

The *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* is present in *Citrus* spp in Hidalgo state, Mexico

El *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* está presente en *Citrus* spp en Hidalgo, México

Verónica Inés Martínez-Bustamante, Posgrado en Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230 Texcoco, Estado de México; **Camilo Hernández-Juárez**, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, CP. 56230. México; **Yuridia Hernández Vázquez**; **José Abel López-Buenfil**, **Edith Blanco-Rodríguez**, SENASICA-SAGARPA. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Carretera Federal México-Pachuca Km 37.5, Tecámac, 55740, Estado de México; **Edi Arroyo-Cruz**. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Hidalgo Avenida 2, Manzana F, Lote 11, No. 800, Parque de Poblamiento, 42032 Pachuca de Soto, Hidalgo **Gustavo Mora-Aguilera***. *Autor para correspondencia: morag@colpos.mx.

Recibido: 04 de Octubre, 2018.

Aceptado: 27 de Diciembre, 2018.

Martínez-Bustamante VI, Hernández-Juárez C, Hernández Vázquez Y, López-Buenfil JA, Blanco-Rodríguez E, Arroyo-Cruz E and Mora-Aguilera G. 2018. The *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* is present in *Citrus* spp in Hidalgo state, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1812-3

Primera publicación DOI: 28 de Diciembre, 2018.

First DOI publication: December 28, 2018.

Resumen. Este trabajo tuvo la finalidad de investigar la presencia de fitoplasmas asociados a síntomas similares al HLB, enfermedad causada por CLas, con el propósito de optimizar los procesos de muestreo y diagnóstico en el marco de acciones fitosanitarias oficiales en la citricultura Mexicana. A partir de alertas de resultados negativos a CLas en árboles de *Citrus* spp con síntomas putativos de

Abstract. This work had the purpose of detecting the presence of phytoplasmas associated to HLB-like symptoms, a disease caused by CLas, to improve the sampling and detection carryout in official phytosanitary actions in the Mexican citriculture. Base on alerts of negative results to CLas in citrus trees with putative symptoms of HLB, directed samplings were conducted in commercial orchards and country backyards in Hidalgo, Colima, Puebla and Veracruz in 2012, 2013 and 2018. The total DNA was analyzed by PCR with the primers P1 / P7 nested with R16F2 / R16R2 and D7f2 / D7r2. CLas infection was assessed with A2 / J5 primers. The presence of the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, member of the 16Sr IX group, associated with *C. latifolia* (NCBI, MK282760) and *C. aurantifolia* (NCBI, MK282761) was confirmed inducing similar but contrasting symptoms to those caused by CLas. These hosts are reported for the first time

HLB se realizaron muestreos dirigidos en huertos comerciales y traspatios en Hidalgo, Colima, Puebla y Veracruz en 2012, 2013 y 2018. El ADN total se analizó por PCR con los iniciadores P1/P7 anidados con R16F2/R16R2 y D7f2/D7r2. La infección de CLas se determinó con los iniciadores A2/J5. Se confirmó en México la presencia del *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, miembro del grupo 16Sr IX, asociado a *C. latifolia* (NCBI, MK282760) y *C. aurantifolia* (NCBI, MK282761) induciendo síntomas similares pero contrastantes a los causados por CLas. Estos hospederos se reportan por primera vez en adición al original reporte en *C. sinensis* en Brasil. También se reporta a *Bidens odorata* y *Cajanus cajan* como probables hospederos arvenses alternos y la presencia de especímenes de *Graphocephala* y *Acinopterus* (Cicadellidae), géneros reconocidos con especies vectoras de fitoplasmas de los grupos 16Sr III-A y *Aster Yellow*, respectivamente.

Palabras clave: PCR-anidado, Mollicutes, HLB, vector

Ante el inminente ingreso a territorio mexicano de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), SENASICA desarrolló en 2008 un Plan de Emergencia el cual derivó en una Campaña Contra el HLB de los Cítricos sustentado en la detección en planta y vector del agente bacteriano CLas (SIRVEF, 2018; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Sin embargo, la confiabilidad del diagnóstico molecular debe incluir a CLas y otros organismos capaces de inducir síntomas similares al HLB, consistentes en moteados cloróticos y asimétricos, leve aclaramiento de nervaduras y amarillamiento foliar (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). En Brasil y China en 2008 y 2009, y recientemente en 2018, se reportaron fitoplasmas pertenecientes a los grupos

in addition to the original report on *C. sinensis* in Brazil. *Bidens odorata* and *Cajanus cajan* are also reported as probable alternate weed hosts as well as the presence of specimens of *Graphocephala* and *Acinopterus* (Cicadellidae), genera recognized with vector species of 16Sr III-A and *Aster Yellow* phytoplasma groups, respectively.

Key words: Nested-PCR, Mollicutes, HLB, vector

Upon the imminent entry in 2008 of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) in Mexico, SENASICA developed an Emergency Plan that derived in a campaign against HLB on citrus crops, supported by plant and vector detection of the bacterial agent CLas (SIRVEF, 2018; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2014). However, the reliability of the molecular diagnosis must include CLas and other organisms capable of inducing symptoms similar to HLB, consisting of chlorotic and asymmetric spots, slight vein whitening and leaf yellowing (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012). In Brazil and China in 2008 and 2009, and more recently, in 2018, phytoplasmas belonged to groups 16Sr I and IX were reported in *Citrus sinensis* causing symptoms similar to HLB (Wulff *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2008). Due to the importance of sampling in planning and operation of the campaign against HLB, and to the need for massive and reliable molecular diagnoses, the present investigation had the aim of detecting the occurrence of phytoplasmas in *Citrus* spp using nested PCR and sequencing with the purpose of establishing the potential implication of these organisms in the detection of CLas on different citrus species and identifying alternate hosts and potential vector insects to eventually be integrated onto risk models and control programs.

Base on phytosanitary alerts of the Plant Health Committee of the State of Hidalgo, in which *Citrus*

16Sr I y IX en *Citrus sinensis* causando síntomas similares al HLB (Wulff *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2008). Debido a la importancia del muestreo en la planeación y operación de Campaña Contra el HLB y a la necesidad de diagnósticos moleculares masivos y confiables, el presente trabajo tuvo como objetivo detectar la ocurrencia de fitoplasmas en árboles de *Citrus* spp mediante PCR anidado y secuenciación con el propósito de establecer la potencial implicación de estos organismos en la detección de CLas en diferentes especies cítricas e identificar hospederos alternos y potenciales insectos vectores para su eventual integración en modelos de riesgo y control.

A partir de una alerta fitosanitaria emitida por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Hidalgo, en la cual árboles de *Citrus* spp con síntomas típicos a CLas tuvieron un diagnóstico negativo, en julio 2013 se exploraron 15 huertas familiares y comerciales de los municipios Atlapexco, Huejutla, Orizatlán, Xochiatipan y Jaltocan. Se realizó un muestreo dirigido a 16 árboles de *Citrus sinensis*, *C. latifolia*, *C. aurantifolia* y *C. limetta* con síntomas foliares consistentes en moteados cloróticos asimétricos, aclaramiento de nervaduras y corchosis (Cuadro 1). Se conformó una muestra compuesta por árbol a partir de tejido colectado por cada orientación cardinal y centro del dosel. Por cada orientación se colectó una vareta de 10-15 cm con 2-5 hojas maduras del ciclo vegetativo anterior. Adicionalmente, se colectaron hojas, ramas y tallos de 13 malezas que presentaron síntomas sospechosos a infección por fitoplasmas consistentes en clorosis, acortamiento de entrenudos, proliferación de brotes, filodia y/o virescencia. Las muestras de tejido vegetal se conservaron en hieleras para su traslado a laboratorio donde se mantuvieron a 4 °C por 2-3 días hasta su procesamiento. Los insectos asociados a árboles y malezas muestreadas se colectaron con una red entomológica de golpeo y se

trees with typical CLas symptoms had a negative diagnosis, in July of 2013, 15 country backyards and commercial orchards were explored in the municipalities of Atlapexco, Huejutla, Orizatlán, Xochiatipan and Jaltocan. Samples were taken from 16 *Citrus sinensis*, *C. latifolia*, *C. aurantifolia* and *C. limetta* trees with foliar symptoms consisting of asymmetric chlorotic spots, whitening and corky veins (Table 1). A compound sample was taken for every tree, from tissue collected for each cardinal direction and the center of the canopy. For each direction, a 10-15 cm shoot was selected with 2-5 mature leaves of the previous vegetative cycle. In addition, leaves, branches and stems were collected from 13 weeds with suspected symptoms of infection by phytoplasma consisting of chlorosis, shortening of internodes, proliferation of sprouts, phyllody and/or virescence. The plant tissue samples were stored in ice boxes and taken to the lab, where they were kept at 4 °C for 2-3 days until processing. The insects associated to sampled trees and weeds were collected using a butterfly net and kept in alcohol at 70% for their later identification at UACH and confirmation in the entomology lab of the National Plant Health Reference Center, DGSV. The weed samples that turned out positive for phytoplasmas were taxonomically identified in the herbarium of the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Other regions and crops selected by the COLPOS-LANREF research group included *C. aurantifolia* in Armeria, Colima in 2012 with 10 trees; *C. sinensis* and *C. latifolia* in Acateno, Puebla; Papantla, Martínez de la Torre, Tihutlán and Álamo, Veracruz in 2018 with a total of 49 samples obtained from trees with typical HLB symptoms yet negative to CLas (Table 1).

The total DNA extraction was carried out using DNaesy® Plant Mini Kit (Qiagen) from 0.1 g of plant tissue consistent in petioles, central vein and pieces of twig stems with a diameter of 1-0.5 cm.

Cuadro 1. Especies de cítricos y arvenses positivas a CLas, al *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, y a un putativo fitoplasma del *Aster yellow group*. Principal síntoma observado en muestreos dirigidos a huertos comerciales y de traspatio de cuatro entidades federativas de México en 2012, 2013 y 2018.

Table 1. Species of citrus plants and weeds positive to CLas, the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, and to a putative phytoplasma of the *Aster yellow group*. Main symptom observed in samples from commercial orchards and country backyards in four Mexican states in 2012, 2013 and 2018.

Estado	Especie Botánica	Muestras Positivas	Principal Síntoma	^x BHDA phytoplasma	^y AY phytoplasma	^z HLB
Hidalgo	<i>Citrus latifolia</i>	1/6	Aclaramiento nervaduras	+	-	0/6
	<i>C. aurantifolia</i>	1/3	Moteados	+	-	0/3
	<i>C. limetta</i>	0/5	Variegado	-	-	0/5
	<i>C. sinensis</i>	0/2	Clorosis	-	-	0/2
	<i>Bidens odorata</i>	1/1	Filodia	+	-	0/1
	<i>Cajanus cajan</i>	1/1	Escoba de bruja	+	-	0/1
	<i>Catharanthus roseus</i>	2/2	Filodia y virescencia	-	+	NA
	<i>Commelina difusa</i>	0/1	Clorosis	-	-	NA
	<i>Cuscuta</i> sp	0/1	Clorosis	-	-	NA
	<i>Murraya paniculata</i>	0/1	Clorosis	-	-	0/1
	Otras especies	0/6	Clorosis	-	-	NA
Colima	<i>C. aurantifolia</i>	7/10	Moteado	-	-	7/10
Puebla	<i>C. paradisi</i>	1/1	Moteado	-	-	1/1
Veracruz	<i>C. sinensis</i>	0/17	Moteado	-	-	0/17
	<i>C. reticulata</i>	0/12	Moteado	-	-	0/12
	<i>C. latifolia</i>	0/9	Moteado	-	-	0/9

^x *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, iniciadores P1/P7 y D7f2/D7r2 / *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*, primers P1/P7 and D7f2/D7r2

^y Putativo fitoplasma perteneciente al *Aster yellow group*, iniciadores P1/P7 y R16F2/R16R2 / Putative phytoplasma belonging to the *Aster yellow group*, primers P1/P7 and R16F2/R16R2

^z *Candidatus Liberibacter asiaticus*, iniciadores A2/J5 / *Candidatus Liberibacter asiaticus*, primers A2/J5.

conservaron en alcohol al 70% para su posterior identificación en la UACH y posterior confirmación en el laboratorio de entomología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, DGSV. Las muestras de malezas positivas a fitoplasmas se identificaron taxonómicamente en el herbario del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Otras regiones y cultivos que se seleccionaron por el grupo de investigación COLPOS-LANREF incluyeron *C. aurantifolia* en Armeria, Colima en 2012 con 10 árboles; *C. sinensis* y *C. latifolia* en Acateno, Puebla; Papantla, Martínez de la Torre, Tihutlán y Álamo, Veracruz en 2018 con un total de 49 muestras obtenidas de árboles con síntomas típicos de HLB pero con antecedentes de resultados negativos a CLas (Cuadro 1).

Phytoplasma was detected using nested PCR with primers related to the gene 16S of the rRNA (Ahrens & Semüller, 1992). The first PCR reaction required the use of universal primers P1/P7 (Berges *et al.*, 2000; Ahrens & Semüller, 1992). The second PCR was carried out independently with two pairs of primers: R16F2/R16R2, universal to phytoplasmas (Lee *et al.*, 1993), and with D7f2/D7r2 specific to the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* (BHDA-Phytoplasma) (Teixeira *et al.*, 2008). For the first PCR, the reaction volume consisted in 25 µL composed of: 1X GoTaq buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 200 mM dNTP's, 20 pmol of each primer, 2 units of DNA *Taq* polymerase (Promega) and 2 µL of total DNA. The thermal program consisted in the denaturalization for 4 min

La extracción de ADN total se realizó con DNaesy® Plant Mini Kit (Qiagen) a partir de 0.1 gr de tejido vegetal consistente en peciolo, nervaduras centrales y trozos de tallos de ramillas de 1-0.5 cm diámetro. La detección de fitoplasmas se realizó mediante PCR anidado con iniciadores asociados al gen 16S del rRNA (Ahrens & Semüller, 1992). Para la primera reacción de PCR se emplearon los iniciadores universales P1/P7 (Berges *et al.*, 2000; Ahrens & Semüller, 1992). La segunda reacción PCR se realizó en forma independiente con dos pares de iniciadores: R16F2/R16R2, universales a fitoplasmas (Lee *et al.*, 1993), y con D7f2/D7r2 específicos al *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma (BHDA-Phytoplasma)* (Teixeira *et al.*, 2008). Para la primera PCR, el volumen de reacción consistió en 25 µL constituido por: 1X de buffer GoTaq, 1.5 mM de MgCl₂, 200 mM dNTP's, 20 pmol de cada primer, 2 unidades de DNA *Taq* polimerasa (Promega) y 2 µL de ADN total. El programa térmico consistió en desnaturalización por 4 min a 94 °C continuado con 35 ciclos a 92 °C por 45 s, 58 °C por 45 s y 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C por 7 min. Para la segunda PCR, la reacción se realizó con 25 µL totales que incluyeron: 1X de buffer GoTaq, 1.5 mM de MgCl₂, 200 mM dNTP's, 20 pmol de cada primer, 2 unidades de DNA *Taq* polimerasa (Promega) y 5 µL producto del primer PCR diluido 1:10. El programa térmico para la reacción con los iniciadores R16F2/R16R2 consistió en desnaturalización a 94 °C por 5 min seguido de 35 ciclos: 94 °C por 30 s, 53 °C por 50 s, 72 °C por 80 s y una extensión final a 72 °C por 10 min. Para la reacción con los iniciadores D7f2/D7r2 se realizó desnaturalización a 94 °C por 3 min y 40 ciclos a 92 °C por 45 s, 62 °C por 45 s, 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C por 7 min.

Las muestras de cítricos también fueron analizadas mediante PCR para la detección de CLAs,

at 94 °C, followed by 35 cycles at 92 °C for 45 s, 58 °C for 45 s and 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 7 min. For the second PCR, the reaction was carried out with 25 µL in total, which included: 1X GoTaq buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 200 mM dNTP's, 20 pmol of each primer, 2 units of DNA *Taq* polymerase (Promega) and 5 µL produced by the first PCR diluted 1:10. The thermal program for the reaction with primers R16F2/R16R2 consisted in the denaturalization at 94 °C for 5 min followed by 35 cycles: 94 °C for 30 s, 53 °C for 50 s, 72 °C for 80 s and a final extension at 72 °C for 10 min. For the reaction with primers D7f2/D7r2, a denaturalization was carried out at 94 °C for 3 min and 40 cycles at 92 °C for 45 s, 62 °C for 45 s, 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 7 min.

The citrus samples were also analyzed using PCR to detect CLAs, using primers A2/J5. The reaction volume consisted of 25 µL: 1X of GoTaq buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 200 mM dNTP's, 20 pmol of each primer and 2 units of DNA *Taq* polymerase. The thermal program consisted in the denaturalization at 94 °C for 4 min followed by 35 cycles at 92 °C for 45 s, 58 °C for 45 s, 72 °C for 90 s and a final extension at 72 °C for 7 min. In all cases, the amplified fragments were analyzed by electrophoresis using agarose gel at 1.5% and viewed with a UV light transilluminator after staining with ethidium bromide. Amplicons that were positive for phytoplasmas were sequenced in the molecular biology laboratory of the National Plant Health Reference Center (DGSV, CNRF). The partial sequences of the gene 16S rRNA obtained with primers D7f2/ D7r2 were aligned with those reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and accessions were registered in that system. A phylogenetic analysis was carried out with the sequences found in *C. latifolia* and *C. aurantifolia* and those reported by other researchers

utilizando los iniciadores A2/J5. El volumen de reacción consistió en 25 µL: 1X de buffer GoTaq, 1.5 mM de MgCl₂, 200 mM dNTP's, 20 pmol de cada primer y 2 unidades de DNA Taq polimerasa. El programa térmico consistió en desnaturalización a 94 °C por 4 min seguida de 35 ciclos a 92 °C por 45 s, 58 °C por 45 s, 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C por 7 min. En todos los casos, los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis mediante un gel de agarosa al 1.5% y visualizados con un transiluminador de luz UV previo teñido con bromuro de etidio. Amplicones positivos a fitoplasmas fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (DGSV, CNRF). Las secuencias parciales del gen 16S rRNA obtenidas con los iniciadores D7f2/ D7r2 se alinearon con las reportadas en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) y se registraron en dicho sistema. Se realizó un análisis filogenético con las secuencias encontradas en *C. latifolia* y *C. aurantifolia* y las reportadas por otros investigadores (Wulff *et al.*, 2018; Arratia *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2009). Previamente se empleó *Seq Scanner* v2 para depurar las secuencias, seguido de *BioEdit* para editar la alineación y obtener las secuencias consenso en formato FASTA. Finalmente se utilizó *MEGA* v7 para generar el árbol filogenético.

Únicamente muestras de cítricos y arvenses de Hidalgo fueron positivas a fitoplasmas pero no a CLas. El PCR anidado con los iniciadores P1/P7 y D7f2/D7r2 amplificaron un fragmento de 857 pb correspondiente al *BHDA-Phytoplasma*, perteneciente al *Pigeon pea witches'-broom phytoplasma* grupo 16Sr IX (99% homología). Las muestras positivas fueron de *C. latifolia* (1/6), *C. aurantifolia* (1/3) y de arvenses identificadas como *Bidens odorata* y *Cajanus cajan* (2/13), aunque con homologías entre 80 y 89% (Cuadro 1, Figura 1). Las secuencias obtenidas de *C. latifolia* y *C. aurantifolia*

(Wulff *et al.*, 2018; Arratia *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2009). *Seq Scanner* v2 was previously used to purify the sequenced, followed by *BioEdit* to edit the alignment and obtain the consensus sequences in a FASTA format. Finally, *MEGA* v7 was used to generate the phylogenetic tree.

Only citrus and weed samples from Hidalgo were positive for phytoplasmas, but not for CLas. The nested PCR with the primers P1/P7 and D7f2/ D7r2 amplified a fragment of 857, corresponding to *BHDA-Phytoplasma*, belonging to the *Pigeon pea witches'-broom phytoplasma* group 16Sr IX (99% homology). The positive samples were from *C. latifolia* (1/6), *C. aurantifolia* (1/3) and weeds identified as *Bidens odorata* and *Cajanus cajan* (2/13), although they had homologies between 80 and 89% (Table 1, Figure 1). The sequences obtained from *C. latifolia* and *C. aurantifolia* were registered in the NCBI with accession numbers MK282760 and MK282761, respectively. Using primers P1/P7 and R16F2/R16R2, a fragment of 1200 pb was amplified in 2 samples of *Catharanthus roseus*, possibly belonging to a phytoplasma of *Aster Yellow* group (Torres *et al.*, 2004). In samples from other states, CLas was found, but no phytoplasmas. Of *C. aurantifolia* samples from Colima, 70% (7/10) were positive for CLas, whereas in the Acateno-Álamo citrus corridor, only 1/39 was positive, despite the citrus fruits presented symptoms of spotted chlorosis, similar to that caused by the bacteria (Esquivel-Chavez *et al.*, 2012). These results indicate the restricted presence of *BHDA-Phytoplasma*, and possibly, of the group *Aster Yellow* in weeds (Torres *et al.*, 2004), although not related in mixed infections with CLas. On the other hand, in Sinaloa, Nayarit and Colima, Arratia and collaborators (2015) found *Candidatus Phytoplasma asteris*, a new taxon included in group 16SrI (Lee *et al.*, 2004), causing similar symptoms to HLB in *C.*

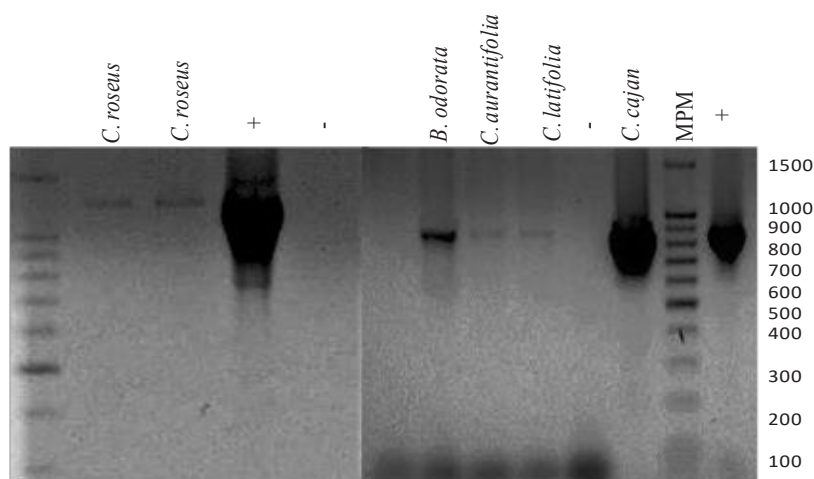


Figura 1. Visualización en gel de agarosa de fragmentos ADN amplificados mediante PCR anidado a partir de muestras vegetales provenientes de Hidalgo, México. Fragmentos de 1200 pb obtenidos con iniciadores P1/P7 y R16F2/R16R2 de muestras de *Catharanthus roseus*. Fragmentos de 857 pb obtenidos con iniciadores P1/P7 y D7f2/D7r2 de muestras de *Citrus aurantifolia* y *C. latifolia*, *Bidens odorata* y *Cajanus cajan*. Marcador peso molecular (MPM-100 Pb), (+) Testigo positivo y (-) Testigo negativo.

Figure 1. Visualization in agarose gel of DNA fragments amplified using nested PCR from tissue samples from Hidalgo, Mexico. Fragments of 1200 pb obtained using primers P1/P7 and R16F2/R16R2 of samples of *Catharanthus roseus*. Fragments of 857 pb obtained with primers P1/P7 and D7f2/D7r2 of samples of *Citrus aurantifolia* and *C. latifolia*, *Bidens odorata* and *Cajanus cajan*. Molecular weight marker (MWM-100 Pb), (+) Positive control and (-) Negative control.

fueron registradas en NCBI con los números de accesión MK282760 y MK282761, respectivamente. Con los iniciadores P1/P7 y R16F2/R16R2 se amplificó un fragmento de 1200 pb en 2 muestras de *Catharanthus roseus* posiblemente perteneciente a un fitoplasma del grupo *Aster Yellow* (Torres *et al.*, 2004). En las muestras de los otros estados se detectó a CLas pero no fitoplasmas. El 70% muestras de *C. aurantifolia* provenientes de Colima (7/10) resultaron positivas a CLas, mientras que en el corredor citrícola Acateno-Álamo, solo 1/39 resultó positiva a pesar de que los cítricos mostraron sintomatología de clorosis moteada similar a la causada por la bacteria (Esquivel-Chavez *et al.*, 2012). Estos resultados indican la presencia restringida del *BHDA-Phytoplasma*, y posiblemente del un miembro del grupo *Aster Yellow* en malezas (Torres *et al.*, 2004), pero no asociado en infecciones mixtas con CLas. Complementariamente, Arratia

aurantifolia, *C. latifolia* and *C. sinensis* trees in independent infections, or mixed with CLas (20/86 samples). Although no weeds or potential vector insects were included in that investigation, the frequency of this phytoplasma, the citrus host range, and the presence of mixed infections in the Pacific coast suggests the need to include this pathogen in future epidemiological studies, considering that group 16SrI is one of the most prevalent with over 100 hosts of worldwide economic importance (Lee *et al.*, 2004).

The leaves symptoms in *C. latifolia* consisted of vein yellowing and thickening, angular chlorotic spots, diffuse mottling spots. An irregular chlorotic spotting was observed in *C. aurantifolia* along with a moderate thickening of nervations (Figure 2). In Brazil, the symptoms caused by *BHDA-Phytoplasma* in *C. sinensis* were indistinguishable from CLas (Teixeira *et al.*, 2009); meanwhile, in

y colaboradores (2015) detectaron en Sinaloa, Nayarit y Colima a *Candidatus Phytoplasma asteris*, un novel taxón incluido en el grupo 16SrI (Lee *et al.*, 2004), causando síntomas similares al HLB en árboles de *C. aurantifolia*, *C. latifolia* y *C. sinensis* en infecciones independientes o mixtas con CLas (20/86 muestras). Aunque no se incluyeron arvences o potenciales insectos vectores en ese trabajo, la frecuencia de este fitoplasma, la diversidad de cítricos infectados y la presencia de infecciones mixtas en la vertiente del Pacífico sugiere la necesidad de incluir este patógeno en estudios epidemiológicos considerando que el grupo 16SrI es uno de los más prevalentes al infectar a más de 100 hospedantes de importancia económica a nivel mundial (Lee *et al.*, 2004).

Los síntomas foliares en *C. latifolia* se caracterizaron por un amarillamiento y engrosamiento de nervaduras, manchas cloróticas angulares, moteados difusos y acorchamiento. En *C. aurantifolia* se observó un moteado clorótico irregular y moderado engrosamiento de nervaduras (Figura 2). En Brasil, los síntomas causados por *BHDA-Phytoplasma* en *C. sinensis* son indistinguibles a los CLas (Teixeira *et al.*, 2009); mientras que en México, los síntomas inducidos por este fitoplasma en cítricos agrios no corresponden a los reportados para HLB (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles *et al.*, 2010). *B. odorata* exhibió filodia, coloraciones rojizas, reducción de área foliar, acortamiento de entrenudos, proliferación y achaparramiento de planta (Figura 3). En general, estos síntomas han sido ampliamente asociados a infección por fitoplasmas (Bertaccini y Duduk, 2009). Esta arvense, la cual concurrió en el huerto con un árbol positivo de *C. latifolia*, tuvo una predominancia del 80% indicativo de su potencial como reservorio de inóculo. La muestra positiva de *C. cajan* se encontró en un huerto de trasplante de *Citrus limetta*. El síntoma de escoba de bruja consistente en proliferación de brotes, acortamiento

Mexico, the symptoms induced by this phytoplasma in sour citrus are similar but not the same as those reported for HLB (Esquivel-Chávez *et al.*, 2012; Robles *et al.*, 2010). *B. odorata* displayed phyllody, reddish colors, the reduction of foliar areas, shortening of internodes, proliferation and plant shortening (Figure 3). In general, these symptoms have been widely related to infections by phytoplasmas (Bertaccini and Duduk, 2009). This weed, which appeared in the same orchard where a *C. latifolia* tree tested positive, had a 80% predominance indicating its potential as inoculum reservoir. The positive sample of *C. cajan* was found in a country backyard of *Citrus limetta*. The witches'-broom symptom, which consists in the proliferation of sprouts, internodes shortening, a general growth reduction and leaves chlorosis were observed in 50% of the plant's canopy (Figure 3). Similar symptoms caused by the same phytoplasma have been reported in Brazil for *Crotalaria juncea*, a fabaceae weed associated to citrus (Marques *et al.*, 2010). This is the first report of *B. odorata* and *C. cajan* as alternate hosts of the *BHDA-Phytoplasma* in Mexico.

Of the total insects collected on citrus orchards in Hidalgo, 77 specimens were identified, belonging to the families Cicadellidae, Membracidae and Liviidae, with the potential to transmit mollicutes and bacteria (Weintraub and Beanland, 2006). Six species belonged to the Cicadellidae family (Young, 1977; Medler, 1960; Beamer, R.H., 1944): *Chlorogonia coeruleovittata* (7/61), *Apogonia stali* (4/61), *Graphocephala* sp (7/61), *Tylozygus fasciatus* (8/61), *Agrosoma sykalis* (9/61), *Acinopterus* sp (5/61). Only one colony was found (20/61) with immature and adult states of *Membrasis mexicana* (Membracidae) in *C. cajan*. Out of the *D. citri* (Liviidae), CLas vector, 17/77 specimens were collected (Figure 4). Out of these species, members of the genera *Graphocephala* and



Figura 2. Síntomas de muestras positivas al *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*. A-D: Síntomas foliares en *Citrus latifolia* consistente en amarillamiento y engrosamiento de nervaduras, manchas cloróticas angulares, moteados difusos y acorchamiento de nervaduras. E y F: Síntomas en *C. aurantifolia* caracterizados por moteados cloróticos irregulares.

Figure 2. Symptoms of positive samples to the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma*. A-D: Leaves symptoms in *Citrus latifolia* consisting in yellowing and vein thickening, angular chlorotic spots, diffuse mottling spots and corky veins. E and F: Symptoms in *C. aurantifolia* characterized by irregular chlorotic spots.

de entrenudos, reducción general de crecimiento y clorosis foliar apical se mostraron en 50% del dosel planta (Figura 3). Síntomas similares causados por el mismo fitoplasma se han reportado en Brasil para *Crotalaria juncea*, una arvece de la familia fabaceae asociados con cítricos (Marques *et al.*, 2010). Este es el primer reporte de *B. odorata* y *C. cajan* como hospedantes alternos del BHDA-Phytoplasma en México.

Del total de insectos colectados en huertos cítricos de Hidalgo se identificaron 77 ejemplares,

Acinopterus have been reported as potential vectors of phytoplasmas of 16Sr III-A and *Aster Yellow* groups, respectively (Weintraub and Beanland, 2006). In the future, it will be important to identify at species level the specimens of these genera found in this investigation, as well as the revision of other reports of leafhoppers related to citrus in Mexico. For example, Blanco (2014), reported 21 species in the Yucatan Peninsula, though none were reported with the ability to transmit phytoplasmas (Weintraub and Beanland, 2006).



Figura 3. A-C: Síntomas en *Cajanus cajan* positiva al *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* (BHDA-phytoplasma); (A) Clorosis en ápices foliares, (B) Proliferación tipo fasciación en tallos, (C) *Membrasis mexicana* (Membracidae) en proliferación de tallos. E-G: Síntomas en *Bidens odorata* positiva a BHDA-phytoplasma; (E y F) Filodia en inflorescencias, (G) coloración rojizas en hojas. I-K: Síntomas en *Catharathus roseus* putativo a un fitoplasma del *Aster yellow group*; (I) Filodia floral, (J y K) Virescencia de flores. D-L: Síntomas de escoba de bruja en *C. cajan* (D), *B. odorata* (H) y *C. roseus* (L).

Figure 3. A-C: Symptoms in *Cajanus cajan* positive for *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* (BHDA-phytoplasma); (A) Leaf tips chlorosis, (B) Proliferation of stem fasciation. (C) *Membrasis mexicana* (Membracidae) in proliferation of stems. E-G: Symptoms on *Bidens odorata* positive for BHDA-phytoplasma; (E and F) Inflorescence phyllody, (G) Reddish of leaves. I-K: Symptoms in *Catharathus roseus* putative to a phytoplasma of the *Aster yellow group*; (I) Flower phyllody, (J and K) Flowers virescence. D-L: Symptoms of witches' broom in *C. cajan* (D), *B. odorata* (H) and *C. roseus* (L).

pertenecientes a las familias Cicadellidae, Membracidae y Liviidae, con potencial de transmitir mollicutes y bacterias (Weintraub y Beanland, 2006). Seis especies correspondieron a la familia Cicadellidae (Young, 1977; Medler, 1960; Beamer, R.H., 1944): *Chlorogonia coeruleovittata* (7/61), *Apogonia stali* (4/61), *Graphocephala* sp (7/61), *Tylozygus fasciatus* (8/61), *Agrosoma sykalis* (9/61), *Acinopterus* sp (5/61). Únicamente se encontró una colonia (20/61) con estados inmaduros y adultos de *Membrasis mexicana* (Membracidae) en *C. cajan*. De *D. citri* (Liviidae), vector de CLas, se colectaron 17/77 ejemplares (Figura 4). De estas especies, se han reportado miembros de los géneros *Graphocephala* y *Acinopterus* como potenciales vectores de fitoplasmas de los grupos 16Sr III-A y *Aster Yellow*, respectivamente (Weintraub y Beanland, 2006). En el futuro, es importante la caracterización a nivel de especie de los ejemplares de esos géneros encontrados en este trabajo y la revisión de otros reportes de cicadélidos asociados a cítricos en México. Por ejemplo, Blanco (2014), reportó 21 especies en la Península de Yucatán pero ninguna enlistada con capacidad de transmitir fitoplasmas (Weintraub y Beanland, 2006).

El análisis filogenético de secuencias parciales del gen 16S rRNA obtenidas en este trabajo y las publicadas para fitoplasmas que inducen síntomas similares o indistinguibles a los causados por CLas en cítricos muestra una clara discriminación genética entre grupos y posibles subgrupos (Figura 5).

El grupo 16Sr IX *Pigeon pea witches-broom phytoplasma* es aparentemente el más homogéneo e incluye las muestras de este trabajo y Brasil (Teixeira *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2008). Por otra parte, el grupo 16Sr I *Aster Yellow Phytoplasma* (AY180957), definió tres subgrupos con secuencias de Sinaloa, Colima y Nayarit (AB858474.1, AB858473.1 y AB858472.1, respectivamente) reportadas como miembros del novel taxón

The phylogenetic analysis of partial sequences of the 16S rRNA gene obtained in this investigation and those published for phytoplasmas that induce similar or indistinguishable symptoms from those caused by CLas on citrus shows a clear genetic discrimination between groups and possible subgroups (Figure 5).

The group 16Sr IX *Pigeon pea witches-broom phytoplasma* seems to be the most homogenous and it includes the samples from this investigation and from Brazil (Teixeira *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2008). On the other hand, the group 16Sr I *Aster Yellow Phytoplasma* (AY180957), defined three subgroups with sequences from Sinaloa, Colima and Nayarit (AB858474.1, AB858473.1 and AB858472.1, respectively) reported as member of the new taxon *Candidatus phytoplasma asteri* subgroup S (Sinaloa and Colima) and B (Nayarit) (Arratia *et al.*, 2015), as well as a sequence of *C. sinensis* from China (Chen *et al.*, 2009) with a similar distance to the *Aster Yellow*-type sequence. Although the group related to the 16Sr III *X-Disease* is preliminary because the sequences of the phytoplasma recently reported in Brazil are not yet published in NCBI (Wulff *et al.*, 2018), the use of sequences referred to in that publication help establish that it is relatively closer to group 16Sr IX.

These results demonstrate the presence of the *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma* (BHDA-Phytoplasma), which belongs to group 16Sr IX, related to *C. latifolia* and *C. aurantifolia* in Mexico inducing similar symptoms, no different to those caused by CLas. These hosts are reported for the first time in addition to their original report in *C. sinensis* in Brazil (Teixeira *et al.*, 2009). On the other hand *B. odorata* and *C. cajan* are reported as possible alternate hosts of the BHDA-Phytoplasma in Mexico. This phytoplasma is added to that reported by Arratia *et al.*, 2015 for

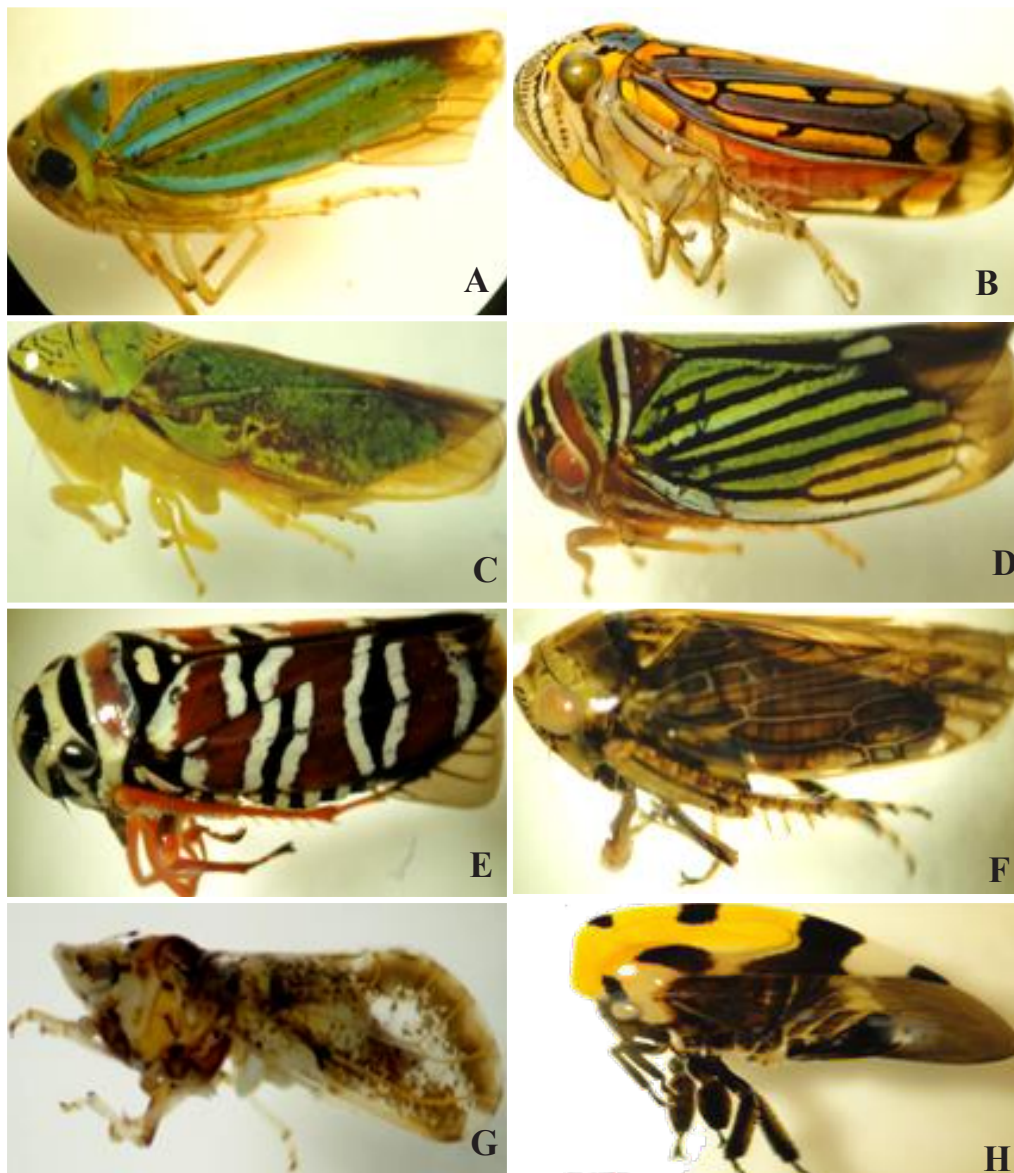


Figura 4. Insectos colectados en huertos con árboles cítricos o arvenses positivos al Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma y a un putativo fitoplasma del *Aster yellow group*. Cicadellidae: (A) *Chlorogonalia coeruleovittata*, (B) *Apogonalia stali*, (C) *Graphocephala* sp, (D) *Tylozygus fasciatus*, (E) *Agrosoma sykalis*, (F) *Acinopterus* sp.; Liviidae: (G) *Diaphorina citri*; Membracidae: (H) *Membrasis mexicana*.

Figure 4. Insects collected in orchards with citrus trees or weeds positive to the Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma and to a putative phytoplasma of the *Aster yellow group*. Cicadellidae: (A) *Chlorogonalia coeruleovittata*, (B) *Apogonalia stali*, (C) *Graphocephala* sp, (D) *Tylozygus fasciatus*, (E) *Agrosoma sykalis*, (F) *Acinopterus* sp.; Liviidae: (G) *Diaphorina citri*; Membracidae: (H) *Membrasis mexicana*.

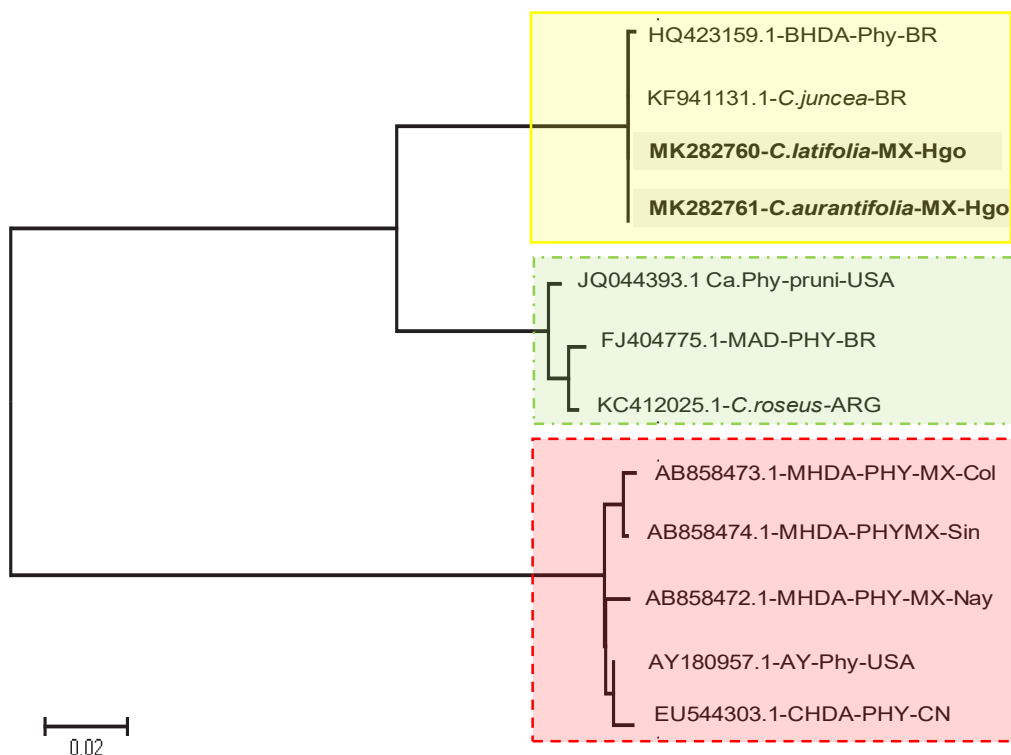


Figura 5. Árbol filogenético reconstruido con el método *Maximum likelihood* con base en el modelo de sustitución de nucleótidos *General Time Reversible* (GTR+I) con 500 *bootstrap*. Tres ramas principales se conforman diferencialmente: 1). 16Sr IX con muestras de *C.sinensis* y *Crotalaria juncea* de Brasil, y *C. latifolia* y *C. aurantifolia* de Hidalgo, México encontradas en este trabajo (recuadro amarillo y línea sólida). 2). 16Sr III con el reciente reporte de Brasil en *C. sinensis* (recuadro verde y línea punteada-guion), y 3). 16Sr I conformado con muestras de *Citrus* spp reportadas por Arratia et al., 2015 (recuadro rojo y línea en guiones).

Figure 5. Phylogenetic tree constructed using the *Maximum likelihood* method, based on the *General Time Reversible* nucleotide substitution model (GTR+I) with 500 *bootstrap*s. Three main branches are made up differentially: 1). 16Sr IX with samples of *C.sinensis* and *Crotalaria juncea* from Brazil, and *C. latifolia* and *C. aurantifolia* from Hidalgo, Mexico found in this investigation (yellow box and solid line). 2). 16Sr III with the recent report from Brazil in *C. sinensis* (green box and dotted line), and 3). 16Sr I made up of *Citrus* spp samples reported by Arratia et al., 2015 (red box and dotted line).

Candidatus phytoplasma asteri subgrupo S (Sinaloa y Colima) y B (Nayarit) (Arratia et al., 2015), así como una secuencia de *C. sinensis* procedente de China (Chen et al., 2009) con similar distancia a la secuencia tipo *Aster Yellow*. Aunque la agrupación asociada al 16Sr III *X-Disease* es preliminar debido a que las secuencias del fitoplasma recientemente reportado en Brasil aún no están publicadas en NCBI (Wulff et al., 2018), el empleo de secuencias referidas en dicha publicación permiten esta-

the Mexican Pacific region belonging to the taxon *Candidatus phytoplasma asteri* of the 16Sr I group. The presence of these phytoplasmas indicate the need to develop robust diagnosis systems for CLAs, the pathogen with the seemingly highest parasitic and epidemiological aptitude, but which can develop symptoms that can be mistaken for at least three types of phytoplasmas (members of 16SrI, 16SrIII and 16Sr IX). Epidemiological studies, including the role of potentially alternate

blecer que es un grupo relativamente más próximo al grupo 16Sr IX.

Estos resultados demuestran la presencia del *Brazilian Huanglongbing disease-associated phytoplasma (BHDA-Phytoplasma)*, miembro del grupo 16Sr IX, asociado a *C. latifolia* y *C. aurantifolia* en México induciendo síntomas similares, no indistintos a los causados por CLAs. Estos hospederos se reportan por primera vez en adición su original reporte en *C. sinensis* en Brasil (Teixeira *et al.*, 2008). Por otra parte se reporta a *B. odorata* y *C. cajan* como probables hospederos alternos del *BHDA-Phytoplasma* en México. Este fitoplasma se suma al reportado por Arratia *et al.*, 2015 para la región del Pacífico mexicano perteneciente al taxón *Candidatus phytoplasma asteri* del grupo 16Sr I. La presencia de estos fitoplasmas indican la necesidad de desarrollar sistemas de diagnóstico robustos para CLAs, patógeno con aparente mayor aptitud parasítica y epidemiológica, pero que puede desarrollar síntomas confundibles con al menos tres tipos de fitoplasmas (miembros de 16SrI, 16SrIII y 16Sr IX). Estudios epidemiológicos, incluyendo el rol de potenciales vectores y hospederos alternos, requieren ejecutarse en México para establecer los factores de riesgo e implicaciones simbióticas entre organismos parasíticos del bioma de los cítricos con el fin de un efectivo manejo fitosanitario.

LITERATURA CITADA

- Ahrens U and Seemüller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832. https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08_828.PDF
- Arratia CA, Santos CA, Fernández HM, Chávez ME, Flores ZJL, Camacho BG, Méndez LE, Leyva LJ. 2015. 'Candidatus Phytoplasma asteris' is associated with citrus "huanglongbing" disease in Mexico. *Phytopathogenic Mollicutes* <http://dx.doi.org/10.5958/2249-4677.2015.00039.0>.
- Beamer RH. 1944. A new species of *Acinopterus* from California (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Kansas Entomology Society* 17: 21-22. <http://direct.biostor.org/issn/0022-8567>
- Berges R, Rott M, and Seemüller E. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90:1145-1152. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.10.1145>
- Bertaccini, A. and Duduk B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355-378. DOI: http://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-3300
- Blanco RE. 2014. Cicadélidos (Hemiptera:Cicadellidae) Asociados a Cítricos en la Península de Yucatán. Tesis MC Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 87p. <http://www.remeri.org.mx/tesis/INDIXE-TESIS.jsp?search=colpos&ind=1326&step=200&order=3&asc=0>
- Chen J, Pu X, Deng X, Liu S, Li H and Civerolo E. 2009. A phytoplasma related to *Candidatus Phytoplasma asteri* detected in citrus showing HLB (Yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99:236-242. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0236>
- Esquivel-Chávez F, Valdovinos-Ponce G, Mora-Aguilera G, Gómez-Jaimes R, Velázquez-Monreal J., Manzanilla-Ramírez MA, Flores-Sánchez JF, López-Arroyo JI. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46: 769-782. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952012000800003&lng=es&nrm=iso
- Flores-Sánchez J, Mora-Aguilera G, Loeza KE, López AJ, Gutiérrez EMA, Velázquez MJJ, Domínguez MS, Bassanezi R B, Acevedo SG and Robles GP. 2017. Diffusion model for describing the regional spread of huanglongbing from first reported outbreaks and basing an area wide disease management strategy. *Plant Disease* 101:1119-1127 <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- Lee IM, Hammond RW, Davis RE and Gundersen DE. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842. http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1993Articles/Phyto83n08_834.PDF
- Lee IM, Gundersen Rindal DE, Davis RE, Bottner KD, Marccone C and Seemüller E. 2004. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1037–1048. DOI 10.1099/ijs.0.02843-0
- Marques RN, Teixeira DC, Martins EC, Leite APR, Sanches AL, Yamamoto PT and Lopes JRS. 2010. Detection of the phytoplasma associated with citrus huanglongbing symptoms in the leafhopper *Scaphytopius marginelineatus*. *Citrus Research and Technology* 31:40. <http://bdpi.usp.br/single.php?id=002243478>.
- Medler JT. 1960. *Agrosoma*, a new genus for *Tettigoniapulchella* Guérin and related species (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 53: 18–26. <https://doi.org/10.1093/aesa/53.1.18>
- Mora-Aguilera G, Robles GP, López AJI, Flores SJ, Acevedo SG, Domínguez MS, Gutiérrez EA, Loeza KE y González GR. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los Cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 108–119. [http://rmf.smf.org.mx/Vol322014/AR/32-2\\_03.pdf](http://rmf.smf.org.mx/Vol322014/AR/32-2_03.pdf)
- Robles G, M. M, Velázquez MJJ, Manzanilla RMA, Orozco SM, Flores VR y U Medina UVM. 2010. Síntomas del Huanglongbing en limón mexicano. Primeras observaciones. Pp: 141–149. *In: Memorias del 1er Simp. Nal. sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México*. Monterrey, Nuevo León
- SIRVEF. 2018. Sistema Integral de Referencia para la Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/>
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC, Kitajima EW, Bassanezi R, Ayres AJ, Eveillard S, Saillard C and Bove JM. 2008. A phytoplasma closely related to the Pigeon pea witches'-broom phytoplasma 16srIX is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathology* 98:977–984. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-98-9-0977>
- Teixeira DC, Wulff NA, Martins EC and Bove JM. 2010. Phytoplasma associated with citrus Huanglongbing in Brazil. National Center for Biotechnology Information (NCBI). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/312435222>
- Torres L, Galdeano E, Docampo D and Conci L. 2004. Characterization of an *Aster yellows phytoplasma* associated with *Catharanthus* little leaf in Argentina. *Journal of Plant Pathology* 86(3): 209–214. <http://www.sipav.org/main/jpp/volumes/0304/030404.pdf>
- Wulff AN, Fassini GC, Marques VV, Martins CE, Coletti BDA, Teixeira DC, Sanches MM, Bove J. 2018. Molecular characterization and detection of 16SrIII group phytoplasma associated with Huanglongbing symptoms. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-18-0081-R>
- Weintraub PG and Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91–111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>
- Young DA. 1977. Taxonomic study of the Cicadellinae (Homoptera: Cicadellidae). Part 2. New World Cicadellid and the genus *Cicadella*. Technical Bulletin of the North Carolina Agricultural Experiment Station. 239. 1135 pp. <https://eurekamag.com/research/006/580/006580776.php>