

Diferenciación de la población mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por doble-locus genómico con repeticiones cortas en tándem

Julio Santiago Ahumada-Rodríguez, Jael Arely Cervantes-Santos, Bricia Rivera-Villanueva, Norma Elena Leyva-López, Eduardo Sandoval-Castro, Jesús Méndez-Lozano, María Elena Santos-Cervantes*, Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Unidad Sinaloa. Laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos. Departamento de Biotecnología Agrícola. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, San Joaquín, Guasave, Sinaloa, CP 81101, México. José Joaquín Velázquez-Monreal, Campo Experimental Tecomán-INIFAP, Carretera Colima-Manzanillo km. 35. Tecomán, Colima, CP 28100, México.

*Autor de correspondencia: msantos@ipn.mx

Recibido: Agosto 28, 2022.

Aceptado: Noviembre 07, 2022.

Ahumada-Rodríguez JS, Cervantes-Santos JA, Rivera-Villanueva B, Leyva-López NE, Sandoval-Castro E, Méndez-Lozano J, Santos-Cervantes ME y Velázquez-Monreal JJ. 2022. Diferenciación de la población mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* por doble-locus genómico con repeticiones cortas en tándem. *Revista Mexicana de Fitopatología* 40(4).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-6>

Resumen. *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) se ha dispersado rápidamente a las regiones productoras de cítricos en México, ocasionando impactos económicos y sociales diferenciados. En México, los principales avances en investigación se han centrado en el manejo del vector, *Diaphorina citri* y en estudios de la interacción de CLas con limón mexicano. Sin embargo, la variabilidad genética de la bacteria en regiones productoras de México se ha estudiado poco. Por lo que, en el presente estudio se analizó la variación de la población mexicana de CLas con procedimientos

basados en PCR, secuenciación y electroforesis capilar a través de la detección del número de repeticiones en tándem (TRN) con dos marcadores STR, AGACACA y TACAGAA, el primero localizado en locus genómicos CLIBASIA_01645 y adenosina deaminasas. La distribución de los TRNs en la población mexicana de CLas en ambos loci mostraron variaciones con las poblaciones previamente reportadas en Florida, China y Brasil. Además, en la población mexicana se encontraron tres haplotipos, HA, HB y HC, siendo el primer reporte del haplotipo HC en las regiones citrícolas en México. Interesantemente, las subpoblaciones de CLas del Occidente y Noroeste son diferentes a la del Sureste.

Palabras clave: Cítricos, huanglongbing, haplotipos, variación genética.

La citricultura constituye una de las principales actividades en la fruticultura mexicana, ya que ocupa una superficie total cercana a las 570 mil ha,

las cuales producen aproximadamente 8.5 millones de toneladas, lo que posiciona a México como cuarto productor mundial, después de China, Brasil e India (FAOSTAT, 2020). Los principales cítricos que se cultivan son: naranja (*Citrus sinensis*), limón Mexicano (*C. aurantifolia*), limón Persa (*C. latifolia*), toronja (*C. paradisi*) y mandarina (*C. reticulata*). Sin embargo, la citricultura mexicana se ha visto seriamente afectada por la enfermedad considerada más destructiva de los cítricos en el mundo llamada Huanglongbing (HLB) (da Graça *et al.*, 2016; Robles-González *et al.*, 2017). El HLB en México se detectó por primera vez en el municipio de Tizimín, Yucatán en julio de 2009 y actualmente se encuentra en 24 de los 28 estados citrícolas del país (SENASICA, 2018). La enfermedad es causada por especies del género *Candidatus Liberibacter*, aunque también se ha asociado a *Candidatus Phytoplasma* spp. (Teixeira *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Arratia-Castro *et al.*, 2014; Lou *et al.*, 2014; Wulff *et al.*, 2019). La especie presente en México es CLas. El impacto económico y social estimado en tan solo tres años desde la primera detección de la bacteria CLas, fue la pérdida de 1.7 millones de toneladas de frutos y 112.1 millones de jornales (Díaz-Padilla *et al.*, 2014). Como estrategia nacional para mitigar los daños ocasionados, se diseñó e implementó la campaña fitosanitaria contra el HLB, la cual se enfocó inicialmente a la detección y búsqueda de síntomas asociados a la bacteria CLas, remoción de árboles enfermos y al control del vector, *D. citri* a través de áreas regionales de control.

La investigación sobre HLB es limitada por la naturaleza incultivable de la bacteria CLas en medios artificiales. Esta bacteria es un parásito obligado de las células del floema, por lo que los estudios se limitan a técnicas de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), análisis de secuencias de genes amplificados por PCR, caracterización de

fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs), además, de aplicaciones más amplias, tales como el análisis de microsatélites y el análisis de pan-genomas (Bastianel *et al.*, 2005; Tomimura *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Katoh *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013; Katoh *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2016). Actualmente, se cuenta con la secuenciación del genoma completo de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), proveniente tanto de tejido de planta como del insecto vector, *D. citri* infectado (Duan *et al.*, 2009; Tyler *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Wulff *et al.*, 2014; Katoh *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014, 2018), lo que ha permitido la identificación de repeticiones cortas en tándem (STR). Los STR, también conocidos como microsatélites, consisten en secuencias repetitivas de nucleótidos en un fragmento de secuencia de ADN con una longitud de dos a seis o más pares de bases (pb). Los microsatélites son considerados marcadores moleculares para estudios de relaciones evolutivas, mapeo genético y genética de poblaciones (Chen *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2012, Matos *et al.*, 2013; Gosh *et al.*, 2015). Son utilizados ampliamente para realizar un seguimiento de la posible introducción de cepas de CLas de un país a otro (Chen *et al.*, 2010; Katoh *et al.*, 2011; Islam *et al.*, 2012), comprender el efecto de CLas en las plantas (Matos *et al.*, 2013), en el insecto vector (Katoh *et al.*, 2015), en la evolución y para abordar la diversidad intrínseca del patógeno. Además, los estudios genómicos con cepas de referencia pueden ayudar a identificar el genotipo predominante o raro en un tiempo o región determinada (Katoh *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2018).

El análisis con STR ha sido ampliamente utilizado para estudios poblacionales en bacterias (van Belkum *et al.*, 2007; Gétaz *et al.*, 2018;), incluyendo a CLas (Chen *et al.*, 2010; Katoh *et al.*,

2011; Islam *et al.*, 2012; Matos *et al.* 2013; Ma *et al.*, 2014). Chen y colaboradores (2010) reportaron variaciones con base al número de repeticiones en tándem (TRN) en el marcador STR AGACACA, localizado en el locus genómico CLIBASIA_01645 de CLas en poblaciones de Guangdong, China y Florida, EUA, encontrando que en la población de Florida predominó el genotipo de cinco repeticiones en tándem (TRN=5) en un 85.5% de las muestras, mientras que en la población de Guangdong predominó el genotipo TRN=7 en un 47.7% de las muestras. Matos y colaboradores (2013) utilizaron cuatro marcadores STR con base a los TRN, incluyendo el locus genómico CLIBASIA_01645 (AGACACA), el locus adenosina deaminasas (TACAGAA) y dos locus de la bacteria no codificantes (CAGT y TTTG) para analizar la variación de cepas de CLas en poblaciones de Florida, México, varios países de Centro América y la región del Caribe. Sus resultados demostraron la presencia de dos haplotipos (HA y HB) en Florida. Interesantemente estos haplotipos se encontraron en países de América Central, región del Caribe y México; sin embargo, se mostraron diferentes a los obtenidos en las muestras del sur de Asia y de Brasil. No obstante, las muestras de México provenían solo de la Península de Yucatán. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue realizar la diferenciación estructural de las subpoblaciones de CLas del Noroeste, Occidente, Centro y Sureste del país utilizando doble-locus genómico con repeticiones cortas en tándem.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y procesamiento

Durante los años 2016 a 2020 se colectaron 177 muestras de follaje de cítricos con síntomas asociadas a la enfermedad HLB de regiones de

México. Las regiones del presente estudio fueron Noroeste (Sinaloa y Baja California Sur); Occidente (Colima, Jalisco, Michoacán y Nayarit); Centro (Estado de México y Morelos); y Sureste (Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo). El número de muestras por especie de cítricos fueron 49 de limón Mexicano (*C. aurantifolia*), 68 de limón Persa (*C. latifolia*), 40 de naranja (*C. sinensis*), siete de mandarina (*C. reticulata*), siete de toronja (*C. paradisi*), cuatro de limón volkameriano (*C. volkameriana*) y dos de limón italiano (*C. limon*).

Las muestras colectadas se trasladaron al laboratorio de Biología Molecular de Fitopatógenos de CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. Se separó y se cortó la nervadura central de las hojas de árboles de cítricos. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se liofilizaron durante 72 h. Las muestras liofilizadas se pulverizaron en un molino TissueLyser (Qiagen, Valencia, CA) durante 1 min (30 Hz), una vez pulverizadas se procedió a realizar las extracciones de ADN, el tejido restante se almacenó a 4 °C en un cuarto frío.

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método del CTAB al 3 % reportado previamente por Zhang y colaboradores (1998). El ADN obtenido se almacenó a -20 °C para su análisis posterior. La medición de la concentración y grado de pureza del ADN o relación ADN/Proteína se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), a través de la relación entre la absorbancia a 260nm y la absorbancia a 280nm (A260/A280).

Detección de CLas

Para la detección de CLas por PCR convencional se utilizaron los iniciadores A2 (5'-TATTAAAGG-

TTGACCTTTCGAGTTT-3') y J5 (5'-ACA-AAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3') que amplifican un fragmento de 703 pb en los genes del β -operon (rplA-rplJ) (Hocquellet *et al.*, 1999). El ensayo de PCR se realizó en tubos Eppendorf de 0.2 mL cuyo volumen total de reacción fue de 25 μ L, conteniendo 1X de buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 1 unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Brasil), 0.2 pmol de cada iniciador y 100 ng de ADN genómico total. Las mezclas de PCR se incubaron en un termociclador automático (Applied Biosystems Veriti™). Se utilizaron las siguientes condiciones: 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 62 °C, 1 min a 72 °C; y finalmente un ciclo a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1%.

Variación de la población mexicana de CLas

Para el análisis de la variación de CLas se utilizaron los loci genómicos STR CLIBASIA_0164 y adenosina deaminasas (Cuadro 1). Estos loci mostraron polimorfismo en estudios previos (Chen *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2012; Katoh *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2013). Además, se determinó el contenido de información polimórfica (PIC) para cada marcador STR (Botstein *et al.*, 1980). Para identificar las variaciones entre las cepas de CLas se utilizaron procedimientos basados en PCR, secuenciación y electroforesis capilar. Para el procedimiento de secuenciación, los fragmentos amplificados por PCR se ligaron en el vector de clonación pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega Corporation, USA). El producto de la ligación se transformó en células competentes JM109 de *Escherichia coli* siguiendo las especificaciones del proveedor. El ADN plasmídico con el inserto de interés se purificó con el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega Corporation, USA) y enviado a

secuenciar a LANGEBIO-CINVESTAV (Irapuato, Guanajuato). Se realizaron alineaciones múltiples de las secuencias obtenidas utilizando el programa CLUSTAL W en MEGA v. 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Los TRNs fueron contabilizados manualmente. Para el marcador AGACACA fue secuenciado una muestra de CLas representativa de cada TRN, y para el resto de las cepas se determinaron los TRNs por electroforesis capilar. Para realizar la corrida electroforética se utilizó el kit de alta resolución (QIAxcel High resolution). Se realizó la configuración del software del equipo siguiendo las recomendaciones del fabricante utilizando el método de corrida OM500 con una resolución de hasta 50 pb, el marcador de peso molecular (QX size marker) de 50-800 pb y el marcador de alineamiento interno (QX alignment marker) de 15pb-1kb. Para el marcador TACAGAA se secuenciaron 44 muestras de CLas representativas de cada subpoblación bajo estudio y por especie de cítrico. Para las muestras con múltiple amplicón se seleccionaron 10 clonas plasmídicas (pGEM-T) para identificar y secuenciar cada amplicón con diferente TRN (doble o triple amplicón).

Se analizaron las variaciones en ambos loci con base a los TRNs tanto en muestras que amplificaron un simple amplicón (SA) como las de múltiple amplicón (MA). La identificación de los TRNs de las muestras se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa con una cepa de referencia correspondiente a un amplicón de 291 pb y TRN igual a 10 (Figura 1). Se establecieron otras referencias utilizando muestras con diferentes TRN determinados por secuenciación (TRN=17, 22) (Figura 1).

Los haplotipos se identificaron con base al sistema de agrupación binaria (TRN \leq 10/TRN \geq 10) establecido por Chen y colaboradores (2010) y aplicado exitosamente para el análisis de poblaciones de CLas en China, Florida, México, y países de Centro América y región del Caribe (Matos *et al.*, 2013;

Cuadro 1. Origen de las muestras de cítricos para el análisis de la variación de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

| Origen de la muestra | Estados | Especie de cítrico | PCR positivas/ Total muestras | |
|----------------------|---------------------|--------------------|----------------------------------|-------|
| Noroeste | Sinaloa | Limón mexicano | 14/14 | |
| | | Limón persa | 3/5 | |
| | | Limón italiano | 2/2 | |
| | Baja California Sur | Naranja | 10/10 | |
| | | Toronja | 1/1 | |
| | | Limón mexicano | 2/2 | |
| Occidente | Colima | Toronja | 1/1 | |
| | | Limón mexicano | 21/21 | |
| | | Limón persa | 1/1 | |
| | | Naranja | 5/5 | |
| | | Limón volkameriano | 1/1 | |
| | Jalisco | Toronja | 1/1 | |
| | | Limón persa | 2/2 | |
| | | Naranja | 10/10 | |
| | | Mandarina | 5/5 | |
| | | Limón volkameriano | 1/1 | |
| | Michoacán | Limón mexicano | 1/1 | |
| | | Limón persa | 1/1 | |
| | | Limón volkameriano | 1/1 | |
| | Nayarit | Limón mexicano | 8/8 | |
| | | Limón persa | 11/11 | |
| | Centro | Estado de México | Limón persa | 1/1 |
| | | Morelos | Limón persa | 27/27 |
| | Sureste | Yucatán | Limón mexicano | 1/1 |
| Limón persa | | | 5/5 | |
| Naranja | | | 2/2 | |
| Quintana Roo | | Limón volkameriano | 1/1 | |
| | | Naranja | 1/1 | |
| Oaxaca | | Limón mexicano | 2/2 | |
| | | Veracruz | Limón persa | 8/15 |
| Naranja | | | 0/12 | |
| Toronja | | | 0/4 | |
| | | | Mandarina | 0/2 |
| | | | 150/177 | |

Ma *et al.*, 2014). Un haplotipo o genotipo haploide es la combinación de alelos que se encuentran en dos o más loci en un solo individuo (da Silva *et al.*, 2019). La diferenciación de la estructura de la población mexicana de CLas revelada por los TRNs se describió estimando su distribución para cada marcador STR, identificación y porcentaje de

haplotipos, el número de alelos y el índice de diversidad de Nei.

El índice de diversidad de Nei (valor H) se calculó con la herramienta GenAlex 6.5 utilizando la siguiente fórmula:

$H = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia del alelo en el locus i (Nei, 1972).

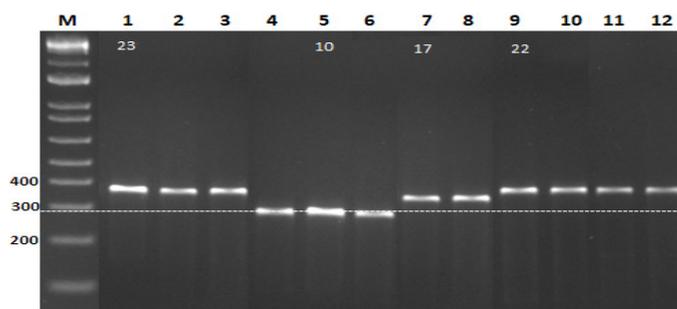


Figura 1. Genotipificación de cepas representativas de *Candidatus Liberibacter asiaticus* de regiones productoras de cítricos utilizando los iniciadores LasSSR-A-f/LasSSR-A-r que amplifican el locus adenosina deaminasas (STR TACAGAA). Carril M: Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen Life Technologies, Brasil). Líneas de 1 a 4 son muestras de la región de Occidente. Líneas 5 a 9 son muestras de la región Noroeste. Líneas 10 y 11 son muestras de la región Sureste. Línea 12 muestra de la región Centro. Los números en blanco indican los números de repeticiones en tándem (TRN). La línea horizontal punteada indica TRN=10.

RESULTADOS

Detección de CLas

Se detectó por PCR a CLas en 150 de un total de 177 muestras de cítricos de las subpoblaciones del Noroeste, Occidente, Centro y Sureste (Cuadro 1), obteniéndose el fragmento esperado de 703 pb (Datos no mostrados) (Hocquellet *et al.*, 1999). En general, en las muestras colectadas se observaron síntomas característicos del HLB como punteado clorótico, moteado asimétrico, engrosamiento de venas, y aclaramiento de nervaduras, con algunas excepciones, principalmente en el estado de Veracruz, donde se confundían con deficiencias nutricionales.

Variación de la población mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Para realizar el análisis de variación de la población mexicana de CLas se seleccionaron 87 individuos de los cítricos positivos con base al origen geográfico de la muestra, el número de muestras por huerto analizado, la distancia entre los lugares de colecta y el tipo de cítrico.

Las 87 muestras para analizar la variación de la población mexicana de CLas amplificaron con los dos marcadores STR utilizados en el presente estudio, obteniéndose valores de PIC de 0.6379 y 0.8247 para los marcadores AGACACA y TACAGAA, respectivamente (Cuadro 2), por lo que ambos marcadores se consideran informativos

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para la amplificación y caracterización de los loci STR con base número de repeticiones en tándem (TRN) en el genoma de cepas de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

| Iniciadores | Secuencia (5'-3') | TRN | PIC | Referencia |
|-------------|-------------------------|---------|--------|----------------------------|
| LapGP-1f | GACATTTCAACGGTATCGAC | AGACACA | 0.6379 | Chen <i>et al.</i> , 2010 |
| LapGP-1r | GCGACATAATCTCACTCCTT | | | |
| LasSSR-A-f | CGCCTACAGGAATTTTCGTTACG | TACAGAA | 0.8247 | Islam <i>et al.</i> , 2012 |
| LasSSR-A-r | GACATTTCAACGGTATCGAC | | | |

o polimórficos, ya que tienen valores de PIC superiores a 0.5 con base a los valores sugeridos por Botstein y colaboradores (1980).

Con el marcador AGACACA amplificaron 85 muestras con simple amplicón (SA) y dos muestras con múltiple amplicón (MA) (Cuadro 3). Mientras que, para el marcador TACAGAA amplificaron 81 muestras con SA y en seis muestras se observaron de dos a tres amplicones (Cuadro 3). Con el marcador AGACACA los TRN con SA fueron de 5, 8, 12, 13, 14, 15 y 19 repeticiones, predominando el de 14, 15 y 13 en el 90.5% de las muestras analizadas. En el Occidente se encontraron los TRNs 13, 14 y 15. En el Noroeste y Sureste se encontraron los TRN 14 y 15, mientras que en el Centro solo el TRN 14. El TRN de cinco solo se encontró en la región Sureste, aunque con baja presencia (3.5%). El TRN 8 y 12 se encontraron solo en la región Noroeste, aunque también en pocas muestras. El TRN 19 se encontró con baja presencia en la región Noroeste

(1.1%) y Sureste (1.1%). Los TRNs con SA con el marcador TACAGAA fueron más diversos, aunque predominó el TRN 22 en todas las regiones cítricas (30.4%), siguiéndole el TRN 24 (29.6%) y 17 (13.6%) en las regiones Noroeste y Occidente. Los TRNs 9 (4.9%) y 10 (13.6%) se encontraron en la región Noroeste, Occidente y Sureste. El TRN ocho se encontró solamente en la región Sureste (3.7%). Los TRNs 12 (2.5%), 16 (2.5%) y 23 (2.3%) solo se encontraron en la región Occidente (Cuadro 3).

El número de alelos de CLas de las regiones cítricas por cada marcador varió entre dos y once (Cuadro 3). Las cepas de CLas con el marcador TACAGAA mostraron la mayor variabilidad genética con doce alelos y un índice de diversidad de Nei global de 0.694. Con el marcador AGACACA se encontraron nueve alelos y un índice de diversidad de Nei global de 0.574 (Cuadro 3). Las cepas de CLas de la región Noroeste

Cuadro 3. Distribución del número de repeticiones tándem (TRN) de único amplicón (SA) y múltiple amplicón (MA) y diversidad genética en la población mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* descrita mediante el número de alelos y el índice de diversidad de Nei (H).

| Población | SA TRN AGACACA | | | | | | | | | | | | | | Total ^x | MA ^y | Total ^z | Alelos | H |
|--------------|-------------------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------|--------------|
| | 5 | 8 | 9 | 10 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 19 | 22 | 23 | 24 | | | | | |
| Noroeste | | 1 | | | 2 | | 16 | 1 | | | 1 | | | | 21 | | 21 | 5 | 0.541 |
| Occidente | | | | | | 12 | 27 | 12 | | | | | | | 51 | 1 | 52 | 4 | 0.638 |
| Centro | | | | | | | 2 | | | | | | | | 2 | 1 | 3 | 2 | 0.375 |
| Sureste | | 3 | | | | | 6 | 1 | | | 1 | | | | 11 | | 11 | 5 | 0.744 |
| Total | 3 | 1 | | | 2 | 12 | 51 | 14 | | | 2 | | | 85 | 2 | 87 | 9 | 0.574 | |
| | TRN TACAGAA | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Noroeste | | | 1 | 2 | | | 3 | | | | 2 | 4 | | 4 | 16 | 5(5) | 21 | 11 | 0.862 |
| Occidente | | | 1 | 6 | 2 | | 1 | | 2 | 9 | | 16 | 2 | 12 | 51 | 1(1) | 52 | 9 | 0.797 |
| Centro | | | | | | | 2 | | | | | 1 | | | 3 | | 3 | 2 | 0.375 |
| Sureste | | 3 | 2 | 3 | | | | | | | | 3 | | | 11 | | 11 | 4 | 0.744 |
| Total | 3 | 4 | 11 | 2 | | | 6 | | 2 | 11 | | 24 | 2 | 16 | 81 | 6 | 87 | 12 | 0.694 |

^xTotal de individuos con simple amplicón

^yTotal de individuos con múltiple amplicón. Los números entre paréntesis en las muestras con múltiple amplicón fueron seleccionadas para secuenciación.

^zTotal de individuos con único amplicón (SA) más individuos con múltiple amplicón (MA)

mostraron el mayor número de alelos (media de ocho alelos), obteniéndose once alelos con el marcador TACAGAA, mientras con el marcador AGACACA solo se obtuvieron cinco; seguido de la región Occidente y Sureste con una media de 6.5 y 4.5 alelos, respectivamente, con nueve y cuatro alelos con el marcador TACAGAA, así como cuatro y cinco con AGACACA, respectivamente (Cuadro 3). La diversidad genética de las cepas de CLas de las regiones cítricas mexicanas varió de 0.375 a 0.862 por marcador (Cuadro 3). La mayor variabilidad genética se obtuvo con el marcador TACAGAA en la región Noroeste, seguida por

Occidente, Sureste y Centro. Sin embargo, al tomar en cuenta la media de la diversidad genética con ambos marcadores, los valores variaron de 0.375 a 0.744 correspondiente a la región Centro y Sureste, respectivamente con una media de 0.634. Así, las cepas de CLas de la región Sureste mostraron la mayor diversidad genética, seguida por la región Occidente, Noroeste y Centro.

Las cepas de CLas se clasificaron en haplotipos con base al sistema de agrupación binaria $TRN \leq 10$ / $TRN \geq 10$ y combinación de alelos con ambos marcadores. Las cepas mexicanas de CLas se clasificaron en tres haplotipos (Cuadro 4 y 5),

Cuadro 4. Frecuencia de haplotipos en la población mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus* con base al análisis del número de repeticiones en tandem (TRN) por doble locus genómico.

| Haplotipo | Marcador | | Población ^y | | | | Total | Referencia |
|--------------|----------------|----------------|------------------------|-------------|-----------------|------------|-------------|----------------------------|
| | AGACACA TRN | TACAGAA TRN | Noroeste | Occidente | Centro | Sureste | | |
| HA | ≤ 10 | 9 | | | Na ^z | | | Matos <i>et al.</i> , 2013 |
| | | 10 | | | | | | |
| HB | ≥ 10 | 15 | | | | | | Este estudio |
| | | 16 | | | | | | |
| HA | ≤ 10 | 8 | | | | 3.3 | 3.3 | Este estudio |
| | | 14 | | | 1.1 | | 1.0 | |
| | | 22 | 1.1 | | | | 1.0 | |
| | | 24 | | 1.1 | | | 1.0 | |
| Total | | | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 3.3 | 6.3 | |
| HB | ≥ 10 | 12 | | 2.2 | | | 2.2 | Este estudio |
| | | 14 | | 1.1 | 1.1 | | 2.2 | |
| | | 16 | 1.1 | 2.2 | | | 3.3 | |
| | | 17 | 5.4 | 8.7 | | | 14.1 | |
| | | 19 | 1.1 | | | | 1.1 | |
| | | 22 | 4.3 | 19.6 | 1.1 | 3.3 | 28.3 | |
| | | 23 | 1.1 | 2.2 | | | 3.3 | |
| | | 24 | 6.5 | 11.9 | | | 18.4 | |
| Total | | | 19.5 | 47.9 | 2.2 | 3.3 | 72.9 | |
| HC | ≥ 10 | 4 | 1.1 | | | | 1.1 | Este estudio |
| | | 8 | 1.1 | | | | 1.1 | |
| | | 9 | 1.1 | 2.2 | | 2.2 | 5.4 | |
| | | 10 | 3.3 | 6.5 | | 3.3 | 13.1 | |
| Total | | | 6.6 | 8.7 | | 5.4 | 20.8 | |

^yEl valor corresponde al porcentaje de cada combinación alélica en muestras infectadas de la población mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

^zNo aplica, corresponden a haplotipos encontrados en Florida, EUA.

Cuadro 5. Frecuencia de haplotipos de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en diferentes especies de cítricos de regiones productoras de México con base al análisis del número de repeticiones en tandem (TRN) por doble locus genómico.

| Haplotipo | Marcador | | Especie de cítrico ^z | | | | | | | Total |
|--------------|----------------|----------------|---------------------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| | AGACACA TRN | TACAGAA TRN | LM | LP | LV | LI | T | N | M | |
| HA | ≤10 | 8 | | 3.3 | | | | | | 3.3 |
| | | 14 | | 1.1 | | | | | | 1.1 |
| | | 22 | | | | | 1.1 | | | 1.1 |
| | | 24 | | | | 1.1 | | | | 1.1 |
| Total | | | | 4.4 | 1.1 | 1.1 | | | | 6.6 |
| HB | ≥10 | 12 | 2.2 | | | | | | | 2.2 |
| | | 14 | | 1.1 | 1.1 | | | | | 2.2 |
| | | 16 | | 1.1 | | | | 2.2 | | 3.3 |
| | | 17 | 3.3 | 7.6 | | | | 3.3 | | 14.2 |
| | | 19 | | 1.1 | | | | | | 1.1 |
| | | 22 | 9.8 | 7.6 | 1.1 | 1.1 | 1.1 | 4.3 | 2.2 | 27.2 |
| | | 23 | 2.2 | | | | | 1.1 | | 3.3 |
| | | 24 | 16.3 | 1.1 | 1.1 | | | | | 18.5 |
| | | Total | | 33.8 | 19.6 | 3.3 | 1.1 | 2.2 | 9.8 | 2.2 |
| HC | ≥10 | 4 | | 1.1 | | | | | | 1.1 |
| | | 8 | | 1.1 | | | | | | 1.1 |
| | | 9 | | 1.1 | | | 1.1 | 2.2 | 1.1 | 5.5 |
| | | 10 | 4.3 | 3.3 | | | | 4.3 | 1.1 | 13.1 |
| Total | | | 4.3 | 6.6 | | | 1.1 | 6.5 | 3.3 | 20.7 |

^zEl valor corresponde al porcentaje de cada combinación alélica en muestras de diferentes especies de cítricos infectadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus*. LM = Limón mexicano, LP = Limón persa, LV = Limón volkameriano, LI = Limón italiano, T = Toronja, N = Naranja, M = Mandarina.

predominando el haplotipo B (HB) en todas las regiones cítricas y en todas las especies de cítricos, con el 72.9% y 72.1% de las muestras, respectivamente, seguido por el haplotipo C (HC) encontrado en las regiones cítricas Noroeste, Occidente y Sureste en el 20.8% de las muestras de todos los cítricos (22.95), excepto en mandarina. El haplotipo A (HA) se encontró con baja presencia en el Noroeste (1.1%), Occidente (1.1%), Centro (1.1%) y Sureste (3.3%) en limón persa (3.3%), limón volkameriano (1.1%) y limón italiano (1.1%) (Cuadro 3 y 4).

DISCUSIÓN

Siguiendo el sistema de clasificación de haplotipos desarrollado por Matos y colaboradores (2013), la población mexicana de CLas se agrupó en tres haplotipos (HA, HB y HC), mientras que, en un estudio previo con muestras de Florida, la Península de Yucatán y países de Centro América y región del Caribe solamente se encontraron los haplotipos HA y HB (Matos *et al.*, 2013). La combinación de TRNs con el doble locus genómico que permitió la clasificación del nuevo haplotipo

HC en el presente estudio no había sido reportada previamente en la población mexicana de CLas, tampoco en EUA, China y Brasil (Matos *et al.*, 2013), la cual consiste en la combinación de TRNs igual o mayores a 10 con el marcador AGACACA y TRNs igual o menores a 10 con el marcador TACAGAA. Algunos autores mencionan que el número de muestras es fundamental para una buena caracterización de cepas de CLas cuando la extensión de los huertos es grande (da Silva *et al.*, 2019). Sin embargo, otro de los elementos relevantes en estudios de diversidad genética es el PIC, el cual depende del número de alelos y de las frecuencias relativas de los locus utilizados. El haplotipo HC se identificó en las subpoblaciones Noroeste, Occidente y Sureste en un bajo número de muestras; sin embargo, el PIC de los loci STR utilizados en el presente estudio fue mayor a 0.5, por lo tanto, estos se consideran informativos o polimórficos (Botstein *et al.*, 1980). En el estudio realizado por Matos y colaboradores (2013) en la Península de Yucatán se analizó un mayor número de muestras con la misma combinación de marcadores STR utilizados en este estudio, reportando que el haplotipo HA fue el predominante, seguido del haplotipo HB, mientras que en el presente estudio, en la población del Sureste, que incluye también la Península de Yucatán se encontraron tres haplotipos, con una ligera predominancia del haplotipo HC, seguidos de los haplotipos HA y HB, además de mostrar la más alta diversidad genética, lo que puede estar relacionado a que en esta subpoblación fue donde se reportó por primera vez la presencia de la bacteria CLas en julio de 2009 en árboles de limón mexicano (Trujillo, 2010). Ese mismo año también se reportó la bacteria en los estados de Quintana Roo, Jalisco y Nayarit en árboles de limón mexicano y limón persa. Por lo que, se podría sugerir que los haplotipos HA y HB se introdujeron a la Península de Yucatán desde Florida y región

del Caribe y posteriormente se dispersaron a otras regiones cítricas de México. Sin embargo, el haplotipo HB predominó en las subpoblaciones de Occidente y Noroeste, lo que podría estar asociado al impacto o intensidad de la enfermedad del HLB asociado a la mayor susceptibilidad de las especies de cítricos agrios (limón mexicano y limón persa), a condiciones climatológicas favorables (clima cálido) (Mora-Aguilera *et al.*, 2014; Flores-Sánchez *et al.*, 2017; Mora-Aguilera *et al.*, 2019) y a una posible mayor virulencia; aunque posteriores estudios son necesarios para probar esta última hipótesis. Por otro lado, se sugiere que debido a la superficie establecida de cítricos, efecto agro-climático sobre la densidad del insecto vector, mayor incidencia de árboles infectados y tipo de cítrico se hayan ocasionado variaciones genéticas y la aparición o introducción de un nuevo haplotipo (HC) de la bacteria en la población mexicana, ya que dicho haplotipo fue encontrado en la subpoblación del sureste donde se detectó originalmente la enfermedad y en todos los cítricos analizados, excepto en limón italiano; y posteriormente se dispersó al Occidente y Noroeste del país. Actualmente el HLB se encuentra en 24 de los 28 estados cítricos del país; sin embargo, se ha vuelto endémico en la región Occidente, productora de limón mexicano y limón persa, donde ha causado un impacto económico y social trascendental. Por todo lo anterior, es de gran relevancia realizar investigación con los genotipos encontrados en el presente estudio con la finalidad de probarlos en la búsqueda de germoplasma con tolerancia a CLas para establecer un programa de mejoramiento, inicialmente en cítricos agrios, como estrategia primordial en el manejo del HLB, aunado al manejo del insecto vector y la utilización de planta certificada en el establecimiento de nuevas plantaciones. Además, sería interesante investigar las poblaciones de

CLas de los principales países productores de cítricos tales como China, Brasil, EUA y México; que permita comprender la diversidad evolutiva de CLas, su estructura genética, así como el impacto epidemiológico de la bacteria. Otra investigación de gran relevancia que afecta las poblaciones de CLas es la tasa de evolución de los loci genómicos CLIBASIA_01645 y adenosina deaminasas.

CONCLUSIONES

En la población mexicana de CLas se encontraron tres haplotipos, HA, HB y HC. En las subpoblaciones del Occidente y Noroeste predominó el haplotipo HB, mientras en la del Sureste se encontró una ligera predominancia del haplotipo HC. El haplotipo HA se encontró con baja prevalencia en toda la población. Este es el primer estudio de variaciones genéticas en la población mexicana de CLas por doble-locus genómico con repeticiones cortas en tándem, además, es el primer reporte del haplotipo HC en las regiones cítricas en México.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento otorgado con el proyecto SIP 2016-4826. Ahumada Rodríguez agradece al CONACYT y al IPN por su beca de estudios de posgrado.

LITERATURA CITADA

- Arratia-Castro AA, Santos-Cervantes ME, Fernández-Herrera E, Chávez-Medina JA, Flores-Zamora GL, Camacho-Beltrán E, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE. 2014. Occurrence of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection* 62:144-151. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>
- Bastianel C, Garnier-Semancik M, Renaudin J, Bové JM and Eveillard S. 2005. Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” based on the omp gene sequence. *Applied and Environmental Microbiology* 71(11):6473-6478. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6473-6478.2005>
- Botstein D, White RL, Skolnick M and Davis RW. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32(3):314-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1686077>
- Chen J, Deng X, Sun X, Jones D, Irey M and Civerolo E. 2010. Guangdong and Florida populations of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ distinguished by a genomic locus with short tandem repeats. *Phytopathology* 100(6):567-72. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-6-0567>
- 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 Huanglongbing (yellow shoot disease) symptoms in Guangdong, P. R. China. *Phytopathology* 99(3):236-242. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0236>
- da Graça JV, Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G and Zhao H. 2016. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world’s citrus. *Journal of Integrative Plant Biology* 58(4): 373-87. <https://doi.org/10.1111/jipb.12437>
- da Silva PA, Fassini CG, Sampaio LS, Dequigiovanni G, Zucchi MI and Wulff NA. 2019. Genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by short tandem repeats and prophage typing indicates population homogeneity in Brazil. *Phytopathology* 109:960-971. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0295-R>
- Deng X, Lopes S, Wang X Sun X, Jones D, Irey M, Civerolo E and Chen J. 2014. Characterization of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” populations by double-locus analyses. *Current Microbiology* 69:554-560. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0621-9>
- Díaz-Padilla G, López-Arroyo JI, Quijano-Carranza JA, Mora-Aguilera G, Guajardo-Panes RA and Sánchez-Cohen I. 2014. Áreas de abundancia potencial en México del vector del Huanglongbing, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5(7):1137-1153. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263131533001>
- Duan Y, Zhou L, Hall DG, Li W, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun Y and Gottwald T. 2009. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(8):1011-20. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>
- FAO, 2020. Base de datos FAOSTAT, Datos sobre alimentación y agricultura. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QI>. Fecha de consulta: agosto 2022
- Flores-Sánchez JL, Mora-Aguilera G, Loeza-Kuk E, López-Arroyo JI, Gutiérrez-Espinosa MA, Velázquez-Monreal JJ, Domínguez-Monge S, Bassanezi RB, Acevedo-Sánchez A

- and Robles-García P. 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(7):1119-1127. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0418-RE>
- Gétaz M, Krijger M, Rezzonico F, Smits THM, van der Wolf JM and Pothier JF. 2018. Genome-based population structure analysis of the strawberry plant pathogen *Xanthomonas fragariae* reveals two distinct groups that evolved independently before its species description. *Microbial genomics* 4(7): e000189. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000189>
- Ghosh DK, Bhose S, Motghare M, Warghane A, Mukherjee K, Ghosh DK Sr, Sharma AK, Ladaniya MS and Gowda S. 2015. Genetic Diversity of the Indian Populations of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Based on the Tandem Repeat Variability in a Genomic Locus. *Phytopathology* 105(8):1043-9. <https://doi.org/10.1094/PHTO-09-14-0253-R>
- Hocquellet A, Toorawa P, Bove JM and Garnier M. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus liberibacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon. *Molecular and cellular probes* 13(5):373-379. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1999.0263>
- Islam MS, Glynn JM, Bai Y, Duan YP, Coletta-Filho HD, Kuruba G, Civerolo EL and Lin H. 2012. Multilocus microsatellite analysis of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus Huanglongbing worldwide. *BMC Microbiology* 12:39. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-39>
- Katoh H, Inoue H and Iwanami T. 2015. Changes in Variable Number of Tandem Repeats in ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ through Insect Transmission. *PLoS One* 10(9):e0138699. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138699>
- Katoh H, Miyata S, Inoue H and Iwanami T. 2014. Unique features of a Japanese ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strain revealed by whole genome sequencing. *PLoS One* 2;9(9): e106109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106109>
- Katoh H, Subandiyah S, Tomimura K, Okuda M, Su HJ and Iwanami T. 2011. Differentiation of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” isolates by variable-number tandem-repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5): 1910-1917. <https://doi.org/10.1128/AEM.01571-10>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lin H, Han CS, Liu B, Lou B, Bai X, Deng C, Civerolo EL and Gupta G. 2013. Complete genome sequence of a Chinese strain of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Genome announcements* 1(2): e00184-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00184-13>
- Lou B, Bai X, Bai Y, Deng C, RoyChowdhury M, Chen C and Song Y. 2014. Detection and molecular characterization of a 16SrII-A* phytoplasma in grapefruit (*Citrus paradisi*) with Huanglongbing-like symptoms in China. *Journal of Phytopathology* 162(6): 387-395. <https://doi.org/10.1111/jph.12200>
- Ma W, Liang M, Guan L, Xu M, Wen X, Deng X and Chen J. 2014. Population structures of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in Southern China. *Phytopathology* 104(2): 158-62. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-13-0110-R>
- Matos LA, Hilf ME, Chen J and Folimonova SY. 2013. Validation of ‘variable number of tandem repeat’-based approach for examination of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ diversity and its applications for the analysis of the pathogen populations in the areas of recent introduction. *PLoS One* 8(11): e78994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078994>
- Mora-Aguilera G, Acevedo-Sánchez G, Guzmán-Hernández E, Flores-Colorado E, Martínez-Bustamente V, Coria-Contreras J, Robles-García P. and López-Buenfil, A. 2019. El HLB de los cítricos en México: Epidemiología, Manejo e Impactos Productivos. *Revista industrial y agrícola de Tucumán* 96(1)Suplemento: 25-210. <http://www.scielo.org.ar/pdf/riat/v96n1/v96n1a09.pdf>
- Mora-Aguilera G, Robles-García P, López-Arroyo JI, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutierrez-Espinosa A, Loeza-Kuk E and González-Gómez R. 2014. Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista mexicana de fitopatología* 32(2): 108-119. https://rmf.smf.org.mx/Vol3222014/AR/32-2_03.pdf
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106(949): 283-292. doi.org/10.1086/282771
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MÁ, Velázquez-Monreal JJ and Carrillo-Medrano SH. (2017). Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón mexicano en Colima, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(5): 1101-1111. <https://www.redalyc.org/pdf/2631/263152411008.pdf> Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2018. Vigilancia del huanglongbing. <https://prod.senasica.gob.mx/SIRVEF/HLBV2.aspx>. Fecha de consulta: agosto de 2022
- Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulff NA, Eveillard-Jagoueix S, Yamamoto PT, Ayres AJ and Bové JM. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus Liberibacter americanus*, agent of Huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22(3): 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.12.006>

- Tomimura K, Furuya N, Miyata SI, Hamashima A, Torigoe H, Murayama Y, Kawano S, Okuda M, Subandiyah S, Su HJ and Iwanami T. 2010. Distribution of two distinct genotypes of citrus greening organism in the Ryukyu Islands of Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly* 44(2): 151-158. <https://doi.org/10.6090/jarq.44.151>
- Trujillo AJ. 2010. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Oficio B00.01, 01,01.03.-02788. Circular No. 056. 16 de abril de 2010. <https://cofemersimir.gob.mx/expediente/9106/mir/35008/archivo/745812>
- Tyler HL, Roesch LFW, Gowda S, Dawson WO and Triplett EW. 2009. Confirmation of the sequence of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ and assessment of microbial diversity in Huanglongbing-infected citrus phloem using a metagenomic approach. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 22(12):1624-1634. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1624>
- van Belkum A, Scherer S, van Alphen L and Verbrugh H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(2):275-93. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.275-293.1998>
- Wulff NA, Fassini CG, Marques VV, Martins EC, Coletti DAB, Teixeira DDC, Sanches MM and Bové JM. 2019. Molecular Characterization and Detection of 16SrIII Group Phytoplasma Associated with Huanglongbing Symptoms. *Phytopathology* 109(3):366-374. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-18-0081-R>
- Wulff NA, Zhang S, Setubal JC, Almeida NF, Martins EC, Harakava R, Kumar D, Rangel LT, Foissac X, Bové JM and Gabriel DW. 2014. The complete genome sequence of ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’, associated with Citrus Huanglongbing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27(2):163-76. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0292-R>
- Zhang S, Flores-Cruz Z, Zhou L, Kang BH, Fleites LA, Gooch MD, Wulff NA, Davis MJ, Duan YP and Gabriel DW. 2011. ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’ carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 24(4):458-68. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-10-0256>
- Zhang YP, Uyemoto JK and Kirkpatrick BC. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71(1):45-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)
- Zheng Z, Bao M, Wu F, Chen J, and Deng X. 2016. Predominance of single prophage carrying a CRISPR/cas system in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains in southern China. *PLoS One* 11: e0146422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146422>
- Zheng Z, Bao M, Wu F, Van Horn C, Chen J and Deng X. 2018. A Type 3 Prophage of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ Carrying a Restriction-Modification System. *Phytopathology*. 108(4):454-461. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-17-0282-R>
- Zheng Z, Deng X and Chen J. 2014. Whole-Genome Sequence of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” from Guangdong, China. *Genome announcements* 2(2): e00273-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00273-14>
- Zhou L, Powell CA, Hoffman MT, Li W, Fan G, Liu B, ... and Duan, Y. 2011. Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats. *Applied and Environmental Microbiology* 77(18): 6663-667. <https://doi.org/10.1128/AEM.05111-11>