

Biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus Liberibacter*

Aspectos biológicos, ecológicos, epidemiológicos y manejo de *Candidatus Liberibacter*

Moisés Camacho-Tapia¹; Reyna Isabel Rojas-Martínez^{1*}; Ángel Rebollar-Alviter²; Sergio Aranda-Ocampo¹; Javier Suárez-Espinosa³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Programa de Fitopatología. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230, MÉXICO.

Email: rojas@colpos.mx (*Corresponding author).

²Universidad Autónoma Chapingo, Centros Regionales, Unidad Michoacán, Morelia, Michoacán, C.P. 58000, MÉXICO.

³Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Programa de Estadística. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C.P. 56230, MÉXICO.

Abstract

This paper provides an overview of the biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus Liberibacter*, a bacterium recently introduced into Mexico that is associated with diseases such as citrus Huanglongbing, Zebra chip and chili pepper variegation. Plants affected with *Ca. Liberibacter* have multiple swellings located in the necrotic phloem and dispersed throughout the vascular system, massive accumulation of starch, aberrations in cambial activity and excessive formation of phloem. It is suggested that phloem necrosis causes blockage of the nutrient translocation stream, which leads to anatomical changes such as mottling and vein yellowing. *Ca. Liberibacter* control focuses on reducing inoculum sources, such as the use of healthy plants, removal of symptomatic trees and chemical control of the insect vector to reduce the transmission of the bacterium.

Keywords: *Candidatus Liberibacter*, insect vector, inoculum sources, chemical control.

Resumen

En el presente manuscrito se proporciona una visión general de los aspectos biológicos, ecológicos, epidemiológicos y de manejo de *Candidatus Liberibacter*, bacteria de reciente introducción en México, la cual está asociada con enfermedades como: Huanglongbing de los cítricos, Zebra chip y variegado de chile. En plantas afectadas con *Ca. Liberibacter* se presentan múltiples abultamientos localizados en el floema necrótico y dispersos a través del sistema vascular, acumulación masiva de almidón, aberraciones en la actividad cambial y formación excesiva de floema. Se sugiere que la necrosis del floema causa el bloqueo en la corriente y translocación de nutrientes, que conduce a los cambios anatómicos como el moteado y amarillamiento de venas. El control de *Ca. Liberibacter* se enfoca en disminuir las fuentes de inóculo, como el uso de plantas sanas, remoción de árboles sintomáticos y el control químico del insecto vector para reducir la transmisión de la bacteria.

Palabras clave: *Candidatus Liberibacter*, insecto vector, fuentes de inóculo, control químico.



Introduction

Candidatus Liberibacter is a filamentous bacterium that lodges in the phloem sieve tubes, and may have round forms when its cell cycle ends. It is transmitted by insect vectors, where it is present in the hemolymph and salivary glands (Jagoueix, Bové, & Garnier, 1994). This bacterium affects different crops belonging to the Rutaceae, Solanaceae and Apiaceae families (Liefting, Pérez-Egusquiza, Clover, & Anderson, 2008; Aguilar, Segonda, Bextine, McCue, & Munyaneza, 2013). A form of dispersion of *Ca. Liberibacter* is through infected seed, which is part of the primary inoculum in the field and influences the initial incidence of the disease and the behavior of the epidemic in the field (Camacho-Tapia et al., 2011).

Phylogenetic studies of the 16S rRNA region indicate that *Ca. Liberibacter* belongs to the α -proteobacteria, and that it is related to bacterial genera of the α -2 proteobacteria subdivision, such as: *Bartonella*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Brucella* and *Alfipia* (Jagoueix et al., 1994). Observations with transmission electron microscopy show that the bacterium is 0.2 to 0.3 μm in diameter, has a characteristic membrane of gram-negative bacteria, has a peptidoglycan layer, which is barely visible, and shows no evidence of flagella or pili (Jagoueix et al., 1994).

Isolating *Ca. Liberibacter* in artificial culture medium is difficult, making its biochemical characterization impossible, and so its genus classification as *Liberibacter*, from *Liber* (bark) and *bacter* (bacteria), remains only as a proposal. Based on comparing nucleotide sequences of ribosomal protein genes, three species found in Rutaceae, namely *Ca. Liberibacter africanus*, *Ca. Liberibacter asiaticus* and *Ca. Liberibacter americanus*, and a fourth species, *Ca. Liberibacter solanacearum*, detected in Solanaceae, have been proposed (Jagoueix et al., 1994; Liefting et al., 2008).

The aim of this review was to provide an overview of the biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus Liberibacter*, which is associated with diseases such as citrus Huanglongbing, Zebra chip and chili pepper variegation.

Isolation of *Candidatus Liberibacter*

The first attempts to isolate *Liberibacter* were through co-cultures with actinobacteria closely related to *Propionibacterium acnes*; in these, the colonies appeared after a long time and it was difficult to keep them free to transfer them consecutively to a fresh culture medium (Davis, Mondal, Chen, Rogers, & Brlansky, 2008). In a second study, another medium designated

Introducción

Candidatus Liberibacter es una bacteria filamentosa que se aloja en los tubos cribosos del floema, y puede presentar formas redondas cuando termina su ciclo celular. Se transmite por insectos vectores, donde se encuentra en la hemolinfa y las glándulas salivales (Jagoueix, Bové, & Garnier, 1994). Esta bacteria afecta a distintos cultivos pertenecientes a la familia de las rutáceas, solanáceas y apiáceas (Liefting, Pérez-Egusquiza, Clover, & Anderson, 2008; Aguilar, Segonda, Bextine, McCue, & Munyaneza, 2013). Una forma de dispersión de *Ca. Liberibacter* es mediante semilla infectada, que forma parte del inóculo primario en campo e influencia la incidencia inicial de la enfermedad y el comportamiento de la epidemia en campo (Camacho-Tapia et al., 2011).

Estudios filogenéticos de la región 16S rRNA indican que *Ca. Liberibacter* pertenece a las α -proteobacterias, y que está relacionada con géneros de bacterias del subgrupo α -2 proteobacteria, como: *Bartonella*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Brucella* y *Alfipia* (Jagoueix et al., 1994). Observaciones realizadas con microscopía electrónica de transmisión muestran que la bacteria tiene 0.2 a 0.3 μm de diámetro, una membrana característica de las bacterias gram negativas, cuenta con una capa de peptidoglicano, que apenas es visible, y no tiene evidencia de flagelos o pili (Jagoueix et al., 1994).

El aislamiento en medio de cultivo artificial de *Ca. Liberibacter* es difícil, por lo que se imposibilita su caracterización bioquímica, y solo se mantiene como propuesta a género *Liberibacter*, de *Liber* (corteza) y *bacter* (bacteria). Con base en la comparación de secuencias de nucleótidos de los genes de proteínas ribosomales se propusieron tres especies en rutáceas: *Ca. Liberibacter africanus*, *Ca. Liberibacter asiaticus* y *Ca. Liberibacter americanus*, y una cuarta especie: *Ca. Liberibacter solanacearum*, detectada en solanáceas (Jagoueix et al., 1994; Liefting et al., 2008).

El objetivo de esta revisión fue proporcionar una visión general de los aspectos biológicos, ecológicos, epidemiológicos y de manejo de *Candidatus Liberibacter*; la cual está asociada con enfermedades como: Huanglongbing de los cítricos, Zebra chip y variegado de Chile.

Aislamiento de *Candidatus Liberibacter*

Los primeros intentos para aislar a *Liberibacter* fueron mediante co-cultivos con actinobacteria, relacionada con *Propionibacterium acnes*; en éstos, las colonias aparecían después de un largo tiempo y fue difícil tenerlas libres para transferirlas de manera consecutiva a un nuevo medio de cultivo (Davis,

Liber was designed and evaluated, obtaining irregular growth and bacterial colonies ranging from 0.1 to 0.3 mm after three to four days at 28 °C; subsequently the colonies did not increase in size, and their viability was lost after four to five reisolations. Therefore, the difficulty of isolating it precludes testing for its biochemical study (Sechler et al., 2009).

Parker et al. (2014) indicated that adding grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad) juice to the culture medium prolongs viability of *Ca. L. asiaticus*; on the other hand, it decreases in sinusoidal fashion in conditions such as lower pH, presence of sugars and abundance of minerals and amino acids (Parker et al., 2014).

Virulence factors

Although *Ca. L. americanus* has an intact outer membrane, most of the genes required for lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis, which are found in *Ca. L. asiaticus* and *Ca. L. solanacearum*, are absent, together with *lpxA*, *lpxB* and *lpxC*, which are involved in the early steps of lipid biosynthesis. The lack of LPS in gram-negative bacteria can be compensated by the production of other lipid bases in the outer membrane (Lin & Gudmestad, 2013).

Ca. L. americanus and *Ca. L. solanacearum* appear to have a greater metabolic capacity for some amino acids and vitamins. *Ca. L. solanacearum* has the complete pathway for the production of arginine, glutamine and ornithine (arginine and glutamine from ornithine). Genes for the synthesis of glutamine from glutamate are present in these bacteria (Wulff et al., 2014). The symptoms of generic yellows and decline, often readily confused with nutritional deficiencies, are due to starch accumulation, indicating a disruption of phloem transport (Nelson, Munyaneza, McCue, & Bové, 2013).

In the *Ca. L. asiaticus* genome, two bacteriophages called SC1 and SC2, which belong to the family *Podoviridae*, corresponding to the order *Caudovirales*, were found (Zhang et al., 2011a). The former seems to be activated when the bacteria infects citrus. The latter, apparently, is a degenerated form of SC1 lacking lysis genes, but carries most of those that could be important in lysogenic conversion; that is, those that are expressed in the bacteria and alter their physiology, increasing their virulence and pathogenicity, as well as causing the appearance of new haplotypes and forms of the disease. SC2 is replicated as an excision plasmid when its *Ca. L. asiaticus* host is infecting either plants or psyllids.

Studies indicate that *Bactericera cockerelli*, in addition to carrying *Ca. L. solanacearum*, has three prokaryotic intracellular bacteria (symbionts) associated with it:

Mondal, Chen, Rogers, & Brlansky, 2008). En un segundo estudio, se diseñó y evaluó otro medio llamado Liber A, obteniéndose crecimiento irregular y colonias bacterianas con un rango de 0.1 a 0.3 mm, después de tres a cuatro días a 28 °C; posteriormente las colonias no incrementaron su tamaño, y su viabilidad se perdió después de cuatro a cinco reaislamientos. Por lo tanto, la dificultad para aislarla imposibilita las pruebas para su estudio bioquímico (Sechler et al., 2009).

Parker et al. (2014) indicaron que agregar jugo de toronja (*Citrus paradisi* Macfad) al medio de cultivo brinda mayor viabilidad a *Ca. L. asiaticus*; por otro lado, disminuye en forma sinuosa en condiciones tales como pH más bajo, presencia de azúcares y abundancia de elementos minerales y aminoácidos (Parker et al., 2014).

Factores de virulencia

A pesar de que *Ca. L. americanus* tiene una membrana exterior intacta, la mayoría de los genes necesarios para biosíntesis de lipopolisacarido (LPS), que se encuentran en *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. solanacearum*, están ausentes, junto con *lpxA*, *lpxB* y *lpxC* que están involucrados en los primeros pasos de biosíntesis de lípidos. La falta de LPS, en las bacterias gram negativas, se puede compensar con la producción de otras bases de lípidos en la membrana externa (Lin & Gudmestad, 2013).

Ca. L. americanus y *Ca. L. solanacearum* parecen tener mayor capacidad metabólica para algunos aminoácidos y vitaminas. *Ca. L. solanacearum* tiene la vía completa para la producción de arginina, glutamina y ornitina. Los genes para la síntesis de glutamina a partir del glutamato están presentes en estas bacterias (Wulff et al., 2014). Los síntomas de amarillamiento genérico y decaimiento, que a menudo se confunden fácilmente con deficiencias nutrimentales, se deben a la acumulación de almidón, que indica una alteración del transporte en el floema (Nelson, Munyaneza, McCue, & Bové, 2013).

En el genoma de *Ca. L. asiaticus* se encontraron dos bacteriófagos llamados SC1 y SC2; los cuales pertenecen a la familia *Podoviridae*, que corresponde al orden *Caudovirales* (Zhang et al., 2011a). El primero parece ser activado cuando la bacteria infecta a los cítricos. El segundo, aparentemente, es una forma degenerada de SC1 que carece de genes de lisis, pero lleva la mayoría de los que pueden ser importantes en la conversión lisogénica; es decir, aquellos que se expresan en la bacteria y alteran su fisiología, incrementando su virulencia y patogenicidad, además de originar la aparición de nuevos haplotipos y formas de la enfermedad. El SC2 se replica como un plásmido de exclusión cuando se hospeda en *Ca. L. asiaticus* infectivo en plantas y psílidos.

the primary or obligate symbiont (*Carsonella rudii*) (Thao et al., 2000) and two facultative ones, a secondary (S) and two different strains of *Wolbachia* (Nachappa, Levy, Pierson, & Tamborindeguy, 2011). These symbionts are heritable and transmitted from mother to offspring (Nachappa, Shapiro, & Tamborindeguy, 2012).

The primary symbiont affects the fundamental biological process of the insect with the host, and is required for the survival and development of the psyllid, in addition to the facultative symbionts that influence it ecologically. For example, *Wolbachia* spp. can manipulate reproduction in the insect, providing infected females with a reproductive advantage compared to uninfected females. This increases the dispersion of *Wolbachia* spp., in addition to encouraging insect growth and increasing the percentage of vectors for transmitting *Liberibacter* in Solanaceae (Nachappa, Levy, Pierson, & Tamborindeguy, 2014).

Candidatus *Liberibacter* in different hosts

Huanglongbing (HLB), also known as citrus greening, is a disease in citrus associated with the infection of three species of α -proteobacteria: *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* and *Ca. Liberibacter africanus* (Bové, 2006). HLB symptoms include blotchy mottling and chlorosis, which can be confused with nutritional deficiencies, as well as stunting and reduced foliage as the disease progresses, and in extreme cases the trees die from the infection (Gottwald, da Graça, & Bassanezi, 2007).

The yield of affected trees is reduced, and they may produce small, poor-quality fruit. Commercial varieties are the most susceptible (Wang et al., 2009). *Ca. L. asiaticus* and *Ca. L. americanus* are transmitted by *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor, Rao, & Visnawanath, 1967; Yamamoto et al., 2006), whereas *Ca. L. africanus* is transmitted by *Trioza erytrae* (Del Guercio) (McClellan & Oberholzer, 1965). In the United States, *Ca. L. asiaticus* was identified in Florida in 2005 (Halbert, 2005).

On the other hand, there is evidence that the disease known as Zebra chip, found in potato (*Solanum tuberosum*), originated in North America and later spread to other producing countries. The pathogen associated with this disease is *Ca. Liberibacter solanacearum*, which causes economic losses to the potato industry in the United States. Zebra chip was detected in Saltillo, Mexico, in the 1990s, and was first associated with a phytoplasma (Secor & Rivera-Varas, 2004). In early 2000 it was reported in commercial potato fields in Pearsall and Rio Grande Valley, Texas. By 2006, the disease had spread to other producing states, such as Arizona, Kansas, Colorado, California, Nevada and New Mexico

Estudios indican que *Bactericera cockerelli*, además de portar *Ca. L. solanacearum*, cuenta con tres bacterias intracelulares procarióticas (simbiontes) asociadas con éste; el primario o simbiote obligado (*Carsonella rudii*) (Thao et al., 2000) y dos facultativos, un secundario (S) y dos cepas diferentes de *Wolbachia* (Nachappa, Levy, Pierson, & Tamborindeguy, 2011). Esos simbiotes son heredables y se transmiten de la madre a la progenie (Nachappa, Shapiro, & Tamborindeguy, 2012).

El simbiote primario influye en los procesos biológicos fundamentales del insecto con el hospedante, y es requerido para la sobrevivencia y desarrollo del psílido, además de simbiotes facultativos que lo influyen ecológicamente. Por ejemplo, *Wolbachia* spp. puede manipular la reproducción en el insecto, y provee de hembras infectadas que tienen ventaja reproductiva en comparación con las hembras que no lo están. Lo anterior incrementa la dispersión de *Wolbachia* spp., además de incentivar el incremento de insectos y el aumento en el porcentaje de vectores para la transmisión de *Liberibacter* en solanáceas (Nachappa, Levy, Pierson, & Tamborindeguy, 2014).

Candidatus *Liberibacter* en distintos hospedantes

Huanglongbing (HLB), conocido también como el "greening" de los cítricos, es una enfermedad en cítricos asociada con la infección de tres especies de α -proteobacteria: *Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter americanus* y *Ca. Liberibacter africanus* (Bové, 2006). Los síntomas del HLB incluyen manchas moteadas y clorosis, que pueden llegar a confundirse con deficiencias nutrimentales, además de achaparramiento y reducción del follaje conforme progresa la enfermedad, y en casos extremos los árboles mueren por la infección (Gottwald, da Graça, & Bassanezi, 2007).

El rendimiento de los árboles afectados es reducido, y éstos pueden producir frutos pequeños y de mala calidad. Las variedades comerciales son las más susceptibles (Wang et al., 2009). *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus* son transmitidas por *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor, Rao, & Visnawanath, 1967; Yamamoto et al., 2006); mientras que *Ca. L. africanus* es transferido por *Trioza erytrae* (Del Guercio) (McClellan & Oberholzer, 1965). En Estados Unidos, *Ca. L. asiaticus* se identificó en Florida en 2005 (Halbert, 2005).

Por otro lado, existen evidencias de que la enfermedad conocida como Zebra chip, en papa (*Solanum tuberosum*), se originó en el Norte de América y posteriormente se extendió a otros países productores. El patógeno asociado a esta enfermedad es *Ca. Liberibacter solanacearum*, el cual causa pérdidas económicas a la industria de papa en Estados Unidos. La Zebra chip se detectó en

(Munyaneza, Goolsby, Crosslin, & Upton, 2007b; Liefting et al., 2008).

In 2008, in Auckland, New Zealand, Zebra chip symptoms detected included: chlorotic apices, general mottling of the leaves, curling of the midveins, stunting of the plants, reduced yield, flecking and streaking in the raw tubers that became marked when fried, and in some cases tuber deformation (Munyaneza, Crosslin, & Upton, 2007a; Liefting et al., 2008).

Candidatus Liberibacter solanacearum was detected in the carrot psyllid (*Trioza apicalis*) in carrot plantations in Finland infected by this insect. *Trioza apicalis* is a serious insect pest in northern and central Europe, where it can cause up to 100 % crop loss. In 2009, in southern Sinaloa, Mexico, this bacterium was found as pathogen in the pepper crop; plant symptoms resembled those of yellow psilid that occurs in potato, but they also showed shortened internodes and chlorotic apical growth (Munyaneza, Sengoda, Crosslin, Garzon-Tiznado, & Cárdenas-Valenzuela, 2009). For their part, Camacho-Tapia et al. (2011) demonstrated that this bacterium is responsible for chili pepper variegation observed in commercial plantations of this solanaceous crop in the Yurécuaro region of Michoacan, Mexico, and that it can be transmitted by seed.

In 2013, in Honduras, *Ca. L. solanacearum* was reported in tobacco (Aguilar et al., 2013), and in 2014 it was found in pepper (Munyaneza & Segonda, 2014). New species of this bacterium have been documented, as in the case of *Ca. Liberibacter europaeus* which was detected in Italy as an endophyte in pear and its associated psyllid (*Cacopsylla pyri*) (Raddadi et al., 2010).

Climatic factors

Temperature has a significant effect on the development of *Liberibacter* associated with HLB and the symptoms of the disease. *Ca. L. africanus* and *Ca. L. americanus* are reported as heat-sensitive, while *Ca. L. asiaticus* apparently tolerates it. The heat sensitivity of the pathogen may explain the geographical distribution of these species of *Liberibacter* and their insect vectors (Munyaneza, Sengoda, Buchman, & Fisher, 2012).

Candidatus L. africanus is influenced by heat, as the development of symptoms occurs from 30 to 32 °C. *T. erytrae* occurs in cool climates, and is also sensitive to high temperatures combined with low relative humidity. By contrast, *Ca. L. asiaticus* is heat-tolerant; its symptoms develop in conditions of low humidity and temperatures above 35 °C, which is the temperature that *D. citri* stands (Bové, 2006; Lopes et al., 2009). Esquivel-Chávez et al. (2012) indicate that Mexican lime is more susceptible to *Ca. Liberibacter asiaticus* than Persian lime (*C. latifolia*) and sweet orange

Saltillo, México, en la década de los noventa, y se asoció primeramente con un fitoplasma (Secor & Rivera-Varas, 2004). A principios del 2000 se reportó en campos comerciales de papa en Pearsall y Valle de Río Grande, Texas. Para el 2006, la enfermedad se dispersó a otras áreas productoras, como Arizona, Kansas, Colorado, California, Nevada y Nuevo México (Munyaneza, Goolsby, Crosslin, & Upton, 2007b; Liefting et al., 2008).

En 2008, en Auckland, Nueva Zelanda se presentaron síntomas como: ápices cloróticos, moteado general en hojas, enrizado de las venas medias, achaparramiento de las plantas, reducción de la producción, decoloración en patrón de rayas en los tubérculos crudos y oscurecimientos de éstos cuando se fríen, y en algunos casos deformación de tubérculos (Munyaneza, Crosslin, & Upton, 2007a; Liefting et al., 2008).

Candidatus Liberibacter solanacearum se detectó en el psílido de la zanahoria (*Trioza apicalis*) en Finlandia en plantaciones infectadas por este insecto. *Trioza apicalis* es una plaga importante en el norte y centro de Europa, donde puede causar hasta 100 % de pérdidas. En 2009, al sur de Sinaloa, se encontró esta bacteria como patógeno en el cultivo de chile; los síntomas de las plantas fueron semejantes al “yellow psilid” que se presenta en papa, aunque también mostraron entrenudos cortos y crecimientos apicales cloróticos (Munyaneza, Sengoda, Crosslin, Garzon-Tiznado, & Cárdenas-Valenzuela, 2009). Por su parte, Camacho-Tapia et al. (2011) demostraron que esta bacteria es responsable del variegado del chile, observado en plantaciones comerciales de esta solanácea en la región de Yurécuaro, Michoacán, México, y que se puede transmitir por semilla.

En 2013, en Honduras, se reportó *Ca. L. solanacearum* en tabaco (Aguilar et al., 2013), y en 2014 se encontró en chile (Munyaneza & Segonda, 2014). Se han documentado nuevas especies de esta bacteria; como el caso de *Ca. Liberibacter europaeus* que se detectó en Italia como endófito en pera y en el psílido de ésta (*Cacopsylla pyri*) (Raddadi et al., 2010).

Factores climáticos

La temperatura tiene efecto significativo en el desarrollo de *Liberibacter* asociada a HLB y a los síntomas de la enfermedad. *Ca. L. africanus* y *Ca. L. americanus* se reportan como sensibles al calor; mientras que *Ca. L. asiaticus* aparentemente lo tolera. La sensibilidad del patógeno al calor puede explicar la distribución geográfica de estas especies de *Liberibacter* y sus insectos vectores (Munyaneza, Sengoda, Buchman, & Fisher, 2012).

Candidatus L. africanus es influido por el calor, de tal manera que el desarrollo de los síntomas ocurre

(*C. sinensis*). Flores-Sánchez et al. (2015) mention that the organoleptic characteristics of Persian lime are affected in the presence of *Ca. Liberibacter asiaticus*, and production is focused on secondary-growth branches and the outside of the tree canopy (Esquivel-Chávez et al., 2012).

At 17 °C or less, *Ca. L. solanacearum* is affected, but this does not prevent the development of *Liberibacter* in the plant, whereas at 32 °C or higher, the bacterium and the symptoms caused by it are inhibited. Therefore, it is reported that optimum development of *Ca. L. solanacearum* occurs from 27 to 32 °C. Heat sensitivity may explain the incidence and severity in producing areas (Munyanza et al., 2012).

The optimum development of the psyllid *B. cockerelli* is at 27 °C, while oviposition, hatching, development and survival are delayed or reduced at 32 °C, and cease from 35 °C (List, 2009). A single generation can be completed in three to five weeks, depending on temperature conditions that are favorable to *Ca. L. solanacearum* and development of “Zebra Chip” symptoms. Therefore, it is believed that there is coevolution among the species of *Liberibacter* and its insect vector, for sensitivity to temperature and relative humidity (Munyanza et al., 2012).

Host response

Candidatus Liberibacter is restricted to the phloem sieve elements of the host, and the salivary glands of the insect vector. In the phloem of plants infected by *Ca. L. solanacearum*, aggregations of phenolic components, peroxidases, oxidases, polyphenols, chitinases, free amino acids and sugars (sucrose, glucose and fructose) are found (Rashed, Wallis, Paetzold, Workneh, & Rush, 2013). These responses appear between the third and the fifth week after infection (Rashed et al., 2013).

Increased levels of reducing sugars and amino acids would contribute to increased browning when frying potatoes, because acrylamide formation occurs with the use of these components as substrates at frying temperature via the Maillard reaction (Wallis et al., 2014).

Samples collected in different citrus-growing regions with HLB problems reveal that there is anatomical deformation associated with the disease. Light microscopy shows multiple swellings located in the necrotic phloem and dispersed throughout the vascular system, plus massive accumulation of starch, aberrations in cambial activity and excessive formation of phloem (Schneider, 1967).

Phloem necrosis could cause blockage of the nutrient translocation stream, leading to anatomical changes

de 30 a 32 °C. *T. erytrae* se presenta en climas frescos, y también es sensible a temperaturas altas combinadas con humedad relativa baja. En contraste, *Ca. L. asiaticus* es tolerante al calor; sus síntomas se desarrollan en condiciones de humedad baja y arriba de 35 °C, que es la temperatura que resiste *D. citri* (Bové, 2006; Lopes et al., 2009). Esquivel-Chávez et al. (2012), indican que el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) es más susceptible a *Ca. Liberibacter asiaticus* que el limón persa (*C. latifolia*) y la naranja dulce (*C. sinensis*). Flores-Sánchez et al. (2015) mencionan que las características organolépticas del limón persa se ven afectadas en presencia de *Ca. Liberibacter asiaticus*, y la producción se centra en ramas de crecimiento secundario y la parte externa del dosel del árbol (Esquivel-Chávez et al., 2012).

A 17 °C o menos, *Ca. L. solanacearum* se ve afectada, pero esto no previene el desarrollo de *Liberibacter* en la planta; mientras que a 32 °C, o más, se inhibe la bacteria y los síntomas ocasionados por ésta. Por lo tanto, se reporta que el desarrollo óptimo de *Ca. L. solanacearum* se encuentra de 27 a 32 °C. La sensibilidad al calor puede explicar la incidencia y la severidad en las áreas productoras (Munyanza et al., 2012).

El desarrollo óptimo del psílido *B. cockerelli* es en 27 °C; mientras que la oviposición, eclosión, desarrollo y sobrevivencia son retardados o reducidos en 32 °C, y cesan a partir de 35 °C (List, 2009). Una sola generación puede completarse en tres a cinco semanas, según las condiciones de temperatura, mismas que son favorables a *Ca. L. solanacearum* y al desarrollo de los síntomas de “Zebra Chip”. Por lo anterior, se cree que hay coevolución entre las especies de *Liberibacter* y su insecto vector, para la sensibilidad a la temperatura y humedad relativa (Munyanza et al., 2012).

Respuesta del hospedante

Candidatus Liberibacter está restringida a los elementos cribosos del floema del hospedante, y a las glándulas salivales del insecto vector. En el floema de las plantas infectadas por *Ca. L. solanacearum* se encuentran agregaciones de componentes fenólicos, peroxidases, oxidases, polifenoles, quitinasas, aminoácidos y azúcares (sacarosa, glucosa y fructuosa) libres (Rashed, Wallis, Paetzold, Workneh, & Rush, 2013). Esas respuestas aparecen entre la tercera y la quinta semana después de la infección (Rashed et al., 2013).

El incremento de la actividad reductiva de azúcares y aminoácidos podría contribuir al aumento del tono café al freír las papas, porque la formación de acrilamida ocurre con el empleo de esos componentes como sustratos a temperatura de freído, mediante la reacción de Maillard (Wallis et al., 2014).

such as yellow blotching and vein yellowing. One of the most notable changes in the phloem of infected tree leaves is the swelling of middle lamella between cell walls surrounding sieve tubes; also, highly symptomatic old leaves showed collapses of the phloem cells close to the xylem (Folimonova & Achor, 2010). A relationship of increased HLB incidence in citrus orchards when *Phytophthora nicotianae*, which affects the fibrous roots, is present, than when only *Ca. L. asiaticus* is there, has been reported (Ann, Ko, & Su, 2004; Graham, Irey, & Taylor, 2011).

Detection of *Ca. L. asiaticus* in citrus roots indicates that it is able to move and multiply in root tissue; moreover, it causes root damage before disruption of phloem in the leaves (Graham, Johnson, Gottwald, & Irey, 2013).

B. cockerelli, carrier of *Ca. L. solanacearum*, can inoculate healthy plants during feeding; in this, the pathogen multiplies and spreads systemically throughout the host. Knowledge of the precise inoculation mechanism and transmission efficiency of the pathogen by *B. cockerelli* can be used to make predictions of the epidemic and develop integrated management strategies for the disease (Rashed, Nash, Paetzold, Workneh, & Rush, 2012).

When *Ca. L. solanacearum* is distributed throughout the plant, the amount of bacteria acquired by *B. cockerelli* is not influenced by the insect feeding site; however, if *Ca. L. solanacearum* is not fully distributed, the insects tend to acquire high amounts of pathogen when they feed on different areas of the plant or stem (Rashed et al., 2012). The number of vector insects can affect the time it takes for symptom expression, due to difference in initial injected inoculum load; although after bacterial multiplication and systemic movement within the host, the disease increases at the same rate. The number of vectors is an important factor for the success of the inoculation; however, the success rate is independent of the amount of pathogen in *B. cockerelli* (Rashed et al., 2012).

Rashed, Workneh, Paetzold, Gray, and Rush (2014) indicated that in potato there is no physiological stage where it is more susceptible to *Ca. L. solanacearum*. Incidence is related to the movement of the insect vector, and severity of symptoms is independent of the bacterial titer.

Epidemiology of *Candidatus Liberibacter*

Epidemiological studies show that *Ca. Liberibacter* species have an adjustment to β -binomial distribution, indicating the presence of aggregations of infected plants, except for cases where the incidence is less than 0.20 %, since the trend would indicate random distribution. Such aggregations are due to the different reinfection cycles and the distribution of the insect

Muestras recolectadas en diferentes regiones productoras de cítricos, con problemas de HLB, revelan que hay deformación anatómica asociada con la enfermedad. La microcopia de luz muestra múltiples abultamientos localizados en el floema necrótico y dispersos a través del sistema vascular; además de acumulación masiva de almidón, aberraciones en la actividad cambial y formación excesiva de floema (Schneider, 1967).

La necrosis del floema podría causar el bloqueo en la corriente y traslocación de nutrientes, que conducen a cambios anatómicos como: amarillamiento con moteado y amarillamiento de venas. Uno de los cambios más notables en el floema de hojas de árboles infectados es el abultamiento de la lamela media, entre las paredes celulares que rodean los tubos cribosos; además, en hojas sintomáticas viejas se presentan colapsos de las células del floema que se encuentran cerca del xilema (Folimonova & Achor, 2010). Se ha reportado una relación de aumento de incidencia de HLB en huertos de cítricos cuando está presente *Phytophthora nicotianae*, que afecta a las raíces fibrosas, que cuando solo está *Ca. L. asiaticus* (Ann, Ko, & Su, 2004; Graham, Irey, & Taylor, 2011).

La detección de *Ca. L. asiaticus* en raíces de cítricos indica que es capaz de circular y multiplicarse en el tejido de la raíz; además, causa daños a las raíces, antes de la interrupción del floema de las hojas (Graham, Johnson, Gottwald, & Irey, 2013).

B. cockerelli, portador de *Ca. L. solanacearum*, puede inocular plantas sanas durante su alimentación; en ésta, el patógeno se multiplica y se extiende sistémicamente a través del hospedante. El conocimiento del mecanismo preciso de inoculación y la eficiencia de transmisión del patógeno por *B. cockerelli*, pueden usarse para realizar predicciones de la epidemia y desarrollar estrategias de manejo integrado de la enfermedad (Rashed, Nash, Paetzold, Workneh, & Rush, 2012).

Cuando *Ca. L. solanacearum* se distribuye en toda la planta, la cantidad de bacteria adquirida por *B. cockerelli* no es influenciada por el sitio de alimentación del insecto; sin embargo, si *Ca. L. solanacearum* no está completamente distribuida, los insectos muestran tendencia para adquirir altas cantidades de patógeno cuando se alimentan de distintas áreas de las plantas o del tallo (Rashed et al., 2012). El número de insectos vectores puede afectar el tiempo que toma la expresión de los síntomas, debido a la diferencia inicial del inóculo inyectado; aunque después de la multiplicación bacteriana y el movimiento sistémico dentro del hospedante, la enfermedad se incrementa en la misma tasa. El número de vectores es un factor importante para el éxito de la inoculación; sin embargo, la tasa de éxito es independiente de la cantidad de patógeno en *B. cockerelli* (Rashed et al., 2012).

vector (Madden & Hedges, 1995; Gottwald et al., 2007; Henne, Workneh, & Rush, 2012).

Insect populations, carriers of *Ca. L. solanacearum*, tend to decrease by the amount of bacteria located in their gastrointestinal tract. It is also reported that there is a negative correlation between the nymph survival percentage and this pathogen, which affects the reinfection cycles; *B. cockerelli* adults have greater transmission efficiency compared to the nymphal stages (Nachappa et al., 2014).

Management of *Candidatus Liberibacter*

Measures to control Zebra chip depend on early detection and control of the insect vector (Ravindran, Levy, Pierson, & Gross, 2011). Due to the absence of genetic resistance, insecticides are applied to reduce the presence of the insect vector, for example thiamethoxam and abamectin (Gottwald et al., 2007; Lin & Gudmestad, 2013). Hoffman et al. (2013) indicated that thermotherapy can control HLB. The first reports of these practices were in China, where *Ca. L. asiaticus* was eliminated in budwood and seedlings after the material was exposed to hot air of 49 to 50 °C for 50-60 min (Lo, Lo, & Tang, 1981; Lo, 1983). Immersing citrus seedlings infected by *Ca. L. asiaticus* in hot water (47-50 °C) for 6 min causes heat stress and can induce defense responses in plants that help them fight the infection (Hoffman et al., 2013).

Ca. Liberibacter control focuses on reducing inoculum sources, such as the use of disease-free plants, removal of symptomatic trees and chemical control of the insect to reduce the transmission of the bacterium. In the seventies the use of tetracycline by direct injections into the trunk of HLB-affected citrus trees was assessed in South Africa, China and Indonesia, which resulted in a reduction of symptoms in the treated species. This practice was discontinued because tetracycline only has a bacteriostatic effect, so applications are required each year; also, after many injections, phytotoxicity is manifested in treated trees (Lo et al., 1981).

The combination of penicillin G and streptomycin has an antimicrobial effect against *Ca. L. asiaticus*. Penicillin G potassium is quickly assimilated by plants and is relatively less phytotoxic. The main mechanism of streptomycin action is binding to the bacterial 30S ribosome; it changes its shape and inhibits protein synthesis by causing the misreading of mRNA. According to Zhang et al. (2011b), this same treatment may also be feasible for the control of *Ca. L. solanacearum*.

Genetic transformation has been proposed as a tool to induce HLB resistance. In other crops, such as spinach,

Rashed, Workneh, Paetzold, Gray, y Rush (2014) indicaron que en papa no hay alguna etapa fisiológica donde sea más susceptible a *Ca. L. solanacearum*. La incidencia está relacionada al movimiento del insecto vector, y la severidad de los síntomas es independiente del título de la bacteria.

Epidemiología de *Candidatus Liberibacter*

De acuerdo con estudios epidemiológicos, se observa que las especies de *Ca. Liberibacter* tienen un ajuste a distribución β binomial, que indica la presencia de agregaciones de plantas infectadas; a excepción de los casos donde la incidencia es menor a 0.20 %, ya que la tendencia indicaría distribución aleatoria. Este tipo de agregaciones se debe a los diferentes ciclos reproductivos y a la distribución por parte del insecto vector (Madden & Hedges, 1995; Gottwald et al., 2007; Henne, Workneh, & Rush, 2012).

Las poblaciones de insectos, portadores de *Ca. L. solanacearum*, tienden a disminuir por la cantidad de bacterias ubicadas en su aparato digestivo. También se reporta que existe una correlación negativa de sobrevivencia de ninfas infectadas por este patógeno y que influye en los ciclos reproductivos: los adultos de *B. cockerelli* tienen mayor eficiencia de transmisión comparada con los estadios ninfales (Nachappa et al., 2014).

Manejo de *Candidatus Liberibacter*

Las medidas para el control de Zebra chip dependen de la detección temprana y el control del insecto vector (Ravindran, Levy, Pierson, & Gross, 2011). Debido a la ausencia de resistencia genética, se considera la aplicación de insecticidas para disminuir la presencia del insecto vector, por ejemplo el tiametoxan y abacmetina (Gottwald et al., 2007; Lin & Gudmestad, 2013). Hoffman et al. (2013) indicaron que la termoterapia puede controlar HLB. Los primeros reportes de estas prácticas fueron en China, donde se eliminó a *Ca. L. asiaticus* de varetas y plántulas, después de que el material se expuso en aire caliente de 49 a 50 °C por 50 a 60 min (Lo, Lo, & Tang, 1981; Lo, 1983). Sumergir las plántulas de cítricos infectadas por *Ca. L. asiaticus* en agua caliente, de 47 a 50 °C durante 6 min, causa estrés por el calor y puede inducir respuestas de defensa en las plantas que las ayuda a combatir la infección (Hoffman et al., 2013).

El control de *Ca. Liberibacter* se enfoca en reducir las fuentes de inóculo, como el uso de plantas libres, remoción de árboles sintomáticos y el control químico del insecto para reducir la transmisión de la bacteria. En la década de los setenta se evaluó el uso de tetraciclina mediante inyecciones directas en el tronco de árboles de cítricos que estaban afectados por HLB en el Sur de África, China e Indonesia, que resultó en reducción

antimicrobial peptides, which serve to control gram-negative and gram-positive bacteria, have been used. Iftikhar, Rauf, Shahzad, and Zahid (2014) transformed citrus species with antimicrobial genes (*LIMA* and *ATTE*) and grafted them onto budwood infected with *Ca. L. asiaticus*; subsequently, when analyzed by PCR, the bacterium was not found in the rootstock. Joubert and Stassen (2000) found that selective pruning by removing damaged branches significantly reduces the incidence of the disease; moreover, there is a positive impact on fruit size and yield.

Discussion

The Liberibacter are important globally. According to the review, it has been found that the bacterium affects both plant yield and quality (Wang et al., 2009). The vectors of this bacterium are of great importance. *Ca. L. asiaticus* and *Ca. L. americanus* are transmitted by *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006), and *Ca. L. africanus* by *Trioza erytrae* (Del Guercio) (McClellan & Oberholzer, 1965). For Solanaceae, the main vector is *Bactericera cockerelli*. Therefore, most of the studies are related to the interaction of the pathogen with its vector. It should be kept in mind that due to the translocation of Liberibacter, some authors indicate that when the bacterium is distributed throughout the plant, the site where the insect vector feeds does not matter; however, when Liberibacter is not dispersed, high densities thereof occur in stem and petiole (Rashed et al., 2012). Even so, when there is contagion by the insects, their density may affect the time it takes for disease expression, due to difference in initial injected inoculum load (Rashed et al., 2012).

The system becomes complex in the case of *B. cockerelli*; it has been found that in addition to carrying *Ca. L. solanacearum*, the insect has three prokaryotic intracellular bacteria (symbionts) associated with it. These symbionts are heritable and transmitted from mother to offspring (Nachappa et al., 2011).

Ca. Liberibacter, by competing with the *B. cockerelli* symbionts, causes these populations to decrease due to the amount of bacteria located in the gastrointestinal tract, thereby affecting the insect's physiological states. Adults have higher transmission efficiency compared to the nymphal stages of *B. cockerelli* because the survival rate is lower in nymphs (Nachappa et al., 2014).

One of the control mechanisms for these bacteria is to reduce the inoculum sources, such as by using disease-free plants, removing symptomatic trees and applying chemicals to control the insect vector to reduce the transmission of the bacterium. In addition, pathosystems as an integrative system need to be

de los síntomas en las especies tratadas. Esta práctica se discontinuó debido a que la tetraciclina solo tiene efecto bacteriostático, de tal manera que se necesitan aplicaciones cada año; además, después de muchas inyecciones se manifiesta fitotoxicidad en los árboles tratados (Lo et al., 1981).

La combinación de penicilina G y estreptomicina tiene efecto antimicrobial contra *Ca. L. asiaticus*. La penicilina potasio G se asimila rápidamente por las plantas y es relativamente menos fitotóxica. El principal mecanismo de acción de la estreptomicina está vinculado al ribosoma 30S de la bacteria; cambia su forma e inhibe la síntesis de proteínas y provoca una lectura errónea del RNAm. Según Zhang et al. (2011b), ese mismo tratamiento también puede ser viable para el control de *Ca. L. solanacearum*.

La transformación genética se propone como una herramienta para inducir resistencia al HLB. En otros cultivos, como espinacas, se han usado los péptidos antimicrobianos, que sirven para el control de bacterias gram negativas y positivas. Iftikhar, Rauf, Shahzad, y Zahid (2014), transformaron especies de cítricos con genes antimicrobianos (*LIMA* y *ATTE*) y se les injertó varetas infectadas con *Ca. L. asiaticus*; posteriormente, al ser analizadas mediante PCR, la bacteria no se encontró en el portainjerto. Joubert y Stassen (2000) encontraron que la poda selectiva, mediante la eliminación de ramas dañadas, reduce significativamente la incidencia de la enfermedad; además de que hay un impacto positivo en el tamaño de la fruta y el rendimiento.

Discusión

Las Liberibacter son importantes a nivel mundial. De acuerdo con la revisión realizada, se ha encontrado que la bacteria afecta el rendimiento en las plantas, además de la calidad (Wang et al., 2009). Los vectores de esta bacteria son de gran importancia. *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. americanus* son transmitidas por *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Capoor et al., 1967; Yamamoto et al., 2006), y *Ca. L. africanus* por *Trioza erytrae* (Del Guercio) (McClellan & Oberholzer, 1965). En el caso de solanáceas, el principal vector es *Bactericera cockerelli*. Por lo tanto, la mayor parte de los estudios están relacionados con la interacción del patógeno con su vector. Es de considerar que debido a la traslocación de Liberibacter algunos autores indiquen que cuando la bacteria se distribuye en toda la planta, no importa el sitio de donde se alimente el insecto vector; sin embargo, cuando Liberibacter no se dispersa, se presentan altas densidades de ésta en tallo y peciolo (Rashed et al., 2012). Aun así, cuando hay contagio por los insectos, la densidad de éstos puede afectar el tiempo que toma la expresión de los síntomas, debido a la diferencia inicial del inóculo inyectado (Rashed et al., 2012).

further studied using epidemiological tools, in order to have a better understanding of the interaction in the field and establish control measures.

Conclusions

Candidatus Liberibacter is of great economic importance. Knowing its biological, ecological and epidemiological aspects provides a better understanding of its relationship with the pathosystem where it is found. Understanding the pathosystem provides the tools to design control strategies and restore balance to the agricultural system.

The insect vectors of *Ca. Liberibacter* have co-evolved depending on the optimum climate conditions for their development. Moreover, these bacteria evolve and may have genetic variations, such as those identified in the haplotypes of *Ca. L. solanacearum* where severity is influenced by these variations. Changes in haplotypes have an impact on the incidence and severity of the bacterium, affecting the speed of the onset of symptoms and the formation of aggregations of diseased plants.

Insect vector control is necessary, since it is the most common form of dissemination in the various species of *Liberibacter*; although seed transmission also has an impact, the introduction of the pathogen from the seedling stage creates a source of primary inoculum, which affects the formation of the foci of infection and the incidence of diseased plants in the field.

End of English version

References / Referencias

- Aguilar, E., Segonda, V. G., Bextine, B., McCue, K. F., & Munyaneza, J. E. (2013). First report of "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" on Tobacco in Honduras. *Plant Disease*, 97(10), 1376. doi: 10.1094/PDIS-04-13-0453-PDN
- Ann, P. J., Ko, W. H., & Su, H. J. (2004). Interaction between Likubin Bacterium and *Phytophthora parasitica* in citrus hosts. *European Journal Plant Pathology*, 110(1), 1-6. doi: 10.1023/B:EJPP.0000010129.03948.d6
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly emerging, century old disease of citrus. *Journal Plant Pathology*, 88(1), 7-37. Recuperado de <http://sipav.org/main/jpp/volumes/0106/010602.pdf>
- Camacho-Tapia, M., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Hernández-Deheza, M. G., Carrillo-Salazar, J. A., Rebollar-Alviter, A., & Ochoa-Martínez, D. L. (2011). Aetiology of chili pepper variegation from Yurécuaro, México. *Journal Plant Pathology*, 93(2), 331-335. Recuperado de http://www.jstor.org/stable/41999003?seq=1#page_scan_tab_contents
- Capoor, S. P., Rao, D. G., & Visnawanath, S. M. (1967). *Diaphorina citri* Kuwayama, a vector of the greening

El sistema se torna complejo para el caso de *B. cockerelli*, se ha encontrado que además de portar *Ca. L. solanacearum*, el insecto cuenta con tres bacterias intracelulares procarióticas (simbiontes) que se asocian con el insecto. Esos simbioses son heredables y se transmiten de la madre a la progenie (Nachappa et al., 2011).

Ca. Liberibacter, al competir con los simbiontes de *B. cockerelli*, ocasiona que las poblaciones de éstos tiendan a disminuir por la cantidad de bacterias ubicadas en el aparato digestivo; de tal manera que se ven afectados los estados fisiológicos del insecto. Los adultos tienen mayor eficiencia de transmisión comparada con los estadios ninfales de *B. cockerelli*, debido a que la tasa de supervivencia es menor en ninfas (Nachappa et al., 2014).

Uno de los mecanismos de control para estas bacterias es reducir las fuentes de inóculo, como el uso de plantas libres, remoción de árboles sintomáticos y control químico del insecto vector para reducir la transmisión de la bacteria; además del estudio de los patosistemas como un sistema integrativo mediante herramientas epidemiológicas, con el fin de tener un mayor entendimiento de la interacción en campo y establecer medidas de control.

Conclusiones

Candidatus Liberibacter es de gran importancia económica, conocer los aspectos biológicos, ecológicos y su epidemiología, provee de un mejor entendimiento con respecto a la relación que tiene con el patosistema donde se encuentra. El entendimiento del patosistema proporciona las herramientas para diseñar estrategias de control y restablecer el equilibrio del sistema agrícola.

Los insectos vectores de *Ca. Liberibacter* han coevolucionado según las condiciones climáticas óptimas para su desarrollo. Además, estas bacterias evolucionan y pueden presentar variaciones genéticas, como las que se identificaron en los haplotipos de *Ca. L. solanacearum* donde la severidad es influida por esas variaciones. Los cambios en haplotipos tienen impacto desde la incidencia hasta la severidad de la bacteria, afectando la velocidad de la aparición de los síntomas y la formación de agregaciones de plantas enfermas.

Es necesario el control del insecto vector, pues es la forma de diseminación más común en las especies de *Liberibacter*; aunque también la transmisión por semilla es de impacto, la introducción del patógeno desde la etapa de plántula crea una fuente de inóculo primario, afecta la formación de los focos de infección y la incidencia de plantas enfermas en campo.

Fin de la versión en español

- disease of citrus in India. *Indian Journal Agricultural Science*, 37, 572-576.
- Davis, M. J., Mondal, S. N., Chen, H., Rogers, M. E., & Brlansky, R. H. (2008). Co-cultivation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' with actinobacteria from citrus with huanglongbing. *Plant Disease*, 92(11), 1547-1550. doi: 10.1094/PDIS-92-11-1547
- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaimes, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramirez, M. A., Flores-Sánchez, J. L., & López-Arroyo, I. (2012). Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia*, 46(8), 769-782. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952012000800003&script=sci_arttext
- Flores-Sánchez, J. L., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., López-Arroyo, J. I., Domínguez-Monge, S., Acevedo-Sánchez, G., & Robles-García, P. (2015). Pérdidas en producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en limón persa, en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(2), 195-210.
- Folimonova, S. Y., & Achor, D. S. (2010). Early events of citrus greening (Huanglongbing) disease development at the ultrastructural level. *Phytopathology*, 100(9), 949-958. doi: 10.1094/PHYTO-100-9-0949
- Gottwald, T. R., da Graça, J. V., & Bassanezi, R. B. (2007). Citrus huanglongbing: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. Online publication. doi: 10.1094/PHP-2007-0906-01-RV
- Graham, J., Irey, M., & Taylor, J. (2011). Phytophthora damage to roots: A potential contributor to decline of HLB affected trees. *Citrus Industry*, 92, 20-23.
- Graham, J. H., Johnson, E. G., Gottwald, T. R., & Irey, M. S. (2013). Presymptomatic fibrous root decline in citrus trees caused by huanglongbing and potential interaction with *Phytophthora* spp. *Plant Disease*, 97(9), 1195-1199. doi: 10.1094/PDIS-01-13-0024-RE
- Halbert, S. (2005). The discovery of huanglongbing in Florida. In T. R. Gottwald, & J. H. Graham (Eds.), *Proc. 2nd Int. Workshop* (pp: 50). Gainesville, Florida: Department of Agriculture & Consumer Services.
- Henne, D. C., Workneh, F., & Rush, C. M. (2012). Spatial patterns and spread of potato zebra chip disease in the Texas Panhandle. *Plant Disease*, 96(7), 948-956. doi: 10.1094/PDIS-09-11-0805-RE
- Hoffman, M. T., Doud, M. S., Williams, L., Zhang, M. Q., Ding, F., Stover, E., Hall, D., Zhang, S., Jones, L., Gooch, M., Fleites, L., Dixon, W., Gabriel, D., & Duan, Y. P. (2013). Heat treatment eliminates 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology*, 103(1), 15-22. doi: 10.1094/PHYTO-06-12-0138-R
- Iftikhar, Y., Rauf, S., Shahzad, U., & Zahid, M. A. (2014). Huanglongbing: pathogen detection system for integrated disease management-A review. *Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences*. doi: 10.1016/j.jssas.2014.04.006
- Jagueix, S., Bové, J. M., & Garnier, M. (1994). The phloem limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *International Journal Systematic Bacteriology*, 44(3), 379-386. Recuperado de <http://www.imok.ufl.edu/hlb/database/pdf/00001112.pdf>
- Joubert, F. J., & Stassen, P. J. C. (2000). The effect of time of pruning on yield, fruit size and greening disease incidence of Valencia citrus trees. *Neltropika. Bulletin* 309, 28-31.
- Liefting, L. W., Pérez-Egusquiza, Z. C., Clover, G. R. G., & Anderson, J. A. D. (2008). A new 'Candidatus Liberibacter' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92(10), 1474. doi: 10.1094/PDIS-92-10-1474A
- Lin, H., & Gudmestad, N. C. (2013). Aspects of pathogen genomics, diversity, epidemiology, vector dynamics, and disease management for a newly emerged disease of potato: Zebra chip. *Phytopathology*, 103, 524-537. doi: 10.1094/PHYTO-09-12-0238-RVW
- List, G. M. (2009). The effect of temperature upon egg deposition, egg hatch and nymphal development of *Paratrioza cockerelli* (Sulc). *Journal Economic Entomology*, 32(1), 30-36. doi: 10.1093/jee/32.1.30
- Lo, X. H., Lo, D. D., & Tang, W. W. (1981). Studies on the thermotherapy of citrus yellow shoot disease. *Acta Phytophylacica Sinica*, 8(1), 47-51.
- Lo, X. (1983). Studies on the sterilization effect of the intermittent hot water treatment on citrus budwood and nursling infected with citrus yellow shoot. *Journal Science China Agriculture University*, 1, 97-102.
- Lopes, S. A., Frare, G. F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N. G., Ayres, A. J., Martin, D. R., & Bove, J. M. (2009). Liberibacter associated with citrus huanglongbing in Brazil: 'Candidatus Liberibacter asiaticus' is heat tolerant, 'Ca. L. americanus' is heat sensitive. *Plant Disease*, 93, 257-262. doi: 10.1094/PDIS-93-3-0257
- McClellan, A. P. D., & Oberholzer, P. C. J. (1965). Citrus psylla, a vector of greening disease of sweet orange. *South African Journal Agricultural Science*, 8, 297-298.
- Madden, L. V., & Hughes, G. (1995). Plant disease incidence: distributions, heterogeneity, and temporal analysis. *Annual Review Phytopathology*, 33, 529-564. doi: 10.1146/annurev.py.33.090195.002525
- Munyanza, J. E., Crosslin, J. M., & Upton, J. E. (2007a). Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with "zebra chip", a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *Journal Economic Entomology*, 100(3), 656-663.
- Munyanza, J. E., Goolsby, J. A., Crosslin, J. M., & Upton, J. E. (2007b). Further evidence that zebra chip potato disease in the Lower Rio Grande Valley of Texas is associated with *Bactericera cockerelli*. *Subtropical Plant Science Journal*, 59, 30-37.
- Munyanza, J. E., Sengoda, V. G., Crosslin, J. M., Garzon-Tiznado, J. A., & Cárdenas-Valenzuela, O. G. (2009). First report of *Candidatus Liberibacter solanacearum* in pepper plants in México. *Plant Disease*, 93(10), 10-76. doi: 10.1094/PDIS-93-10-1076B
- Munyanza, J. E., Sengoda, V. G., Buchman, J. L., & Fisher, T. W. (2012). Effects of temperature on 'Candidatus

- Liberibacter solanacearum' and zebra chip potato disease symptom development. *Plant Disease*, 96(1), 18-23. doi: 10.1094/PDIS-03-11-0185
- Munyaneza, J. E., & Segonda, V. G. (2014). First report of "Candidatus Liberibacter solanacearum" on pepper in Honduras. *Plant Disease*, 98(1), 154. doi: 10.1094/PDIS-06-13-0598-PDN
- Nachappa, P., Levy, J., Pierson, E., & Tamborindoguy, C. (2011). Diversity of endosymbionts in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), vector of zebra chip disease of potato. *Current Microbiology*, 62(5), 1510-1520. doi: 10.1007/s00284-011-9885-5
- Nachappa, P., Shapiro, A. A., & Tamborindoguy, C. (2012). Effect of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' on fitness of its insect vector, *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Triozidae), on tomato. *Phytopathology*, 102(1), 41-46. doi: 10.1094/PHYTO-03-11-0084
- Nachappa, P., Levy, J., Pierson, E., & Tamborindoguy, C. (2014). Correlation between "Candidatus Liberibacter solanacearum" infection levels and fecundity in its psyllid vector. *Journal Invertebrate Pathology*, 115, 55-61. doi: 10.1016/j.jip.2013.10.008
- Nelson, W. R., Munyaneza, J. E., McCue, K. F., & Bové, J. M. (2013). The Pangaean origin of 'Candidatus Liberibacter' species. *Journal Plant Pathology*, 95, 455-461. doi: 10.4454/JPPV95I3.001
- Parker, J. K., Wisotsky, S. R., Johnson, E. G., Hijaz, F. M., Killiny, N., Hilf, M. E., & de la Fuente, L. (2014). Viability of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' prolonged by addition of citrus juice to culture medium. *Phytopathology*, 104(1), 15-26. doi: 10.1094/PHYTO-05-13-0119-R
- Raddadi, N., Gonella, E., Camerota, C., Pizzinat, A., Tedeschi, R., Crotti, E., Mandrioli, M., Bianco, P. A., Daffonchio, D., & Alma, A. (2010). 'Candidatus Liberibacter europaeus' sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. *Environmental Microbiology*, 13(2), 414-426. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02347.x
- Rashed, A., Nash, T. D., Paetzold, L., Workneh, F., & Rush, C. M. (2012). Transmission efficiency of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' and potato zebra chip disease progress in relation to pathogen titer, vector numbers, and feeding sites. *Phytopathology*, 102(11), 1079-1085. doi: 10.1094/PHYTO-04-12-0094-R
- Rashed, A., Wallis, C. M., Paetzold, L., Workneh, F., & Rush, C. M. (2013). Zebra chip disease and potato biochemistry: tuber physiological changes in response to 'Candidatus Liberibacter solanacearum' infection over time. *Phytopathology*, 103(5), 419-426. doi: 10.1094/PHYTO-09-12-0244-R
- Rashed, A., Workneh, F., Paetzold, L., Gray, J., & Rush, C. M. (2014). Zebra chip disease development in relation to plant age and time of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' infection. *Plant Disease*, 98(1), 24-31. doi: 10.1094/PDIS-04-13-0366-RE
- Ravindran, A., Levy, J., Pierson, E., & Gross, D. (2011). Development of primers for improved PCR detection of the potato zebra chip pathogen, 'Candidatus Liberibacter solanacearum'. *Plant Disease*, 95(12), 1542-1546. doi: 10.1094/PDIS-05-11-0386.
- Sechler, A., Schuenzel, E. L., Cooke, P., Donnua, S., Thaveechai, N., Postnikova, E., Stone, A. L., Schneider, W. L., Damsteegt, V. D., & Schaad, N. W. (2009). Cultivation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', 'Ca. L. africanus', and 'Ca. L. americanus' associated with huanglong-bing. *Phytopathology*, 99(5), 480-486. doi: 10.1094/PHYTO-99-5-0480
- Secor, G. A., & Rivera-Varas, V. V. (2004). Emerging diseases of cultivated potato and their impact on Latin America. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 1, 1-8.
- Schneider, H. (1967). Phloem necrosis associated with the greening disease of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Phytopathology*, 57(8), 829.
- Thao, M. L., Moran, N. A., Abbot, P., Brennan, E. B., Burckhardt, D. H., & Baumann, P. (2000). Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. *Applied Environmental Microbiology*, 66(7), 2898-2905. doi: 10.1128/AEM.66.7.2898-2905.2000
- Wang, N., Li, W., Irely, M., Albrigo, G., Bo, K., & Kim, J. S. (2009). Citrus huanglongbing. *Tree and Forestry Science Biotechnology*, 3(2), 66-72.
- Wallis, C. M., Rashed, A., Wallingford, A. K., Paetzold, L., Workneh, F., & Rush, C. M. (2014). Similarities and differences in physiological responses to 'Candidatus Liberibacter solanacearum' infection among different potato cultivars. *Phytopathology*, 104(2), 126-133. doi: 10.1094/PHYTO-05-13-0125-R
- Wulff, N. A., Zhang, S., Setubal, J. C., Almeida, N. F., Martins, E. C., Harakawa, R., Kumar, D., Rangel, L. T., Foissac, X., Bové, J. M., & Gabriel, D. W. (2014). The complete genome sequence of "Candidatus Liberibacter americanus" associated with citrus huanglongbing. *Molecular Plant Microbe-Interaction*, 27(2), 163-176. doi: 10.1094/MPMI-09-13-0292-R
- Yamamoto, P. T., Felipe, M. R., Garbim, L. F., Coelho, J. H. C., Ximenes, N. L., Martins, E. C., Leite, A. P. R., Sousa, M. C., Abrahão, D. P., & Braz, J. D. (2006). *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Hemiptera: Psyllidae): Vector of the bacterium *Candidatus Liberibacter americanus*. In *Proc. Int. Huanglongbing-Greening Workshop* (p.p. 96). University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.
- Zhang, S., Flores-Cruz, Z., Zhou, L., Kang, B. H., Fleites, L. A., Gooch, M. D., Wulff, N. A., Davis, M. J., Duan, Y. P., & Gabriel, D. W. (2011a). *Ca. Liberibacter asiaticus*' carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 24(4), 458-468. doi: 10.1094/MPMI-11-10-0256
- Zhang, M. Q., Powell, C. A., Zhou, L. J., He, Z. L., Stover, E., & Duan, Y. P. (2011b). Chemical compounds effective against the citrus Huanglongbing bacterium 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in plant. *Phytopathology*, 101(9), 1097-1103. doi: 10.1094/PHYTO-09-10-0262