

# LA AMENAZA DE ENFERMEDADES EMERGENTES: SITUACIÓN ACTUAL Y AVANCES CIENTÍFICOS EN HLB

**Ester Marco Noales**

*Centro de Protección Vegetal y Biotecnología  
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada (Valencia)*

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad denominada Huanglongbing (HLB), también conocida como "greening", que fue observada por primera vez en Asia hace más de un siglo, está considerada hoy en día como la más destructiva de los cítricos, debido a su complejidad, su capacidad de devastación y su resistencia a ser controlada, ya que la mayoría de las especies y cultivares comerciales de cítricos son susceptibles a la misma. Los cítricos constituyen uno de los frutales más importantes del mundo, tanto en cuanto a su mercado de producción y transformación como a su comercio global (Liu et al., 2012). China es el mayor productor mundial, seguida de Brasil, la India, Estados Unidos, México y España (FAO, 2017a, b). De estos seis países, solo España está libre, hoy por hoy, de HLB, enfermedad que ha llegado a erigirse en el mayor desafío que tienen los productores de cítricos, ya que reduce el rendimiento y la calidad de la fruta y debilita mucho el árbol (Qureshi y Stansly, 2009).

El HLB está causado por bacterias que viven en el floema de la planta y son transmitidas por determinados insectos (psílidos). Las bacterias asociadas a la enfermedad, que todavía no han podido cultivarse en el laboratorio, pertenecen a tres especies: 'Candidatus Liberibacter asiaticus' (CaLas), 'Candidatus Liberibacter africanus' (CaLaf) y 'Candidatus Liberibacter americanus' (CaLam), según el área geográfica donde primero se encontraron (Bové, 2006). El psílido *Diaphorina citri* es el vector natural de CaLas y CaLam, mientras que *Trioza erytreae* es el de CaLaf (Bové, 2006).

Los síntomas característicos del HLB consisten en un moteado difuso con clorosis asimétrica del limbo foliar (Fig. 1), que es lo que originó el nombre de enfermedad del brote amarillo (huanglongbing en chino), y en frutos más pequeños de lo normal, deformes, internamente asimétricos, con inversión de color (la coloración naranja se inicia en la zona peduncular y avanza hacia la estilar), en los que las semillas pueden llegar a abortarse, y que con frecuencia caen prematuramente y tienen sabor amargo (Bové, 2006; Martinelli y Dandekar, 2017). El árbol afectado tiene limitado el transporte de fotoasimilados y la entrada de nutrientes, y eso lleva a la defoliación de la copa y al desarrollo de raíces fibrosas, que conducen a la muerte del árbol unos diez años después de los primeros síntomas (Bové, 2006).

Todas las especies de Rutáceas son hospedadores potenciales y todas las variedades de cítricos cultivados son susceptibles al HLB, aunque en diferente grado (Folimonova et al., 2009; Gottwald et al., 2012; Hao et al., 2016). Históricamente, las más susceptibles son el naranjo dulce (*Citrus sinensis* L. Osb.), el tangelo (*Citrus* × tangelo) y el mandarino (*C. reticulata* Blanco); entre las moderadamente susceptibles están el pomelo (*C. paradisi* Macf.), el limón (*Citrus* × limon), la lima 'Rangpur' (*Citrus* × limonia Osb.), el calamondín (*X Citrofortunella microcarpa*) y el pomelo chino (*C. maxima*); más tolerantes son la lima mexicana (*Citrus* × aurantifolia Swingle) y el naranjo trifoliado (*C. trifoliata* o *Poncirus trifoliata*). Las especies de Rutáceas no cítricas, como *Murraya paniculata*, también sirven como hospedadoras de las bacterias asociadas al HLB (Timmer et al., 2000; Appel, 2004; Lopes et al., 2005; Bové, 2006).

A pesar de que los síntomas de HLB se conocían desde finales del siglo XIX,



y de los continuados esfuerzos para controlar la enfermedad, todavía hoy en día se carece de tratamientos técnicamente factibles, sostenibles y seguros para el medio ambiente (Grafton-Cardwell et al., 2013; Martinelli y Dandekar, 2017), tanto para eliminar las bacterias como sus vectores. Por tanto, hay una urgente necesidad de desarrollar estrategias efectivas para mitigar el HLB.

Figura 1. Síntomas de HLB en árboles de naranjo. Sudáfrica, 2018. (A. Tena, IVIA)

## **SITUACIÓN ACTUAL**

El HLB podría haberse originado en el sur de China, donde Reinking describió el amarilleamiento y el moteado en las hojas en 1919 (Bové, 2006). Sin embargo, parece que estos síntomas ya se habían observado en la India en los siglos XVIII y XIX, y en 1912 llegó a ser un grave problema en la provincia de Bombay (Capoor, 1963). En la década de los 70 del siglo XX, el HLB ya había devastado muchas regiones productoras de Asia y África. Y en esa época, el vector asiático, *D. citri*, ya estaba establecido en el hemisferio occidental desde hacía décadas, habiéndose identificado en Brasil en 1942 (da Costa Lima, 1942). En 1998, *D. citri* se encontró en el sur de Florida y poco después estaba por todo el estado (Halbert y Manjunath, 2004). En 2004, el HLB se detectó

por primera vez en las Américas, en el estado de São Paulo en Brasil. En 2005 se detectó en el condado de Miami-Dade en Florida y, desde entonces, se ha detectado en otros seis estados de los Estados Unidos: California, Georgia, Hawaii, Luisiana, Carolina del sur y Texas. Actualmente, el HLB está extendido por más de 40 países (Croxtton y Sansly, 2014), y los mayores productores del mundo están particularmente amenazados por esta enfermedad (do Brasil Cardinali et al., 2012; FAOSTAT, 2009). El impacto económico del HLB es muy severo. Por poner solo un ejemplo, el volumen de producción en Florida cayó un 58% desde la primera detección de CaLas en 2005, y se ha calculado que los daños a la industria de cítricos en este estado exceden los 4,5 billones de dólares, con una pérdida acumulada de unos 374 millones de dólares por año, habiendo pasado la superficie dedicada a los cítricos de 303.514 hectáreas a 192.630 en el período entre 2000 y 2014 (Hodges y Spreen, 2012; Hodges et al., 2014). Actualmente, la incidencia del HLB en Florida ha alcanzado o está muy próxima al 100%, y la eliminación del inóculo de parcelas individuales ya no es una opción.

Es una enfermedad que hoy día es difícil de manejar por varias razones (Fletcher et al., 2018): la naturaleza perenne del cítrico, la susceptibilidad de las plantas hospedadoras y la dificultad para producir cultivares resistentes, la ausencia de resistencia en especies filogenéticamente próximas, la resiliencia de las bacterias patógenas asociadas al HLB, su distribución en la planta, la incapacidad para cultivarlas en el laboratorio, el decisivo papel de los insectos vectores en la transmisión y el problema del modo de administración de productos terapéuticos tanto en la planta como en el vector; en definitiva, la complejidad de las interacciones entre la bacteria patógena, el vector y la planta hospedadora, en ausencia de un buen sistema modelo en el que estudiar estas interacciones. El manejo del HLB tiene que incluir necesariamente un conjunto integrado de estrategias dirigidas a reducir el inóculo de la bacteria en el campo (basándose en la presencia de un sistema de detección fiable), el control de las poblaciones del vector, la quimioterapia y la producción de material de propagación libre de la enfermedad.

## **AVANCES CIENTÍFICOS EN EL CONOCIMIENTO DEL HLB Y EN LAS ESTRATEGIAS PARA SU CONTROL**

### **Biología de las bacterias asociadas al HLB**

Las bacterias asociadas a esta enfermedad, CaLas, CaLaf y CaLam, son tres especies de bacterias Gram-negativas del género 'Candidatus Liberibacter' de la familia Rhizobiaceae. Las tres especies están restringidas al floema de la planta y la hemolinfa de sus insectos vectores, y hasta el momento no se han podido cultivar en el laboratorio, a pesar de los avances recientes que se han hecho por genómica comparativa (Fagen et al., 2014), lo que hace que el estatus taxonómico sea el de "Candidatus". De hecho, el estudio de los meca-

nismos que permiten la colonización de la planta e inducen enfermedad se ve dificultado por esta incapacidad para cultivarlas, y mucho de lo que se sabe o especula se ha deducido de las secuencias del genoma completo de las tres especies que hay depositadas en las bases de datos. Son genomas de tamaño más pequeño y con menos genes que los de bacterias cultivables relacionadas (Duan et al., 2009; Zheng et al., 2014), lo que refleja que han perdido diversas funciones en su proceso de adaptación a una vida intracelular dentro de la planta hospedadora y del insecto vector.

Una vez la bacteria ha sido inoculada en el floema de la planta por el vector, su población se va incrementando, alcanzando aproximadamente 108 células bacterianas por gramo de tejido en unos 6-7 meses (Coletta-Filho et al., 2014). Sin embargo, los árboles infectados permanecen asintomáticos durante los primeros estadios de la enfermedad, y los síntomas tempranos son difíciles de reconocer debido a que son muy leves y fácilmente confundibles con los causados por otras condiciones.

### **Interacciones entre las bacterias asociadas al HLB, las plantas hospedadoras y los insectos vectores**

Se ha demostrado que CaLas parece suprimir las respuestas defensivas en los cítricos, como pueden ser las especies reactivas del oxígeno y el ácido acetil-salicílico, mediante la secreción de determinadas proteínas (Nwugo et al., 2013; Jain et al., 2015; Li et al., 2017). La planta responde a la infección bacteriana reprogramando la expresión de sus genes. La respuesta es generalmente más fuerte en los primeros estadios de la infección, y es mayor en los cultivares tolerantes que en los susceptibles (Albrecht y Bowman, 2012a; Fan et al., 2012; Rawat et al., 2015, 2017; Wang et al., 2016; Hu et al., 2017; Yu et al., 2017). Se sobreexpresan genes implicados en diversos procesos biológicos como las respuestas de defensa, la fotosíntesis, el metabolismo, las señales mediadas por hormonas, la síntesis de pared celular y los procesos de oxidación-reducción. También se sobreexpresan los genes relacionados con la deposición de calosa en el floema de las plantas infectadas y con la biosíntesis de almidón (Boava et al., 2017), lo que apoya la hipótesis de que la deposición de calosa interfiere con el transporte de los productos fotosintéticos por el floema, favoreciendo los síntomas de HLB (Kim et al., 2009; Koh et al., 2012; Martinelli et al., 2013; Boava et al., 2017). Las interacciones planta-bacteria en el HLB incluyen no solo respuestas del hospedador relacionadas con sus funciones celulares sino también respuestas derivadas de la manipulación de las rutas metabólicas por parte de la bacteria para su propio beneficio, ya que las utiliza para adquirir nutrientes y codificar transportadores y enzimas para metabolizar los nutrientes producidos por el hospedador (Killiny y Hijaz, 2016; Killiny y Nehela, 2017).

Las bacterias asociadas al HLB son dependientes de los vectores para moverse entre plantas hospedadoras, lo que probablemente contribuye a su super-

vivencia a largo plazo (Inoue et al., 2009; Ammar et al., 2016). Aunque puede que no se repliquen eficientemente en todos los estadios de los psílidos, parece claro que sobreviven durante largos períodos en el insecto y pueden ser transmitidas verticalmente, aunque la frecuencia es baja (Mann et al., 2011). Incluso se ha observado que varios genes de CaLas se expresan diferencialmente según las bacterias estén asociadas a planta o a insecto (Fletcher et al., 2018). La eficiencia biológica de los insectos vectores se ve afectada por la presencia de estas bacterias, por lo que se consideran patógenas tanto para la planta como para el insecto. Hay algunas evidencias de que las especies de 'Candidatus Liberibacter' podrían haber evolucionado primero como bacterias patógenas de insectos o como simbioses, y después llegaron a ser bacterias patógenas de plantas (Gottwald, 2010).

### **Diagnóstico del HLB y detección de las bacterias asociadas**

Para un buen manejo del HLB, la primera medida es disponer de métodos de detección y diagnóstico precisos, sensibles y con una adecuada relación calidad-precio. El diagnóstico está basado principalmente en la prospección para la búsqueda de síntomas, pero la inspección visual está muy sometida a una interpretación subjetiva y se ha calculado una precisión media de entre un 47 y un 59% (Futch et al., 2009), pudiendo ser los errores, por tanto, mayores al 30% (Pereira et al. 2011), ya que los síntomas del HLB pueden ser confundidos con otros problemas bióticos o abióticos que afectan a la salud de la planta (Lin et al., 2010). Para el diagnóstico se han empleado también métodos como la microscopía electrónica, la serología, las sondas de ADN, los ensayos enzimáticos y la PCR convencional y cuantitativa. Pero todos estos métodos no permiten, hoy por hoy, una detección temprana de las bacterias asociadas al HLB. La detección temprana es crítica para reducir la diseminación de esta enfermedad y minimizar el impacto económico de los diagnósticos erróneos.

El principal desafío para la detección es el muestreo, dificultado por la desigual distribución espacio-temporal de 'Candidatus Liberibacter' spp. tanto en las plantas como en los insectos, y por el largo período de latencia entre la inoculación y el momento en que se puede detectar la bacteria. El método estándar aceptado por muchos laboratorios y por las agencias reguladoras para una determinación inicial de infección por 'Candidatus Liberibacter' spp. es la PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real de Li et al. (2006), dirigida a una secuencia del gen ribosómico 16S. Después, se pueden realizar ensayos con PCR convencional y secuenciación del ADN para verificación final. La qPCR puede detectar hasta una copia del ADN, y es por ello que el reto más importante no es la sensibilidad sino la distribución desigual espacio-temporal (Kunta et al., 2014; Louzada et al., 2016). Diversos estudios han demostrado que la detección de estas bacterias en árboles infectados se demora desde varias semanas a meses después del momento de la inoculación, dependiendo del tamaño y el tipo de árbol (Bové, 2006; Gottwald, 2010). De hecho, la

planta es una fuente de inóculo bacteriano para el vector mucho tiempo antes de que las bacterias puedan ser detectadas.

En cuanto a los métodos de detección remota, se sabe que los parámetros del espectro electromagnético proporcionan información sobre el estrés fisiológico de la planta y se pueden encontrar diferencias entre plantas sanas y enfermas en la región del visible-infrarrojo (Purcell et al. 2009). Se han hecho varios ensayos comparando plantas sanas y plantas afectadas por HLB que han demostrado el potencial de la espectroscopía para detectar la infección por HLB en condiciones de campo (García-Ruiz et al., 2013; Mishra et al., 2011). Estas técnicas se han de seguir desarrollando, centrándose en equipamientos de bajo coste que permitan una detección espectroscópica rápida con reducción de falsos positivos (Arredondo et al., 2016).

Se han estudiado también otros métodos de diagnóstico. Así, la determinación de la cantidad de almidón en la hoja del cítrico permite diferenciar hojas infectadas por HLB, ya que en éstas se produce una acumulación de almidón, de otras con síntomas visualmente análogos como la deficiencia de zinc (Pourezza et al., 2014, 2015). También el análisis químico, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, de compuestos orgánicos volátiles que emanan de árboles infectados por HLB muestra que la huella de estos biomarcadores es específica de las bacterias asociadas al HLB y podría ser una herramienta muy útil (Aksenov et al., 2014). La puesta a punto de técnicas de detección y diagnóstico sensibles y específicas no es solo importante para determinar la presencia de la bacteria, sino también para la evaluación de cualquier tratamiento sobre las poblaciones de '*Candidatus Liberibacter*' spp., ya que la interpretación de los resultados es muy dependiente del método de detección utilizado (Blaustein et al., 2018).

### **Control del HLB**

Las dos estrategias básicas de manejo de enfermedades bacterianas transmitidas por vector son: reducir la población de vectores y reducir la cantidad de inóculo disponible para los vectores. En el caso del HLB, la efectividad de estas estrategias está avalada por la investigación científica (Belasque et al., 2010; Ayres et al., 2015; Bergamin Filho et al., 2016), pero solo tienen éxito si la epidemia está en los primeros estadios, cuando el nivel de inóculo es relativamente bajo, mientras que en áreas donde el HLB ha llegado a estar bien establecido el efecto puede limitarse simplemente a ralentizar la dispersión de la enfermedad y disminuir sus consecuencias (Monzo y Stansly, 2017). Además, la optimización de estas estrategias dependerá de las tecnologías de detección temprana, de manera que los árboles infectados se puedan identificar y eliminar antes de que lleguen a constituir una fuente de inóculo para el vector. Aunque esta forma de control es esencial, por sí sola no puede mitigar las consecuencias a largo plazo de la enfermedad (Blaustein et al., 2018). A esto hay que añadir que cualquier medida frente al HLB dependerá

de su implementación en un área extensa y de una participación cooperativa de todos los productores. Las aplicaciones de insecticidas en Florida no fueron muy efectivas debido a la participación incompleta de los agricultores en determinadas zonas (Singerman et al., 2017). Además, en Florida no se han eliminado los árboles de parcelas abandonadas y de áreas urbanas cercanas a las zonas de producción de cítricos, con lo que la presión de estas fuentes de inóculo ha persistido (Tiwari et al., 2010), mientras que en Brasil un componente de la efectividad ha sido la eliminación continua de árboles infectados y la erradicación total de parcelas abandonadas y de huéspedes alternativos (Belasque et al., 2010). Las nuevas estrategias para manejar el HLB incluyen la utilización de sustancias frente a la bacteria que sean amistosas con el medio ambiente, de compuestos que estimulen el crecimiento de las plantas y/o promuevan las defensas del hospedador, la termoterapia y la puesta a punto de estrategias para desarrollar resistencia en la planta frente a estas bacterias. Además, también es muy importante el estudio de la microbiota asociada al cítrico y sus implicaciones para la salud del árbol.

El incremento en la nutrición y la irrigación es una práctica cada vez más generalizada entre algunos agricultores de Florida (Fletcher et al., 2018), que afirman que de este modo los síntomas son menos pronunciados y se mejora el rendimiento, tanto en cuanto a producción como a calidad de la fruta. Si bien es cierto que los árboles sometidos a cualquier tipo de estrés son más susceptibles a infecciones, los resultados de la investigación científica a este respecto en el caso del HLB no son concluyentes, tal vez porque los efectos de una nutrición óptima y una buena irrigación son solo aparentes después de 2-3 años, y algunos de los estudios realizados son en plazos más cortos (Gottwald et al., 2012; Stansly et al., 2014; Kadyampakeni et al., 2015; Morgan et al., 2016; Hamido et al., 2017; Plotto et al., 2017; Rouse et al., 2017; Tansey et al., 2017). En cualquier caso, la tendencia ahora en árboles infectados por HLB es llevar a cabo este tipo de acciones para promover un buen estado de salud y una buena producción de fruta (Roka et al., 2009; Zansler, 2017), con el objetivo de convivir con la enfermedad en lugar de eliminarla. Otra aproximación es reducir el período hasta la producción de fruta y maximizar el rendimiento con cultivo altamente intensivo (Roka et al., 2009), a fin de que la tasa de recambio de árboles sea mayor conforme los síntomas de HLB se vayan haciendo más severos. Y otra estrategia es la aplicación de mezclas de fertilizantes foliares, en un intento de compensar la pérdida de nutrientes por el bloqueo del floema en los árboles infectados. Es interesante tener en cuenta que se ha calculado que todas estas nuevas medidas han incrementado los costes de producción en un 40% (Irey et al., 2008).

### ***Tratamientos químicos***

Los compuestos antimicrobianos han desempeñado un papel muy importante en la agricultura, principalmente en Estados Unidos, para el control de diversas bacterias fitopatógenas, como *Erwinia amylovora* (Stockwell y Duffy,

2012). En 2016, se aprobó el uso de sulfato de estreptomina, hidrocloreto de oxitetraciclina y complejo cálcico de oxitetraciclina en aplicación foliar para el tratamiento del HLB en Florida; sin embargo, el potencial benéfico de estos compuestos no está claro (Wang et al., 2017). Mientras que la utilización de antimicrobianos de espectro reducido puede ser interesante como una herramienta más para el manejo de la enfermedad con soluciones proactivas (Blaustein et al., 2018), la utilización de antibióticos relacionados con el ámbito humano y veterinario se debe evaluar muy cuidadosamente (Chang et al., 2015; Franklin et al., 2016). Sin embargo, aunque en los años 70, tanto en Asia como en África, se obtuvo escaso éxito con la inyección en tronco de compuestos basados en tetraciclina (Zhang et al., 2013), el drástico impacto del HLB en la producción de cítricos en los últimos 15 años ha hecho que el desarrollo de estrategias basadas en antimicrobianos haya cobrado interés nuevamente.

Hay estudios recientes, tanto en invernadero como en campo, sobre las fluctuaciones en las poblaciones de 'Candidatus Liberibacter' spp. en hojas de árboles tratados con antibióticos de amplio espectro mediante pulverización foliar, inmersión de raíces y/o inyección en tronco (Hu y Wang, 2016; Shin et al., 2016; Yang et al., 2016; Zhang et al., 2011, 2013). Son ensayos de gran duración, habitualmente de más de un año, ya que se necesitan tiempos largos para diferenciar los efectos de los antibióticos de la estacionalidad natural de las poblaciones patógenas de 'Candidatus Liberibacter' spp., puesto que se sabe que estas bacterias tienen la capacidad de moverse por todo el árbol, de las raíces a las hojas y de las hojas a las raíces, en distintos momentos a lo largo del año (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2013). Los ensayos con penicilina inyectada en tronco han mostrado cierta efectividad y pocos efectos colaterales en la población bacteriana autóctona (Shin et al., 2016), aunque parece haber algunas limitaciones en el transporte del antimicrobiano por todo el sistema vascular del cítrico. No obstante, en ausencia de ensayos a largo plazo, la posibilidad de aparición de resistencias a este  $\beta$ -lactámico limita su aplicación comercial a escala de campo. En cuanto a los ensayos con hidrocloreto de oxitetraciclina, también mediante inyección en tronco (Hu y Wang, 2016), revelan que es un compuesto efectivo en la reducción de las poblaciones de CaLas, pero todavía tiene que determinarse la dosis óptima para reducir su fitotoxicidad y, además, la duración del efecto no está clara, ya que se ha observado un recrecimiento de las bacterias acantonadas en ciertos reservorios como las raíces (Blaustein et al., 2018), debido al movimiento estacional de la bacteria por diferentes partes de la planta. Se ha comprobado también que el efecto sinérgico de dos o más antibióticos, mediante una terapia combinada, puede prolongar su actividad antimicrobiana frente a CaLas (Zhang et al., 2011), aunque los estudios de campo en este sentido han mostrado un aumento en las poblaciones de la bacteria entre primavera y otoño que podría deberse a su recrecimiento o a reintroducción de inóculo a través del insecto vector (Zhang et al., 2011). Y, además, estos tratamientos



inducen un cambio en la estructura poblacional de la microbiota nativa de las hojas (Zhang et al., 2013). En definitiva, a pesar de los avances prometedores en el uso de antibióticos de amplio espectro para controlar 'Ca. Liberibacter' spp., hay todavía muchos desafíos, que incluyen la estacionalidad de las poblaciones de la bacteria (lo que implica oscilaciones de las mismas, de modo que la bacteria parece restablecerse con el tiempo), su mínima inactivación en los brotes más maduros, la fitotoxicidad del antimicrobiano y el impacto adverso del mismo sobre la abundancia y la diversidad de la microbiota nativa (Blaustein et al., 2018). Por tanto, la optimización de los tratamientos en campo con este tipo de antibióticos requiere más investigación.

Es posible que moléculas más pequeñas que los antibióticos de amplio espectro controlen el HLB de modo más efectivo y minimicen el impacto ecológico adverso relacionado con la fitotoxicidad y la disrupción de la microbiota nativa. Sin embargo, el desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos que tengan como diana específicamente a 'Ca. Liberibacter' spp. es un reto debido a las dificultades asociadas con la identificación de las dianas moleculares, ya que, como se ha comentado anteriormente, estas bacterias no pueden ser cultivadas en el laboratorio. Aún así, se han buscado compuestos con actividad frente a 'Ca. Liberibacter' spp., basándose en la información que proporcionan los genomas (Duan et al., 2009), y también utilizando organismos filogenéticamente emparentados, que sí son cultivables, como organismos modelo (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti*) (Akula et al., 2012; Gardner et al., 2016; Pagliai et al., 2014).

Otra aproximación alternativa a los antibióticos es la termoterapia, que consiste en someter plántulas a temperaturas de entre 42 y 45 °C durante un determinado tiempo (Fan et al., 2016; Yang et al., 2016). Aunque este método es laborioso y económicamente costoso en campo, se han hecho muchos esfuerzos en equipamiento comercial para hacerlo más factible a gran escala (Trotochaud y Ehsani, 2016). Sin embargo, mientras que en plantas pequeñas en invernadero se ha demostrado que la termoterapia reduce las poblaciones de CaLas (Fan et al., 2016), en árboles maduros en condiciones de campo los resultados son mixtos (Yang et al., 2016; Doud et al., 2017).

La aplicación de compuestos que favorecen el crecimiento de la planta y estimulan sus defensas, como algunos esteroides (Canales et al., 2016), ácido ascórbico (Li et al., 2016) o L-arginina (Martinelli et al., 2016), es otro de los tratamientos que se han ensayado frente al HLB. Si bien este tipo de compuestos parecen contribuir a disminuir la progresión de los síntomas de HLB por su efecto positivo en las defensas del cítrico y en su crecimiento, no tienen un fuerte impacto deletéreo sobre 'Ca. Liberibacter' spp. (Blaustein et al., 2018). En la misma línea, se ha demostrado que la adición de micronutrientes puede favorecer el crecimiento de árboles asintomáticos en los primeros estadios de la infección por HLB, pero no tienen un efecto significativo en árboles enfermos que están en etapas avanzadas (Wang et al., 2017) porque

no reduce las poblaciones de la bacteria (Blaustein et al., 2018). Otras posibles herramientas, como el uso de nanopartículas de zinc (Young et al., 2017) requiere más investigación.

### ***Microbiota de los cítricos***

La microbiota de la planta desempeña un papel crítico en su desarrollo porque contribuye al control de las enfermedades y la tolerancia al estrés, entre otras funciones. De hecho, aprovechar el potencial beneficioso de la microbiota nativa puede ser una solución económica y logísticamente factible para controlar bacterias complicadas como 'Ca. Liberibacter' spp. (Blaustein et al., 2018). Hay varios estudios centrados en los cambios en abundancia y diversidad de las comunidades microbianas asociadas a los cítricos durante el desarrollo del HLB (Blaustein et al., 2017; Zhang et al., 2017). En este sentido, comparando árboles sanos con árboles enfermos se ha podido identificar microbiota asociada a los cítricos sanos que puede tener varias funciones: competir con 'Ca. Liberibacter' spp. por los nutrientes, limitando así su capacidad de crecer y dispersarse; producir compuestos con actividad antagonista frente a 'Ca. Liberibacter' spp. y otras bacterias asociadas con enfermedad; favorecer la adquisición de nutrientes por parte de la planta, lo cual puede aliviar las deficiencias de nutrientes relacionadas con los síntomas de HLB; e inducir rutas de señalización de la planta que estimulan respuestas de defensa (Blaustein et al., 2017). Puede haber también otras causas más generales que den lugar a determinadas asociaciones entre microbiota y cítrico sano, como la proliferación de ciertos taxones en plantas más sanas, la respuesta de las comunidades microbianas a la supresión de las defensas de la planta por la presencia de 'Ca. Liberibacter' spp. (Wang et al., 2017) o cambios en los niveles hormonales de la planta durante la alimentación del vector (Casteel et al., 2012). De hecho, las asociaciones de microorganismos con los cítricos varían en función de factores diversos como la localización geográfica, el cultivar, la estación, la hora del día y también la severidad de los síntomas de HLB (Blaustein et al., 2017). La abundancia relativa de 'Ca. Liberibacter' spp. entre la microbiota (epífita y endófito) de las hojas se correlaciona positivamente con la progresión de síntomas de HLB y negativamente con la diversidad de esta microbiota (Blaustein et al., 2017). Se han encontrado relaciones mutuamente excluyentes entre 'Ca. Liberibacter' spp. y miembros de las familias Burholderiaceae, Micromonosporaceae y Xanthomonadaceae (Blaustein et al., 2017). Los géneros Bradyrhizobium y Burkholderia son dominantes entre rizosfera y rizoplano de cítricos y se ven severamente afectados por HLB, por lo que pueden estar implicados en interacciones beneficiosas con el árbol (Zhang et al., 2017). Se ha demostrado que la inoculación de plántulas de cítrico con cepas de Burkholderia aisladas de la microbiota de la raíz de cítricos sanos desencadena la expresión de genes de la planta implicados en resistencia sistémica adquirida y limita la infección por 'Ca. Liberibacter' spp. (Zhang et al., 2017). En definitiva, una línea de investigación de futuro es caracterizar las interac-

ciones entre la microbiota autóctona, 'Ca. Liberibacter' spp. y la planta, con el fin de desarrollar nuevas estrategias para modificar hasta cierto punto las comunidades microbianas asociadas a la planta y mitigar así el HLB. Puesto que la diversidad de la microbiota autóctona puede ser muy importante para combatir el HLB y favorecer la salud de los cítricos, su abundancia y diversidad se puede potenciar, además, con el uso de aditivos orgánicos (Joa et al., 2014).

Los virus bacteriófagos son también parte de la microbiota autóctona, y las terapias con fagos específicos tienen que ser investigadas, aunque es fundamental optimizar el método de administración en la planta.

### ***Desarrollo de cítricos resistentes al HLB***

No se ha encontrado evidencia de la presencia de genes de resistencia al HLB en ninguna variedad de cítricos. Sin embargo, hay una diferencia sustancial en la tolerancia a la enfermedad de distintas variedades y patrones. Las variedades de cítricos tolerantes al HLB tienen una carga de 'Ca. Liberibacter' spp. mucho más reducida que las variedades susceptibles (Albrecht y Bowman, 2012b) y muestran síntomas menos severos (Fan et al., 2012). Pero se requieren muchas generaciones de selección para desarrollar nuevos cultivares de cítricos con cualidades específicas. El largo período de juventud de los cítricos cultivados a partir de semillas y la necesidad de grandes extensiones de tierra para cultivar y evaluar árboles se suman a los desafíos de la mejora convencional.

Se han hecho ensayos para generar cítricos transgénicos que sobreexpresan determinados genes implicados en la resistencia sistémica adquirida o en la producción de compuestos con actividad antimicrobiana (Dutt et al., 2015; Hao et al., 2016), pero en Europa no podrán comercializarse. Hay líneas de investigación sobre la utilización de una versión manipulada del virus de la tristeza para atacar a 'Ca. Liberibacter' spp. (Ledford, 2017), o la tecnología CRISPR-Cas9 para producir cultivares menos susceptibles a estas bacterias o que expresen genes que prevengan la transmisión por el vector (Ledford, 2017; Wang et al., 2017). Pero para obtener resultados en este sentido aún falta mucho tiempo y, además, hay que esperar a que se establezca una legislación al respecto (Ledford, 2017).

### **RETOS PARA EL CONTROL DEL HLB**

El HLB está entre las enfermedades de plantas más complicadas, así que su manejo está también entre los más arduos. Son diversos los factores que hacen que el control del HLB siga siendo un desafío. Las bacterias de 'Ca. Liberibacter' spp. siguen sin poder ser cultivadas, hecho que obstaculiza la investigación en las interacciones bacteria-hospedador y vector-hospedador. La transmisión por insecto vector añade otro elemento de complejidad biológica,

y los factores relacionados con el psílido (comportamiento de vuelo, alimentación, apareamiento, atracción por los colores de la planta y los compuestos volátiles) tienen gran influencia en la epidemiología de la enfermedad. Además, el cítrico es un cultivo perenne que generalmente se trasplanta en campo como patrones injertados, de manera que los árboles tienen típicamente dos genotipos diferentes. Por tanto, hay numerosas interacciones entre el hospedador, la bacteria patógena y el vector, además de las interacciones de cada uno de estos con los otros miembros del nivel trófico y con el ambiente físico (clima, características del suelo y prácticas agronómicas).

Los lugares en que el HLB se ha convertido en endémico constituyen reservorios de la bacteria y del vector. El control de las poblaciones del vector es, por tanto, crítico para el control de la bacteria en campo, pero hay que disminuir la dependencia de insecticidas. La integración de múltiples estrategias, junto con el control de los vectores, puede ser esencial en la optimización de la eficacia y la sostenibilidad del manejo del HLB (Blaustein et al., 2018). Dentro del árbol, la bacteria está restringida al floema, por el cual se mueve de una forma aparentemente errática y no uniforme por todo el árbol, así que los compuestos que se utilicen con efecto antimicrobiano deben entrar en contacto con 'Ca. Liberibacter' spp. penetrando en el floema y llegando a dispersarse ampliamente por todo el tejido vascular. La inyección en tronco, como alternativa a la pulverización foliar, es muy laboriosa para hacerla en campo e incluso presenta limitaciones para el transporte del producto hasta las raíces (Shin et al., 2016), con el problema añadido de la posible fitotoxicidad de los compuestos a emplear. El período de latencia entre la infección y la aparición de síntomas (Stansly et al., 2014), conforme la bacteria va alcanzando altos números poblacionales (más de 10<sup>6</sup> células por gramo de tejido de hoja) (Coletta-Filho et al., 2014; Hu y Wang, 2016), también hace difícil predecir el momento de inicio de la infección, que parece ser el más apropiado para que los tratamientos sean más efectivos (Martinelli et al., 2016). Cuando el HLB es diagnosticado, las poblaciones de 'Ca. Liberibacter' spp. ya están bien establecidas y superan, al menos parcialmente, los tratamientos antimicrobianos. El uso prolongado de estos tratamientos, para potenciar su efectividad, conlleva problemas de coste, de posibles efectos adversos medioambientales y de aparición de resistencias no solo en la población de las bacterias patógenas sino también en la microbiota autóctona (Blaustein et al., 2018).

## CONCLUSIONES

El impacto del HLB en muchas áreas cítricas del mundo y la amenaza de su aparición en otras han ido en aumento. Sin duda, la prevención es el mejor modo de proteger nuestra citricultura de esta enfermedad, ya que los esfuerzos realizados hasta ahora para su control y el de los vectores no han tenido un gran éxito. No obstante, se está avanzando en la comprensión de las interacciones entre las plantas hospedadoras, las bacterias patógenas asociadas

y los insectos vectores, su biología y sus características a nivel molecular, y todo ello redundará en estrategias de manejo de la enfermedad más efectivas. Los resultados que se van obteniendo, incluso los menos favorables, abren nuevos horizontes para el control del HLB. Por ello, es necesario fomentar la investigación para generar nuevo conocimiento y reducir así, en el menor plazo de tiempo posible, las enormes pérdidas económicas que causa esta enfermedad.

## REFERENCIAS

- Aksenov, A.A., Pasamontes, A., Peirano, D.J., Zhao, W., Dandekar, A.M., Fiehn, O., et al. 2014. Detection of Huanglongbing disease using differential mobility spectrometry. *Anal. Chem.* 86(5): 2481–2488.
- Akula, N., Trivedi, P., Han, F.Q., Wang, N. 2012. Identification of small molecule inhibitors against SecA of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by structure based design. *Eur. J. Med. Chem.* 54: 919-924.
- Albrecht, U., Bowman, K.D. 2012a. Tolerance of trifoliolate citrus rootstock hybrids to *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae* 147(Supplement C):71-80.
- Albrecht, U., Bowman, K.D. 2012b. Transcriptional response of susceptible and tolerant citrus to infection with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Plant Science* 185-186: 118-130.
- Ammar, E.-D., Ramos, J.E., Hall, D.G., Dawson, W.O., Shatters, R.G. Jr. 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): e0159594.
- Appel, D.N. 2004. Huanglongbing of citrus; pathway analysis: intentional introduction of *Candidatus Liberibacter africanus* and *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Special Report by the National Agricultural. Biosecurity Center Consortium for the USDA Animal and Plant Health Inspection Service. 35 pp.
- Arredondo Valdés, R., Delgado Ortiz, J.C., Beltrán Beache, M., Anguiano Cabello, J., Cerna Chávez E., et al. 2016. A review of techniques for detecting Huanglongbing (greening) in citrus. *Can. J. Microbiol.* 62(10): 803–11.
- Ayres, A.J., Belasque, J., Bové, J.M. 2015. The experience with huanglongbing management in Brazil. Pp. 55-61 in XII International Citrus Congress—International Society of Citriculture, B. Sabater-Muñoz, P. Moreno, L. Peña, and L. Navarro, eds. Valencia, Spain: ISHS.
- Belasque, J., Bassanezi, R.B., Yamamoto, P.T., Ayres, A.J., Tachibana, A., Violante, A.R., Tank, A. Jr., Di Giorgi, F., Tersi, F.E.A., Menezes, G.M., Dragone, J., Jank, R.H. Jr., Bové J.M. 2010. Lessons from huanglongbing management in São Paulo State, Brazil. *Journal of Plant Pathology* 92(2): 285-302.

- Bergamin Filho, A., Inoue-Nagata, A.K., Bassanezi, R.B., Belasque, J. Jr., Amorim, L., Macedo, M.A., Barbosa, J.C., Willocquet, L., Savary, S. 2016. The importance of primary inoculum and area-wide disease management to crop health and food security. *Food Security* 8(1): 221-238.
- Blaustein, R.A., Lorca, G.L., Meyer, J.L., Gonzalez, C.F., Teplitski, M. 2017. Defining the core Citrus leaf- and root associated microbiota: factors associated with community structure and implications for managing Huanglongbing (Citrus greening) disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 83: e00210-17.
- Blaustein, R.A., Lorca, G.L., Teplitski, M. 2018. Challenges for managing *Candidatus Liberibacter* spp. (Huanglongbing disease pathogen): current control measures and future directions. *Phytopathol.* 108: 424-435.
- Boava, L.P., Cristofani-Yaly, M., Machado, M.A. 2017. Physiologic, anatomic, and gene expression changes in Citrus sunki, Poncirus trifoliata, and their hybrids after “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection. *Phytopathology* 107(5): 590-599.
- Bové, J.M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88(1): 7–37. doi:10.4454/jpp.v88i1.828.
- Canales, E., Coll, Y., Hernandez, I., Portieles, M., Rodriguez Garcia, Y. et al. 2016. *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causal agent of citrus huanglongbing, is reduced by treatment with brassicosteroids. *PLoS ONE* 11(1): e0146223.
- Capoor, S.P. 1963. Decline of citrus trees in India. *Bulletin, National Institute of Science India* 34(24): 48-64.
- Casteel, C.L., Hansen, A.K., Walling, L.L., Paine, T.D. 2012. Manipulation of plant defense responses by the tomato psyllid *Bactericera cockerelli* and its associated endosymbiont *Candidatus Liberibacter psyllae*. *PLoS One* 7: e35191.
- Chang, Q., Wang, W., Regev-Yochay, G., Lipsitch, M., Hanage, W.P. 2015. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* 8: 240-247.
- Coletta-Filho, H.D., Daugherty, M.P., Ferreira, C., Lopes, J.R.S. 2014. Temporal progression of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection in citrus and acquisition efficiency by *Diaphorina citri*. *Phytopathology* 104(4):416-421.
- Croxtan, S.D., Stansly, P.A. 2014. Metalized polyethylene mulch to repel Asian citrus psyllid, slow spread of huanglongbing and improve growth of new citrus plantings. *Pest Management Science* 70(2): 318-323.
- da Costa Lima, A. 1942. Homopteros. *Insetos do Brazil* Vol. 3. Escola Nacional de Agronomia. Disponible en <http://www.ufrj.br/institutos/ib/ento/tomo03.pdf>. Accessed February 1, 2018.
- do Brasil Cardinali, M.C., Villas Boas, P.R., Milori, D.M.B.P., Ferreira, E.J., Silva, M.F., Machado, M.A., et al. 2012. Infrared spectroscopy: a potential tool in huanglongbing and citrus variegated chlorosis diagnosis. *Talanta* 91: 1–6.

- Doud, M.M., Wang, Y., Hoffman, M.T., Latza, C.L., Luo, W., Armstrong, C.M., Gottwald, T.R., Dai, L., Luo, F., Duan Y. 2017. Solar thermotherapy reduces the titer of *Candidatus Liberibacter asiaticus* and enhances canopy growth by altering gene expression profiles in HLB-affected citrus plants. *Horticulture Research* 4: 17054.
- Duan, Y.P., Zhou, L.J., Hall, D., Li, W.B., Doddapaneni, H., Lin, H., Liu, L., Vahling, C.M., Gabriel, D.W., Williams, K.P., Dickerman, A., Sun, Y., Gottwald, T. 2009. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(8): 1011-1020.
- Dutt, M., Barthe, G., Irey, M., Grosser, J. 2015. Transgenic citrus expressing an Arabidopsis NPR1 gene exhibit enhanced resistance against huanglongbing (HLB; citrus greening). *PLoS ONE* 10(9): e0137134.
- Fagen, J.R., Leonard, M.T., McCullough, C.M., Edirisinghe, J.N., Henry, C.S., Davis, M.J., Triplett, E.W. 2014. Comparative genomics of cultured and uncultured strains suggests genes essential for free-living growth of *Liberibacter*. *PLoS ONE* 9(1): e84469.
- Fan, J., Chen, C., Yu, Q., Khalaf, A., Achor, D.S., Brlansky, R.H., Moore, G.A., Li, Z.G., Gmitter, F.G. 2012. Comparative transcriptional and anatomical analyses of tolerant rough lemon and susceptible sweet orange in response to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(11): 1396-1407.
- Fan, G.C., Xia, Y.I., Lin, X., Hu, H., Wang, X., Ruan, C., Lu, L., Liu, B. 2016. Evaluation of thermotherapy against huanglongbing (citrus greening) in the greenhouse. *Journal of Integrative Agriculture* 15(1): 111-119.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2017a. Citrus fruit. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/>.
- FAO. 2017b. Citrus fruit: Fresh and processed. Statistical Bulletin 2016. <http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf>.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). 2009. Food and agricultural commodities production: countries by commodity: Oranges, 2009. <http://faostat.fao.org/SITE/339/default.aspx>.
- Fletcher, J., Berenbaum, M.R., Gray, S.M., Groves, R.L., Scorza, R., Triplett, L.R., Trumble, J., Yang, B., Ables, C.Y., Briscoe, J. (Committee of National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine). 2018. A review of the citrus greening research and development efforts supported by the Citrus Research and Development Foundation: Fighting a Ravaging Disease.
- Folimonova, S.Y., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Gowda, S., Dawson, W.O. 2009. Examination of the responses of different genotypes of citrus to huanglongbing (citrus greening) under different conditions. *Phytopathology* 99: 1346-1354.

- Franklin, A.M., Aga, D.S., Cytryn, E., Durso, L.M., McLain, J.E., Pruden, A., Roberts, M.C., Rothrock, M.J. Jr., Snow, D. W., Watson, J.E., Dungan, R.S. 2016. Antibiotics in agroecosystems: introduction to the special section. *J. Environ. Qual.* 45: 377-393.
- Futch, S., Weingarten, S., Irely, M. 2009. Determining HLB infection levels using multiple survey methods in Florida citrus. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society 2009*. Vol. 122. Florida State Horticultural Society, Florida. pp. 152–157.
- Garcia-Ruiz, F., Sankaran, S., Maja, J.M., Lee, W.S., Rasmussen, J., Ehsani, R. 2013. Comparison of two aerial imaging platforms for identification of Huanglongbing-infected citrus trees. *Comput. Electron. Agric.* 91: 106–115.
- Gardner, C.L., Pagliari, F.A., Pan, L., Bojilova, L., Torino, M.I., Lorca, G.L., Gonzalez, C.F.: 2016. Drug repurposing: tolfenamic acid inactivates PrbP, a transcriptional accessory protein in *Liberibacter asiaticus*. *Front. Microbiol.* 7: 1630.
- Gottwald, T.R. 2010. Current epidemiological understanding of citrus huanglongbing. *Annual Review of Phytopathology* 48:119-139.
- Gottwald, T.R., Graham, J.H., Irely, M.S., McCollum, T.G., Wood, B.W. 2012. Inconsequential effect of nutritional treatments on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection* 36: 73-82.
- Grafton-Cardwell, E.E., Stelinski, L.L., Stansly, P.A. 2013. Biology and management of Asian citrus psyllid, vector of the huanglongbing pathogens. *Annual Review of Entomology* 58: 413-432.
- Halbert, S.E., 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.
- Hamido, S.A., Morgan, K.T., Ebel, R.C., Kadyampakeni, D.M. 2017. Improved irrigation management of sweet orange with huanglongbing. *HortScience* 52(6): 916-921.
- Hao, G., Stover, E., Gupta, G. 2016. Overexpression of a modified plant thionin enhances disease resistance to citrus canker and huanglongbing (HLB). *Front. Plant Sci.* 7: 1078.
- Hodges, A.W., Rahmani, M., Stevens, T.J., Spreen, T.H. 2014. Economic impacts of the Florida citrus industry in 2012-2013. Final sponsored project to the Florida Department of Citrus. Food and Resource Economics Department, Gainesville, FL. Disponible en [http://www.fred.ifas.ufl.edu/pdf/economic-impact-analysis/Economic\\_Impacts\\_Florida\\_Citrus\\_Industry\\_2012-13.pdf](http://www.fred.ifas.ufl.edu/pdf/economic-impact-analysis/Economic_Impacts_Florida_Citrus_Industry_2012-13.pdf). Accessed June 12, 2017.
- Hodges, A.W., Spreen, T.H. 2012. Economic impacts of citrus greening (HLB) in Florida, 2006/07–2010/11. EDIS Document FE903, a publication of the Food and Resource Economics Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville.



- Hu, J., Wang, N. 2016. Evaluation of the spatiotemporal dynamics of oxytetracycline and its control effect against citrus huanglongbing via trunk injection. *Phytopathology* 106(12): 1495-1503.
- Hu, Y., Zhong, X., Liu, X., Lou, B., Zhou, C., Wang X. 2017. Comparative transcriptome analysis unveils the tolerance mechanisms of *Citrus hystrix* in response to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection. *PLoS ONE* 12(12): e0189229.
- 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.
- Irey, M., Gottwald, T.R., Stewart, M., Chamberlain, H. 2008. Is it possible to replant young groves in an area with endemic HLB: A hierarchical sampling approach to determine infection? *Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing*, pp. 116-117.
- Jain, M., Fleites, L.A., Gabriel, D.W. 2015. Prophage-encoded peroxidase in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” is a secreted effector that suppresses plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(12): 1330-1337.
- Joa, J.H., Weon, H.Y., Hyun, H.N., Jeun, Y.C., Koh, S.W. 2014. Effect of long-term different fertilization on bacterial community structures and diversity in citrus orchard soil of volcanic ash. *J. Microbiol* 52: 995-1001.
- Kadyampakeni, D.M., Morgan, K.T., Nkedi-Kizza, P., Kasozi, G.N. 2015. Nutrient management options for Florida citrus: A review of NPK application and analytical methods. *Journal of Plant Nutrition* 38(4): 568-583.
- Killiny, N., Hijaz, F. 2016. Amino acids implicated in plant defense are higher in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-tolerant citrus varieties. *Plant Signaling & Behavior* 11(4):e1171449.
- Killiny, N., Nehela, Y. 2017. Metabolomic response to huanglongbing: Role of carboxylic compounds in *Citrus sinensis* response to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and its vector, *Diaphorina citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30(8): 666-678.
- Kim, J.S., Sagaram, U.S., Burns, J.K., Li, J.L., Wang, N. 2009. Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infection: Microscopy and microarray analyses. *Phytopathology* 99(1): 50-57.
- Koh, E.J., Zhou, L., Williams, D.S., Park, J., Ding, N., Duan, Y.P., Kang, B.H. 2012. Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*.” *Protoplasma* 249(3): 687-697.

- Kunta, M., da Graça, J.V., Malik, N.S.A., Louzada, E.S., Sétamou, M. 2014. Quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the aerial parts of the huanglongbing-infected citrus trees in Texas. *HortScience* 49(1): 65-68.
- Ledford, H. 2017. Engineered virus in line to battle citrus disease. *Nature* 545: 277-278.
- Li, W., Hartung, J.S., Levy, L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *J. Microbiol. Methods*, 66(1): 104–115.
- Li, J., Pang, Z., Trivedi, P., Zhou, X., Ying, X., Jia, H., Wang, N. 2017. “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” encodes a functional salicylic acid (SA) hydroxylase that degrades SA to suppress plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30(8): 620-630.
- Li, J., Trivedi, P., Wang, N. 2016. Field evaluation of plant defense inducers for the control of citrus huanglongbing. *Phytopathology* 106(1): 37-46.
- Lin, H., Chen, C., Doddapaneni, H., Duan, Y., Civerolo, E.L., Bai, X., Zhao, X. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. *J. Microbiol. Methods* 81:17–25.
- Liu, Y., Heying, E., Tanamihardjo, S.A. 2012. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 11: 530-545.
- Lopes, S.A., Martins, E.C., Frare, G.F. 2005. Detection of *Candidatus Liberibacter americanus* in *Murraya paniculata* [in Portuguese]. *Summa Phytopathologica* 31: 48-49.
- Louzada, E.S., Vazquez, O.E., Braswell, W.E., Yanev, G., Devanaboina, M., Kunta, M. 2016. Distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” above and below ground in Texas citrus. *Phytopathology* 106(7): 702-709.
- Mann, R.S., Pelz-Stelinski, K., Hermann, S.L., Tiwari, S., Stelinski, L.L. 2011. Sexual transmission of a plant pathogenic bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between conspecific insect vectors during mating. *PLoS ONE* 6(12): e29197.
- Martinelli, F., Dandekar, A.M. 2017. Genetic mechanisms of the devious intruder *Candidatus Liberibacter* in Citrus. *Front. Plant Sci.* 8:904. doi: 10.3389/fpls.2017.00904.
- Martinelli, F., Dolan, D., Fileccia, V., Reagan, R.L., Phu, M., Spann, T.M., McCollum, T.G., Dandekar, A.M. 2016. Molecular responses to small regulating molecules against huanglongbing disease. *PLoS One* 11: e0159610.
- Martinelli, F., Reagan, R.L., Uratsu, S.L., Phu, M.L., Albrecht, U., Zhao, W., Davis, C.E., Bowman, K.D., Dandekar, A.M. 2013. Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. *PLoS ONE* 8(9): e74256.
- Mishra, A., Karimi, D., Ehsani, R., Albrigo, L.G. 2011. Evaluation of an active optical sensor for detection of Huanglongbing (HLB) disease. *Biosyst. Eng.* 110: 302–309.

- Monzo, C., Stansly, P.A. 2017. Economic injury leveles for Asian citrus psyllid control in process oranges from mature trees with high incidence of huanglongbing. *PLoS One* 12: e0175333.
- Morgan, K.T., Rouse, R.E., Ebel, R.C. 2016. Foliar applications of essential nutrients on growth and yield of “Valencia” sweet orange infected with huanglongbing. *HortScience* 51(12): 1482-1493.
- Nwugo, C.C., Duan, Y., Lin, H. 2013. Study on citrus response to huanglongbing highlights a down-regulation of defense-related proteins in lemon plants upon ‘Ca. Liberibacter asiaticus’ infection. *PLoS ONE* 8(6):e67442.
- Pagliai, F.A., Gardner, C.L., Bojilova, L., Sarnegrim, A., Tamayo, C., Potts, A.H., Teplitski, M., Folimonova, S.Y., Gonzalez, C.F., Lorca, G.L. 2014. The transcriptional activator LdtR from “Candidatus Liberibacter asiaticus” mediates osmotic stress tolerance. *PLoS Pathogens* 10(4): e1004101.
- Pereira, F.M.V., Milori, D.M.B.P., Pereira-Filho, E.R., Venâncio, A.L., Russo, M.d.S.T., Cardinali, M.C.d.B., et al. 2011. Laser-induced fluorescence imaging method to monitor citrus greening disease. *Comput. Electron. Agric.* 79: 90–93.
- Plotto, A., Baldwin, E., Bai, J., Manthey, J., Raithore, S., Deterre, S., Zhao, W. 2017. Effect of vector control and foliar nutrition on the quality of orange juice affected by huanglongbing: Sensory evaluation. *HortScience* 52(8): 1092-1099.
- Pourreza, A., Lee, W.S., Raveh, E., Ehsani, R., Etxeberria, E. 2014. Citrus Huanglongbing detection using narrow-band imaging and polarized illumination. *Trans. ASABE*, 57(1): 259–272. ISSN 2151-0032.
- Pourreza, A., Lee, W.S., Ehsani, R., Schueller, J.K., Raveh, E. 2015. An optimum method for real-time in-field detection of Huanglongbing disease using a vision sensor. *Comput. Electron. Agric.* 110: 221–232.
- Purcell, D.E., O’Shea, M.G., Johnson, R.A., Kokot, S. 2009. Near-infrared spectroscopy for the prediction of disease ratings for Fiji leaf gall in sugarcane clones. *Appl. Spectrosc.* 63(4): 450–457.
- Qureshi, J.A., Stansly, P.A. 2009. Exclusion techniques reveal significant biotic mortality suffered by Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) populations in Florida citrus. *Biol. Control*, 50: 129–136. doi:10.1016/j.biocontrol.2009.04.001.
- Rawat, N., Kiran, S.P., Du, D., Gmitter, F.G., Deng, Z. 2015. Comprehensive metaanalysis, co-expression, and miRNA nested network analysis identifies gene candidates in citrus against huanglongbing disease. *BMC Plant Biology* 15: 184.
- Rawat, N., Kumar, B., Albrecht, U., Du, D., Huang, M., Yu, Q., Zhang, Y., Duan, Y. P., Bowman, K.D., Gmitter, F.G., Deng Z. 2017. Genome resequencing and transcriptome profiling reveal structural diversity and expression patterns of constitutive disease resistance genes in huanglongbing-tolerant *Poncirus trifoliata* and its hybrids. *Horticultural Research* 4: 17064.

- Roka, F., Muraro, R., Morris, R.A., Spyke, P., Morgan, K., Schumann, A., Castle, W., Stover E. 2009. Citrus production systems to survive greening: Economic thresholds. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society* 122: 122-126.
- Rouse, R.E., Ozores-Hampton, M., Roka, F.M., Roberts, P. 2017. Rehabilitation of huanglongbing-affected citrus trees using severe pruning and enhanced foliar nutritional treatments. *HortScience* 52(7): 972-978.
- Shin, K., Ascunce, M.S., Narouei-Khandan, H.A., Sun, X., Jones, D., Kolawole, O.O., Goss, E.M., van Bruggen, A.H.C. 2016. Effects and side effects of penicillin injection in huanglongbing affected grapefruit trees. *Crop Prot.* 90: 106-116.
- Singerman, A., Lence, S.H., Useche, P. 2017. Is area-wide pest management useful? The case of citrus greening. *Applied Economic Perspectives and Policy* 39(4): 609-634.
- Stansly, P.A., Arevalo, H.A., Qureshi, J.A., Jones, M.M., Hendricks, K., Roberts, P.D., Roka, F.M. 2014. Vector control and foliar nutrition to maintain economic sustainability of bearing citrus in Florida groves affected by huanglongbing. *Pest Management Science* 70(3): 415-426.
- Stockwell, V.O., Duffy, B. 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 31: 199-210.
- Tansey, J.A., Vanaclocha, P., Monzo, C., Jones, M., Stansly, P.A. 2017. Costs and benefits of insecticide and foliar nutrient applications to huanglongbing-infected citrus trees. *Pest Management Science* 73(5): 904-916.
- Timmer, L.M., Garnsey, S.M., Graham, J.H. 2000. *Compendium of Citrus Diseases*, 2nd Ed. St. Paul, MN: APS Press.
- Tiwari, S., Lewis-Rosenblum, H., Pelz-Stelinski, K., Stelinski, L.L. 2010. Incidence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection in abandoned citrus occurring in proximity to commercially managed groves. *Journal of Economic Entomology* 103(6): 1972-1978.
- Trotochaus, J., Ehsani, R. 2016. Commercial-scale thermotherapy for combating citrus greening (huanglongbing). 2016 ASABE Intl. Meeting.
- Wang, Y., Zhou, L., Yu, X., Stover, E., Luo, F., Duan, Y. 2016. Transcriptome profiling of huanglongbing (HLB) tolerant and susceptible citrus plants reveals the role of basal resistance in HLB tolerance. *Frontiers in Plant Science* 7: 933.
- Wang, N., Pierson, E.A., Setubal, J.C., Xu, J., Levy, J.G., Zhang, Y., Li, J., Rangel, L.T., Martins, J. Jr. 2017. The *Candidatus Liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 55: 20.1-20.32.
- Yang, C., Powell, C.A., Duan, Y., Shatters, R.G., Lin, Y., Zhang, M. 2016. Mitigating citrus huanglongbing via effective application of antimicrobial compounds and thermotherapy. *Crop Prot.* 84: 150-158.

- Young, M., Ozcan, A., Myers, M.E., Johnson, E.G., Graham, J.H., Santra, S. 2017. Multimodal generally recognized as safe ZnO/nanocopper composite: a novel antimicrobial material for the management of citrus phytopathogens. *J. Agric. Food Chem.* Doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02526.
- Yu, Q., Chen, C., Du, D., Huang, M., Yao, J., Yu, F., Brlansky, R.H., Gmitter, F.G. 2017. Reprogramming of a defense signaling pathway in rough lemon and sweet orange is a critical element of the early response to “*Candidatus Liberibacter asiaticus*.” *Horticultural Research* 4: 17063.
- Zansler, M. 2017. Economic impact of HLB on the Florida citrus industry. Presentation at The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine Webinar on Economic/Sociological Impacts of HLB/HLB Management Strategies, October 18, 2017.
- Zhang, M., Powell, C.A., Guo, Y., Benyon, L., Duan, Y. 2013. Characterization of the microbial community structure in *Candidatus Liberibacter asiaticus*-infected citrus plants treated with antibiotics in the field. *BMC Microbiol.* 13: 112.
- Zhang, M., Powell, C.A., Zhou, L., He, Z.L., Stover, E., Duan, Y. 2011. Chemical compounds effective against the citrus huanglongbing bacterium “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in planta. *Phytopathology* 101(9): 1097-1103.
- Zhang, Y., Xu, J., Riera, N., Jin, T., Li, J., Wang, N. 2017. Huanglongbing impairs the rhizosphere-to-rhizoplane enrichment process of the citrus root-associated microbiome. *Microbiome* 5(1): 97.
- Zheng, Z., Deng, X., Chen, J. 2014. Draft genome sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from California. *Genome Announcements* 2(5): e00999-14.

