transmission of the bacterium (Ammar et al., 2016; Cen et al., 2012a; Luo et al., 2015).

The percentage of CLas acquisition by *D. citri* adults fed on plants positive for this bacterium varies between geographic regions. In experiments carried out with populations of Japanese origin, 88 % of the psyllids acquired CLas after 24 h of feeding (Inoue et al., 2009), while, in Florida populations, only 35 % of adult psyllids acquired the bacteria after five weeks of exposure to infected plants (Pelz-Stelinski, Brlansky, Ebert, & Rogers, 2010).

### **Candidatus Carsonella ruddii**

The proteobacterium *Candidatus Carsonella ruddii* (CCr) is a primary endosymbiont of psyllids, associated with food synthesis (Dan, Ikeda, Fujikami, & Nakabachi, 2017). Inside the carrier insect, the bacteria are lodged in tubular uninucleate bacteriocytes on the ovaries (Figure 1). Bacteriocytes increase in size during nymphal development, and since they do not possess genes for cell division, it is suggested that *D. citri* controls this process (Dan et al., 2017). CCr has one of the smallest genomes in nature, with 159,662 bp and 6 % GC (Riley, Kim, & Hansen, 2017). Some studies propose its transformation to a new sub-cellular entity, between living cells and organelle, since most genes for the biosynthesis of amino acids have been lost (Tamames et al., 2007).

Each species of psyllid is considered to correspond to a bacterial strain; for *D. citri* it is the DC strain (Gill et al., 2016; Katsir et al., 2018). In healthy psyllid hemolymph, the DC strain is composed of 362 unique proteins, while in CLas-infected psyllids the number decreases to 91 proteins. Of the total, 162 are unique proteins and 109 coincide with those of CCr. Most of the CCr proteins present in the *D. citri* hemolymph have as their main functions energy production and conversion, amino acid transport and metabolism, translation ribosomal structure and biogenesis, protein turnover, post-translational modifications and formation of chaperone proteins (Gill et al., 2016). In relation to the synthesis of chaperone proteins, it has been proven that the endosymbiont *Buchenera* sp. allows phytopathogenic viruses, mainly luteovirus, to move freely within the aphid *Myzus persicae* without being degraded and to reach the salivary glands. The interaction between virus and endosymbiont is determined by these proteins, which was demonstrated with antibiotic treatments in luteovirus-carrying aphids. The antibiotic reduced

libres de la bacteria se alimentan de árboles positivos a CLas requieren de 1 a 25 días para poder transmitirla a un árbol sano, mientras que los individuos provenientes de ninfas alimentadas de árboles positivos son infectivos tan pronto emergen (Ammar et al., 2016), esto debido a que la carga bacteriana en estados ninfales aumenta considerablemente en un periodo más corto que en adultos (Ammar et al., 2016; Inoue et al., 2009). Asimismo, la eficiencia de transmisión de CLas es mayor en adultos de *D. citri* provenientes de ninfas infectivas que en insectos que fueron expuestos a CLas en estado adulto. Estos hechos sugieren que el intestino medio y glándulas salivales fungieron como una barrera en la transmisión de la bacteria (Ammar et al., 2016; Cen et al., 2012a; Luo et al., 2015).

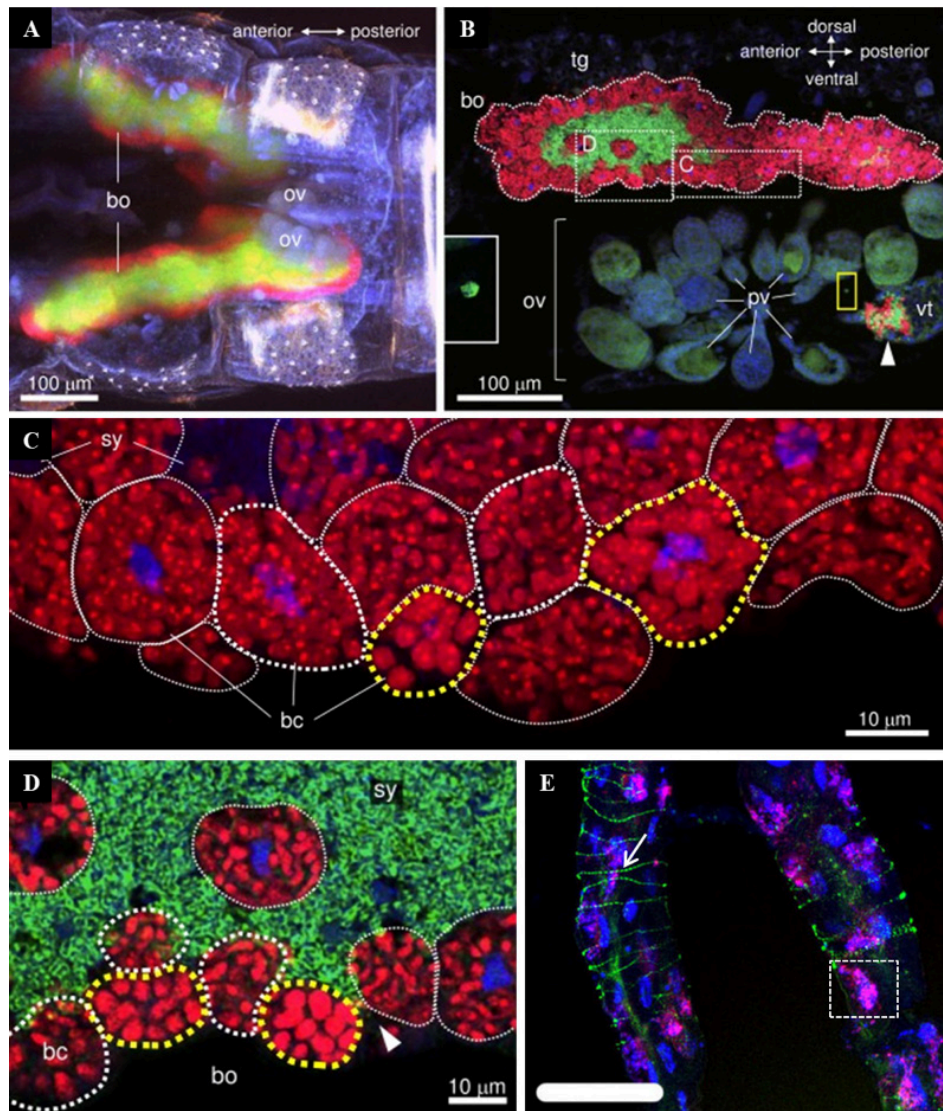
El porcentaje de adquisición de CLas por adultos de *D. citri* alimentados en plantas positivas a esta bacteria varía entre regiones geográficas. En experimentos realizados con poblaciones de origen japonés, 88 % de los psílidos adquirieron a CLas después de 24 h de alimentación (Inoue et al., 2009), mientras que, en poblaciones de Florida, solo 35 % de psílidos adultos adquirieron la bacteria a las cinco semanas de exposición a plantas infectadas (Pelz-Stelinski, Brlansky, Ebert, & Rogers, 2010).

### **Candidatus Carsonella ruddii**

La proteobacteria *Candidatus Carsonella ruddii* (CCr) es un endosimbionte primario de los psílidos, asociado a la síntesis de alimento (Dan, Ikeda, Fujikami, & Nakabachi, 2017). Dentro del insecto portador, las bacterias se alojan en bacteriocitos uninucleados de forma tubular sobre los ovarios (Figura 1). Los bacteriocitos aumentan de tamaño durante el desarrollo ninfal, y ya que no poseen genes de división celular se sugiere que *D. citri* controla este proceso (Dan et al., 2017). CCr cuenta con uno de los genomas más pequeños en la naturaleza, con 159,662 pb y 16 % de GC (Riley, Kim, & Hansen, 2017). Algunos estudios proponen su transformación a una nueva entidad subcelular, entre células vivas y organelo, dado que ha perdido genes de biosíntesis de aminoácidos (Tamames et al., 2007).

Se considera que a cada especie de psílido le corresponde una cepa bacteriana, para *D. citri* es la cepa DC (Gill et al., 2016; Katsir et al., 2018). En hemolinfa de psílidos sanos, la cepa DC se compone de 362 proteínas únicas, mientras que en psílidos infectados con CLas el número disminuye a 91 proteínas. Del total, 162 son proteínas únicas y 109 coinciden con las de CCr. La mayoría de las proteínas de CCr presentes en la hemolinfa de *D. citri* tienen como funciones principales la producción y conversión de energía, el transporte y metabolismo de aminoácidos, la





**Figure 1.** Localization of endosymbionts in *D. citri* by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) A) Confocal micrograph of the abdomen of an adult female 5 days post-eclosion (ov = immature ovaries; bo = bacteriome), B) confocal micrograph of a sagittal cross-section of an adult female (C = uninucleate *Carsonella* bacteriocytes with red signals; D = syncytial cytoplasm harboring *Profftella* with green signals; bo = bacteriome; tg = *D. citri* cells with blue signals from the nuclei; ov = oogonium in ovary; vt = vitellogenic oocytes; pv = previtellogenic oocytes), C) enlarged section of the dotted C box of image B (bc = bacteriocytes with large cells [yellow dotted line] and thin tubular cells [white dotted line]), D) enlarged section of the dotted D box of image B (sy = syncytial cytoplasm harboring *Profftella*; the arrow between *Carsonella* bacteriocytes [red signals] indicates the syncytium on the periphery of the bacteriome), E) adult psyllid intestine of *D. citri*, CLAs is observed in green and the arrow points to the specific oligonucleotide probe and the white dotted box shows *Wolbaquia* in red and pink tones. Source: A, B, C and D taken from Dan et al. (2017) and E modified from Mann et al. (2018).

**Figura 1.** Localización de endosimbiontes en *D. citri* mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH). A) Microfotografía confocal en abdomen de hembra adulta 5 días después de la eclosión (ov = ovarios inmaduros; bo = bacteriosoma), B) microfotografía confocal en sección transversal sagital de hembra adulta (C = bacteriocitos uninucleados de *Carsonella* con señales en rojo; D = sincitio citoplasmático que aloja a *Profftella* con señales en verde; bo = bacteriosoma; tg = células de *D. citri* con señales en azul de los núcleos; ov = ovogonia en ovario; vt = ovocitos vitelogénicos; pv = ovocitos previtelogénicos), C) sección ampliada del recuadro punteado C de la imagen B (bc = bacteriocitos con células grandes [línea punteada amarilla] y tubulares delgados [línea punteada blanca]), D) sección ampliada del recuadro punteado D de la imagen B (sy = sincitio citoplasmático que aloja a *Profftella*; la flecha entre bacteriocitos [señales en rojo] de *Carsonella* indican el sincitio en la periferia del bacterioma), E) intestino de psílido adulto de *D. citri*, se observa a CLAs en coloración verde y la flecha señala la sonda de oligonucleotida específica y el cuadro punteado en blanco muestra a *Wolbaquia* en tonos rojos y rosas. Fuente: A, B, C y D tomadas de Dan et al. (2017) y E modificado de Mann et al. (2018).

the concentration of symbionin (specific chaperone protein) and the formation of the protein capsid of the virus, which inhibited the transmission of the pathogen (Van den Heuvel et al., 1997).

### ***Candidatus Proffella armatura***

*Candidatus Proffella armatura* (CPa) is a widely studied primary endosymbiont in *D. citri*. This beta-proteobacterium is found in a syncytial cytoplasm within the insect bacteriome (Ramsey et al., 2015). In addition, it has genes related to the synthesis of pederin (polyketide toxin), which confers cytotoxic activity on *D. citri*, allowing it to protect itself from natural enemies (Nakabachi et al., 2013). In CLas-positive psyllids, the concentration of the polyketide toxin is higher than in non-carrier psyllids (Nakabachi et al., 2013; Ramsey et al., 2015). This compound is related to the suppression of mitosis and DNA synthesis in predators (Nakabachi et al., 2013; Wu et al., 2015).

The YCPA strain of CPa is found in *D. citri* hemolymph and has 263 and 116 total proteins in non-CLas-carrier and CLas-carrier psyllids, respectively, of which 156 are unique proteins in non-infected insects and 19 in infected ones, and 107 are unique proteins in prokaryotes (Gill et al., 2016; Wu et al., 2015). Among the functions that unique proteins perform in the insect are amino acid biosynthesis and degradation, carbohydrate degradation, aminoacyl-tRNA biosynthesis, carbohydrate metabolism, carotenoid biosynthesis, cofactor biosynthesis, genetic information processing, lipid metabolism, one-carbon metabolism, protein modification, pyrimidine metabolism, sulfur metabolism, and tRNA modifications (Gill et al., 2016).

### ***Candidatus Wolbachia* sp.**

*Candidatus Wolbachia* sp. (CW) is an alpha-proteobacterium that is classified into eight supergroups with distinct evolutionary lineage. It is estimated that CW infects up to 65 % of *D. citri* individuals; however, it is not an arthropod-specific endosymbiont, since its infection has been reported in nematodes and mammals. The WGS strain of CW reported in *D. citri* corresponds to supergroup B (Ramírez-Puebla et al., 2015).

Hemolymph analyses of *D. citri* show an imperfect infection of CLas and CW, suggesting that they are facultative parasites (Subandiyah et al., 2000). The highest concentration of CW in infected *D. citri* occurs in adults; however, they exhibit high levels of cell necrosis or karyorrhexis compared to nymphs, thus inferring a close interaction between CLas and CW during the development of psyllids exposed to infected plants (Mann et al., 2018). The SC1 and SC2 genes have been described in all CLas strains reported in the world.

traducción ribosómica y biogénesis, la renovación de proteínas, las modificaciones postraduccionales y la formación de proteínas chaperonas (Gill et al., 2016). En relación con la síntesis de proteínas chaperonas, se ha comprobado que el endosimbionte *Buchenera* sp. le permite a los virus fitopatógenos, principalmente luteovirus, moverse libremente dentro del pulgón *Myzus persicae* sin ser degradado y llegar a las glándulas salivales. La interacción entre virus y endosimbionte está determinada por dichas proteínas, lo cual fue demostrado con tratamientos de antibióticos en áfidos portadores de luteovirus. El antibiótico redujo la concentración de simbionina (proteína chaperona específica) y la formación de la cápside proteica del virus, lo que inhibió la transmisión del patógeno (Van den Heuvel et al., 1997).

### ***Candidatus Proffella armatura***

*Candidatus Proffella armatura* (CPa) es un endosimbionte primario ampliamente estudiado en *D. citri*. Esta beta-proteobacteria se encuentra en un sincitio citoplasmático dentro del bacterisoma del insecto (Ramsey et al., 2015). Además, presenta genes relacionados con la síntesis de pederina (toxina policetido), la cual le confiere actividad citotóxica a *D. citri*, lo que le permite protegerse de enemigos naturales (Nakabachi et al., 2013). En psílidos positivos a CLas, la concentración de la toxina policetido es mayor que en psílidos no portadores (Nakabachi et al., 2013; Ramsey et al., 2015). Este compuesto se relaciona con la supresión de la mitosis celular y síntesis de ADN en los depredadores (Nakabachi et al., 2013; Wu et al., 2015).

La cepa YCPA de CPa se encuentra en la hemolinfa de *D. citri* y presenta 263 y 116 proteínas totales en psílidos no portadores y portadores de CLas, respectivamente; de las cuales, 156 son proteínas únicas en insectos no infectivos y 19 en infectivos, y 107 son proteínas únicas en procariontes (Gill et al., 2016; Wu et al., 2015). Entre las funciones que cumplen las proteínas únicas en el insecto se encuentran la biosíntesis y degradación de aminoácidos, la degradación de carbohidratos, la biosíntesis de aminoacyl-tRNA, el metabolismo de carbohidratos, la biosíntesis de carotenoides, la biosíntesis de cofactores, el procesamiento de información genética, el metabolismo de lípidos, el metabolismo de un carbono, la modificación de proteínas, el metabolismo de pirimidina, el metabolismo de azufre y las modificaciones de ARNt (Gill et al., 2016).

### ***Candidatus Wolbachia* sp.**

*Candidatus Wolbachia* sp. (CW) es una alfa-proteobacteria que se clasifica en ocho supergrupos con linaje evolutivo distinto. Se estima que CW infecta hasta el 65 % de los individuos de *D. citri*; sin embargo, no es un endosimbionte específico de artrópodos, ya que se ha

SC1 is involved in holin synthesis, which causes the lytic cycle of the bacterium, although the proteins of CW strains obtained from *D. citri* are able to suppress the holin promoter, which is activated on contact with the plant, but not in the host psyllid. Such interaction is vital for the survival of these prokaryotes, which also explains why adults from positive nymphs are more efficient in transmitting CLas (Jain, Fleites, & Gabriel, 2017).

CW has been widely studied for its ability to interfere with the reproduction of its host (Guidolin & Cosoli, 2013). It has also been reported that *Wolbachia* species have a close relationship with whitefly and psyllids (Spaulding & Dohlen, 1998).

### **Candidatus Liberibacter asiaticus**

HLB is an endemic disease that has been reported in Asia since 1870, and in 1956 it was associated with *Candidatus Liberibacter* spp. So far, three genera of this bacterium are known: *C. Liberibacter americanus* (CLam; reported in Brazil and Asia), *C. Liberibacter africanus* (CLaf; reported and distributed in Africa) and CLas (distributed in Asia, Brazil, Florida in the United States, the Caribbean and Mexico) (Bové, 2006; Santivañez, Mora-Aguilera, Díaz-Padilla, López-Arroyo, & Vernal-Hurtado, 2013).

The main form of dispersion of CLas is through its vector: *D. citri* (Liviidae); however, it has been observed that *Trioza erythrae* (triozidae) is able to transmit this bacterium. It is worth mentioning that the Asian citrus psyllid can act as a transmitter of *Ca. Liberibacter africanus* experimentally (Capoor et al., 1967; Lallemand, Fos, & Bové, 1986). Until a few years ago, *D. citri* was the only reported psyllid species capable of acquiring and transmitting CLas; however, other insects associated with this bacterium have been reported, such as *Diaphorina communis* (Liviidae) and *Cacopsylla citrisuga* (Psyllidae) in Asia, and *Ferrisia virgata* (Pseudococcidae) in the United States (Cen, Zhang, Xia, Guo, & Deng, 2012b; Donovan et al., 2012; Pitino et al., 2014). However, so far, there are no studies demonstrating their efficiency as vectors of the bacterium, and therefore, they are only considered as insect carriers (Cen et al., 2012b; Donovan et al., 2012; Pitino et al., 2014).

The efficacy and spread of a pathogen necessarily depends on the fitness, characteristics and interactions with its transmitter. Endosymbionts play a key role in the insect's survival, and vice versa. In the co-evolution of CLas and *D. citri*, the bacterium benefits from the insect in its transmission to new host plants, in addition to ensuring its survival within the arthropod (Cen et al., 2012a; Luo et al., 2015). This alpha-proteobacteria lodges, as pleomorphic bodies, in

reportado su infección en nematodos y mamíferos. La cepa WGS de CW reportada en *D. citri* corresponde al supergrupo B (Ramírez-Puebla et al., 2015).

Los análisis de hemolinfa de *D. citri* exhiben una infección imperfecta de CLas y CW, lo que sugiere que son parásitos facultativos (Subandiyah et al., 2000). La mayor concentración de CW en *D. citri* infectivo se presenta en adultos; no obstante, exhiben niveles altos de necrosis celular o cariorrexis en comparación con las ninfas, por lo que se infiere una estrecha interacción entre CLas y CW durante el desarrollo de psílicos expuestos a plantas infectadas (Mann et al., 2018). Los genes SC1 y SC2 se han descrito en todas las cepas de CLas reportadas en el mundo. SC1 se encuentra involucrado en la síntesis de holina, causante del ciclo lítico de la bacteria, aunque las proteínas de cepas de CW obtenidas de *D. citri* son capaces de suprimir el promotor de holina, el cual se activa al contacto con la planta, pero no en el psílido hospedero. Tal interacción es vital para la supervivencia de estos procariontes, lo que además explica por qué los adultos provenientes de ninfas positivas son más eficientes en la transmisión de CLas (Jain, Fleites, & Gabriel, 2017).

CW ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de interferir con la reproducción de su hospedero (Guidolin & Cosoli, 2013). También, se ha reportado una estrecha relación entre especies de *Wolbachia* de mosca blanca y psílicos (Spaulding & Dohlen, 1998).

### **Candidatus Liberibacter asiaticus**

El HLB es una enfermedad endémica reportada en Asia desde 1870, y en 1956 se asoció a *Candidatus Liberibacter* spp. Hasta el momento, se conocen tres géneros de esta bacteria: *C. Liberibacter americanus* (CLam; reportado en Brasil y Asia), *C. Liberibacter africanus* (CLaf; registrada y distribuida en África) y CLas (distribuida en Asia, Brasil, Florida, Caribe y México) (Bové, 2006; Santivañez, Mora-Aguilera, Díaz-Padilla, López-Arroyo, & Vernal-Hurtado, 2013).

La principal forma de dispersión de CLas es por medio de su vector: *D. citri* (Liviidae); no obstante, se ha observado que *Trioza erythrae* (triozidae) es capaz de transmitir esta bacteria. Cabe mencionar que el psílido asiático de los cítricos puede actuar como transmisor de *Ca. Liberibacter africanus* de forma experimental (Capoor et al., 1967; Lallemand, Fos, & Bové, 1986). Hasta hace unos años, *D. citri* era la única especie de psílido reportada capaz de adquirir y transmitir a CLas; sin embargo, se han reportado otros insectos asociados con esta bacteria como *Diaphorina communis* (Liviidae) y *Cacopsylla citrisuga* (Psyllidae) en Asia, y *Ferrisia virgata* (Pseudococcidae) en Estados Unidos (Cen, Zhang, Xia, Guo, & Deng, 2012b; Donovan et al., 2012; Pitino et al., 2014). Aunque, hasta el momento, no existen estudios



the hemolymph, midgut, Malpighian tubules, ovaries and, with a higher concentration, in the muscle and fat tissues, the alimentary canal and the salivary glands (Ammar, Shatters, & Hall, 2011).

On the other hand, the bacterium potentiates the flight of the insect at short distances due to an increase in the lipophorin receptor and fatty acid binding proteins. In addition, females with a higher bacterial load are more attractive to males (Martini, Hoffmann, Coy, Stelinski, & Pelz-Stelinski, 2015). In Mexico, the longevity of psyllids developed in CLas-positive plants decreased, while fertility and the population growth rate benefited (Ramírez-Sánchez, Ortega-Arenas, Velázquez-Monreal, & Valdez-Carrasco, 2016). CLas-positive *D. citri* adults have been reported to be more susceptible to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. Tiwari, Pelz-Stelinski, and Stelinski (2011) observed that *D. citri* adults infected with CLas are more susceptible to insecticides when compared to healthy psyllids (Orduño-Cruz, Guzmán-Franco, & Rodríguez-Leyva, 2015). CLas not only modifies the biological fitness of *D. citri*, it also affects the interaction between its endosymbionts, which causes a reduction in protein synthesis. In the case of CW, it can decrease the number of unique proteins from 737 to 148 (Gill et al., 2016).

One of the remaining issues concerning the microbial interaction of the endosymbionts found in *D. citri* is the question of what controls the pre-existing dynamics between these microorganisms. Studies conducted in other insect-associated prokaryotes suggest that this activity may be regulated by chemical signaling processes, known as quorum sensing, through gene expression (Bassler, 1999). During this activity, bacteria induce changes in behavior that regulate population density through the production and release of chemical molecules called autoinducers, which increase their concentration when they detect an increase in cell density (Miller & Bassler, 2001). An example of this is the quorum sensing system of *Sodalis gossinidus*, an endosymbiont of the tsetse fly that has two regulatory proteins that synthesize an acylated homoserine lactone signaling molecule, which allows the bacterium to modulate gene expression in accordance with cell density (Pontes et al., 2008).

### Perspectives

Endosymbionts have been extensively studied in both mammals and insects. The study of cooperative interactions between prokaryotes and vector insects allows us to understand the bases that regulate their mutual survival and reproductive success. *C. Carsonella ruddi* and *C. Proffrella armatura* are considered the main endosymbionts of *D. citri*; however, the

donde se demuestre su eficiencia como vectores de la bacteria, y por ello, solo se consideran insectos portadores (Cen et al., 2012b; Donovan et al., 2012; Pitino et al., 2014).

La eficacia y propagación de un patógeno depende obligatoriamente de la aptitud, características e interacciones con su transmisor. Los endosimbiontes juegan un papel fundamental en la supervivencia del insecto, y viceversa. En la co-evolución de CLas y *D. citri*, la bacteria se beneficia del insecto en su transmisión a nuevas plantas hospedantes, además de asegurar su supervivencia dentro del artrópodo (Cen et al., 2012a; Luo et al., 2015). Esta alfa-proteobacteria se aloja, como cuerpos pleomórficos, en la hemolinfa, el intestino medio, los túbulos de Malpighi, los ovarios y, con mayor concentración, en los tejidos musculares y grasos, el canal alimenticio y las glándulas salivales (Ammar, Shatters, & Hall, 2011).

Por otro lado, la bacteria potencializa el vuelo del insecto a cortas distancias debido a un aumento del receptor de lipoforina y de proteínas de unión de ácidos grasos. Además, las hembras con mayor carga bacteriana son más atractivas para los machos (Martini, Hoffmann, Coy, Stelinski, & Pelz-Stelinski, 2015). En México, la longevidad de los psílidos desarrollados en plantas positivas a CLas disminuyó, mientras que la fecundidad y la tasa de crecimiento poblacional se vieron beneficiadas (Ramírez-Sánchez, Ortega-Arenas, Velázquez-Monreal, & Valdez-Carrasco, 2016). Se ha reportado que adultos de *D. citri*, positivos a CLas, son más susceptibles a los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Isaria fumosorosea*. Tiwari, Pelz-Stelinski, y Stelinski (2011) observaron que adultos de *D. citri* infectados con CLas tienen mayor susceptibilidad a insecticidas al compararlos con psílidos sanos (Orduño-Cruz, Guzmán-Franco, & Rodríguez-Leyva, 2015). CLas no solo modifica la aptitud biológica de *D. citri*, también afecta la interacción entre sus endosimbiontes, lo que provoca una reducción en la síntesis de proteínas. En el caso de CW, puede disminuir el número de proteínas únicas de 737 a 148 (Gill et al., 2016).

Una de las interrogantes en la interacción microbiana de los endosimbiontes encontrados en *D. citri* es saber quién controla la dinámica preexistente entre estos microorganismos. Estudios realizados en otros procariontes asociados a insectos sugieren que esta actividad puede estar regulada por procesos químicos de señalización, conocidos como *quorum sensing*, a través de la expresión génica (Bassler, 1999). Durante esta actividad, las bacterias inducen cambios en el comportamiento que regulan la densidad poblacional por medio de la producción y liberación de moléculas químicas llamadas autoinductores, los cuales aumentan



interaction with secondary endosymbionts, such as *C. Wolbachia* and *C. Liberibacter asiaticus*, allows the psyllid to develop greater efficacy as a vector of the bacterium. Current knowledge of the endosymbiont-psyllid relationship is largely due to molecular advances based on the study of genomes and interaction between organisms, this coupled with proteomics. From our perspective, future research efforts should include investigating the relationship of genomes between host-insect and endosymbiont-plant-host, as well as their function at the physiological level. The study of these interactions would allow us to deepen our understanding of the function of the genes involved in these mutualistic relationships and, therefore, to genetically manipulate the host or silence genes in the pursuit of an integrated management of both *D. citri* and CLAs.

## Conclusions

The key to the evolutionary success of insects is closely linked to the symbiotic association with bacteria. Endosymbionts have undergone major changes, ranging from size reduction to decreased protein synthesis, as is the case of *Candidatus Carsonella ruddi* and *C. Proffella*, primary endosymbionts of *Diaphorina citri*. In infected psyllids, *C. Wolbachia* and *C. Liberibacter asiaticus* seem to be complementing the functions of the primary endosymbionts, to such an extent that the presence of *C. Wolbachia* is essential for *D. citri* to be able to transmit *C. Liberibacter asiaticus*.

*End of English version*

## References / Referencias

- Ammar, E. D., Ramos, J. E., Hall, D. G., Dawson, W. O., & Shatters, R. G. (2016). Acquisition, replication and inoculation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* following various acquisition periods on Huanglongbing-infected citrus by nymphs and adults of the Asian Citrus Psyllid. *PLoS One*, 11(7), 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0159594
- Ammar, E. D., Shatters, R. G., & Hall, D. G. (2011). Localization of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, associated with citrus Huanglongbing disease, in its psyllid vector using fluorescence *in situ* hybridization. *Journal of Phytopathology*, 159(11-12), 726-734. doi: 10.1111/j.1439-0434.2011.01836.x
- Bassler, B. (1999). How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6), 582-587. doi: 10.1016/S1369-5274(99)00025-9
- Baumann, P., Baumann, L., Lai, C. Y., Rouhakhsh, D., Moran, N. A., & Clark, M. A. (1995). Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annual Review of Microbiology*, 49, 55-94. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.000415

su concentración cuando detectan incremento en la densidad celular (Miller & Bassler, 2001). Un ejemplo de lo anterior es el sistema de *quorum sensing* de *Sodalis gossinidus*, endosimbionte de la mosca tse-tse que cuenta con dos proteínas reguladoras que sintetizan una molécula de señalización de lactona homoserina acilada, la cual le permite a la bacteria modular la expresión génica de acuerdo con la densidad celular (Pontes et al., 2008).

## Perspectivas

Los endosimbiontes se han estudiado ampliamente tanto en mamíferos como en insectos. El estudio de las interacciones cooperativas entre procariontes e insectos vectores permite entender las bases que regulan su mutua supervivencia y éxito de reproducción. *C. Carsonella ruddi* y *C. Proffella armatura* se consideran los principales endosimbiontes de *D. citri*; sin embargo, la interacción con endosimbiontes secundarios, como *C. Wolbachia* y *C. Liberibacter asiaticus*, le permite al psílido desarrollar una mayor eficiencia como vector de la bacteria. El conocimiento actual de la relación endosimbionte-psílido se debe, en gran medida, a los avances moleculares que se basan en el estudio de los genomas e interacción entre organismos, esto aunado a la proteómica. Desde nuestra perspectiva, los principales temas a investigar incluyen la relación de genomas entre hospedante-insecto y endosimbionte-planta-hospedero, así como su función a nivel fisiológico. El estudio de estas interacciones permitiría comprender a profundidad la función de los genes implicados en estas relaciones mutualistas y, por consiguiente, manipular genéticamente al hospedero o silenciar genes en busca de un manejo integrado tanto de *D. citri* como de CLAs.

## Conclusiones

La clave del éxito evolutivo de los insectos está estrechamente ligada a la asociación simbiótica con bacterias. Los endosimbiontes han experimentado grandes cambios, los cuales van desde la reducción de tamaño hasta la disminución de la síntesis de proteínas, como es el caso de *Candidatus Carsonella ruddi* y *C. Proffella armatura* endosimbiontes primarios de *Diaphorina citri*. En psílidos infectivos, *C. Wolbachia* y *C. Liberibacter asiaticus* parecen estar complementando las funciones de los endosimbiontes primarios, a tal grado que la presencia de *C. Wolbachia* es fundamental para que *D. citri* sea capaz de transmitir a *C. Liberibacter asiaticus*.

*Fin de la versión en español*

- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7-37. doi: 10.4454/jpp.v88i1.828
- Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. New York, USA: Interscience Publishers/John Wiley.
- Capoor, S. P., Rao, D. G., & Viswanath S. M. (1967). *Diaphorina citri* Kuway., a vector of the greening disease of citrus in India. *Journal of Agricultural Science*, 37, 572-576.
- Cen, Y. J., Yang, C. L., Holford, P., Beattie, G. A. C., Spooner-Hart, R. N., Liang, G. W., & Deng, X. L. (2012a). Feeding behavior of the Asiatic citrus psyllid, *Diaphorina citri*, on healthy and huanglongbing-infected citrus. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 143(1), 13-22. doi: 10.1111/j.1570-7458.2012.01222.x
- Cen, Y. J., Zhang, L. N., Xia, Y. L., Guo, J., & Deng, X. L. (2012b). Detection of 'Candidatus Liberibacter Asiaticus' in *Cacopsylla (Psylla) citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 95(2), 304-311. doi: 10.1653/024.095.0210
- Chaudhary, R., Atamian, H. S., Shen, Z., Briggs, S. P., & Kaloshian, I. (2014). GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), 8919-24. doi: 10.1073/pnas.1407687111
- Dan, H., Ikeda, N., Fujikami, M., & Nakabachi, A. (2017). Behavior of bacteriome symbionts during transovarial transmission and development of the Asian citrus psyllid. *PLoS One*, 12(12), e0189779. doi: 10.1371/journal.pone.0189779
- Dixon, A. F. G. (1998). *Aphid ecology: An optimization approach*. London: Chapman & Hall. doi: 10.1007/978-94-011-5868-8
- Donovan, N. J., Beattie, G. A., Chambers, G. A., Holford, P., Englezou, A., Hardy, S., & Dorjee, P. (2012). First report of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in *Diaphorina communis*. *Australasian Plant Disease*, 7, 1-4. doi: 10.1007/s13314-011-0031-9
- Eleftherianos, I., Atri, J., Accetta, J., & Castillo, J. C. (2013). Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system. *Frontiers in Physiology*, 4(46). doi: 10.3389/fphys.2013.00046
- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Flores-Sánchez, J. L., & López-Arroyo, J. I. (2012). Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia*, 46(8), 769-782. Retrieved from <https://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2012/nov-dic/art-3.pdf>
- Feldhaar, H., & Gross, R. (2009). Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(1), 1-8. doi: 10.1016/j.ijmm.2008.05.010
- Gill, T. A., Chu, C., & Pelz-Stelinski, K. S. (2016). Comparative proteomic analysis of hemolymph from uninfected and *Candidatus Liberibacter asiaticus* infected *Diaphorina citri*. *Amino Acids*, 49(2), 389-406. doi: 10.1007/s00726-016-2373-2
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V., & Bassanezi, R. B. (2007). Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, 8(1), 1-36. doi: doi.org/10.1094/PHP-2007-0906-01-RV
- Guidolin, A. S., & Consoli, F. L. (2013). Molecular characterization of *Wolbachia* strains associated with the invasive Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* in Brazil. *Microbial Ecology*, 65(2), 475-86. doi: 10.1007/s00248-012-0150-7
- Halbert, S., & Manjunath, K. L. (2004). Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist*, 87(3), 330-353. doi: 10.1653/0015-4040(2004)087
- Hall, D. G., Richardson, M. L., Ammar, E. D., & Halbert, S. E. (2013). Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus Huanglongbing disease. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146(2), 207-223. doi: 10.1111/eea.12025
- Hussain, M., Akutse, K. S., Bamisile, B. S., Qasim, M., Dash, C. K., & Wang, L. (2017). Effects of different temperature regimes on survival of *Diaphorina citri* and its endosymbiotic bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 19(9), 3439-3449. doi: 10.1111/1462-2920.13821
- Inoue, H., Ohnishi, J., Ito, T., Tomimura, K., Miyata, S., Iwanami, T., & Ashihara, W. (2009). Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. *Annals of Applied Biology*, 155(1), 29-36. doi: 10.1111/j.1744-7348.2009.00317.x
- Jain, M., Fleites, L. A., & Gabriel, D. W. (2017). A small *Wolbachia* protein directly represses phagolytic cycle genes in "Candidatus Liberibacter asiaticus" within psyllids. *American Society for Microbiology*, 2(3), 1-12. doi: 10.1128/mSphereDirect.00171-17
- Katsir, L., Zhepu, R., Piasezky, A., Jiang, J., Sela, N., Freilich, S., & Bahar, O. (2018). Genome sequence of "Candidatus Carsonella ruddii" strain BT from the psyllid *Bactericera trigonica*. *Genome Announcements*, 6(4), e01466-17. doi: 10.1128/genomeA.01466-17
- Lallemand, J., Fos, A., & Bové, J. M. (1986). Transmission by the Asian vector *Diaphorina citri* of the bacterium associated at the African form of the greening disease. *Fruits*, 41(5), 341-343.
- Luo, X., Yen, A. L., Powell, K. S., Wu, F., Wang, Y., Zeng, X., Yang, Y., & Cen, Y. (2015). Feeding behavior of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) and its acquisition of 'Candidatus Liberibacter Asiaticus', on huanglongbing-infected citrus reticulate leaves of several maturity stages. *Florida Entomologist*, 98(1), 186-192. doi: 10.1653/024.098.0132
- Mann, M., Fattah-Hosseini, S., Ammar, E. D., Stange, R., Warrick, E., Sturgeon, K., Shatters, R., & Heck, M. (2018). *Diaphorina citri* nymphs are resistant to morphological changes induced by "Candidatus Liberibacter asiaticus" in midgut epithelial cells. *Infection and Immunity*, 86(4), 1-19. doi: 10.1128/IAI.00889-17
- Martini, X., Hoffmann, M., Coy, M. R., Stelinski, L.L., & Pelz-Stelinski, K. S. (2015). Infection of an insect vector with a bacterial plant pathogen increases its propensity for dispersal. *PLoS One*, 10(6), 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0129373
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55, 165-99. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, S.,

- Gutierrez-Espinosa, A., Kuk-Loeza, E., & González-Gómez, R. (2014). Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(2), 108-119. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092014000200108](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092014000200108)
- Nakabachi, A., Nikoh, N., Oshima, K., Inoue, H., Ohkuma, M., Hongoh, Y., Miyagishima, S., Hattori, M., & Fukatsu, T. (2013). Horizontal gene acquisition of *Liberibacter* plant pathogens from a bacteriome confined endosymbiont of their psyllid vector. *PLoS One*, 8(12), 1-5. doi: 10.1371/journal.pone.0082612
- Orduño-Cruz, N. A., Guzmán-Franco, W., & Rodríguez-Leyva, E. (2015). *Diaphorina citri* populations carrying the bacterial plant pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* are more susceptible to infection by entomopathogenic fungi than bacteria-free populations. *Agricultural and Forest Entomology*, 18(1), 95-98. doi: 10.1111/afe.12138
- Ortega-Arenas, L. D., Villegas-Monter, A., Ramírez-Reyes, A. J., & Mendoza-García, E. E. (2013). Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazonas, Veracruz, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 29(2), 317-333. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0065-17372013000200005](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372013000200005)
- Pelz-Stelinski, K. S., Brlansky, R. H., Ebert, T. A., & Rogers, M. E. (2010). Transmission parameters for *Candidatus Liberibacter asiaticus* by Asian Citrus Psyllid (Hemiptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(5), 1531-154. doi: 10.1603/EC10123
- Pitino, M., Hoffman, M. T., Zhou, L., Hall, D. G., Stocks, I. C., & Duan, Y. (2014). The phloem-sap feeding mealybug (*Ferrisia virgata*) carries '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' populations that do not cause disease in host plants. *PLoS One*, 9(3), e92757. doi: 10.1371/journal.pone.0092757
- Pontes, M. H., Babst, M., Lochhead, R., Oakeson, K., Smith, K., & Dale, C. (2008). Quorum sensing primes the oxidative stress response in the insect endosymbiont, *Sodalis glossinidius*. *PLoS One*, 3(10), e3541. doi: 10.1371/journal.pone.0003541
- Ramírez-Puebla, S. T., Servin-Garciduenas, L. E., Ormeno-Orrillo, E., Vera-Ponce de Leon, A., Rosenblueth, M., Delaye, L., Martínez, J., & Martínez-Romero, E. (2015). Species in Wolbachia? Proposal for the designation of '*Candidatus Wolbachia bourtzisii*', '*Candidatus Wolbachia onchocercicola*', '*Candidatus Wolbachia blaxteri*', '*Candidatus Wolbachia brugii*', '*Candidatus Wolbachia taylori*' '*Candidatus Wolbachia collembolicola*' and '*Candidatus Wolbachia multihospitum*' for the different species within Wolbachia supergroups. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(6), 390-399. doi: 10.1016/j.syapm.2015.05.005
- Ramírez-Sánchez, A. K., Ortega-Arenas, L. D., Velázquez-Monreal, J. J., & Valdez-Carrasco, J. M. (2016). Supervivencia y reproducción de *Diaphorina citri* en plantas de naranja y lima mexicana sanas e infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Southwestern Entomologists*, 41(3), 801-812. doi: 10.3958/059.041.0322
- Ramsey, J. S., Johnson, R. S., Hoki, J. S., Kruse, A., Mahoney, J., Hilf, M. E., ... Cilia, M. (2015). Metabolic interplay between the Asian citrus psyllid and its *Proffttella* symbiont: an Achilles' heel of the citrus greening insect vector. *PLoS One*, 10(11), e0140826. doi: 10.1371/journal.pone.0140826
- Riley, A. B., Kim, D., & Hansen, A. K. (2017). Genome sequence of "*Candidatus Carsonella ruddii*" strain BC, a nutritional endosymbiont of *Bactericera cockerelli*. *Genome Announcements*, 5(17), e00236-17. doi: 10.1128/genomeA.00236-17
- Salcedo, D., Hinojosa, R., Mora-Aguilera, G., Covarrubias, I., de Paolis, F., Cíntora, C., & Mora, S. (2010). *Evaluación del impacto económico de Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola mexicana*. México: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura - Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural - Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad.
- Santivañez, C. T., Mora-Aguilera, G., Díaz-Padilla, G., López-Arroyo, J. I., & Vernal-Hurtado, P. (2013). *Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura.
- Spaulding, A. W., & Dohlen, C. D. (1998). Phylogenetic characterization and molecular evolution of bacterial endosymbionts in psyllids (Hemiptera: Sternorrhyncha). *Molecular Biology and Evolution*, 15(11), 1506-1513. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025878
- Su, Q., Zhou, X., & Zhang, Y. (2013). Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Communicative Integrative Biology*, 6(3), e23804. doi: 10.4161/cib.23804
- Subandiyah, S., Nikoh, N., Tsuyumu, S., Somowiyarjo, S., & Fukatsu, T. (2000). Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science*, 17(7), 983-989. doi: 10.2108/zsj.17.983
- Tamames, J., Gil, R., Latorre, A., Pereto, J., Silva, F. J., & Moya, A. (2007). The frontier between cell and organelle: genome analysis of *Candidatus Carsonella ruddii*. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 181. doi: 10.1186/1471-2148-7-181
- Tiwari, S., Pelz-Stelinski, K., & Stelinski, L. L. (2011). Effect of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection on susceptibility of Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, to selected insecticides. *Pest Management Science*, 67(1), 94-99. doi: 10.1002/ps.2038
- Van den Heuvel, J. F., Bruyère, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, & Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of Virology*, 71(10), 7258-7265. doi: 10.1128/JVI.71.10.7258-7265.1997
- Wu, F., Deng, X., Liang, G., Huang, J., Cen, Y., & Chen, J. (2015). Whole-genome sequence of "*Candidatus Proffttella armatura*" from *Diaphorina citri* in Guangdong, China. *Genome Announcements*, 3(6), e01282-15. doi: 10.1128/genomeA.01282-15