

REVISTA MEXICANA DE FITOPATOLOGÍA

MEXICAN JOURNAL OF PHYTOPATHOLOGY

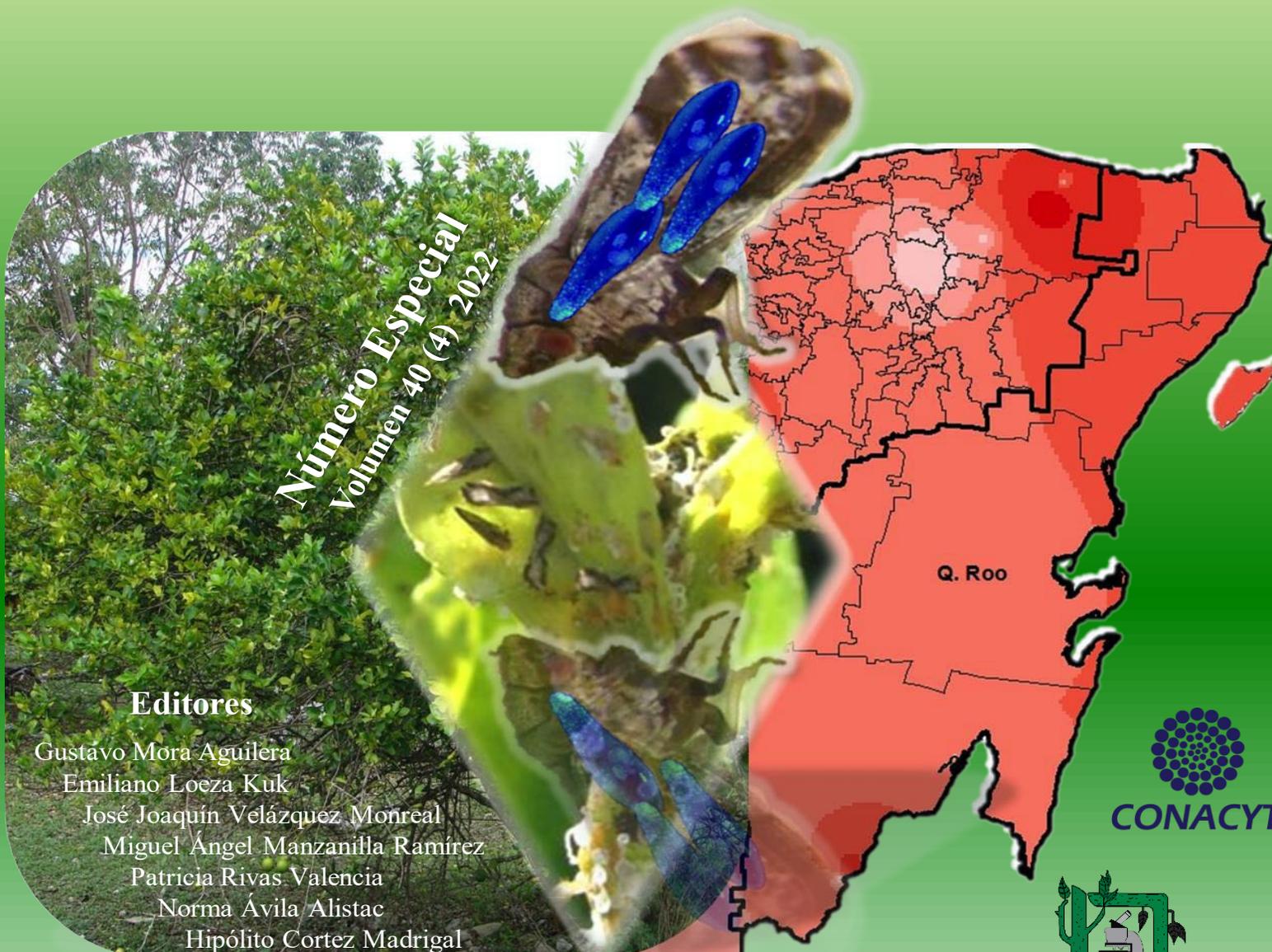
Fully Bilingual

HLB DE LOS CÍTRICOS: EL PATÓGENO, EPIDEMIOLOGÍA Y MANEJO

*Número Especial
Volumen 40 (4) 2022*

Editores

Gustavo Mora Aguilera
Emiliano Loeza Kuk
José Joaquín Velázquez Monreal
Miguel Ángel Manzanilla Ramírez
Patricia Rivas Valencia
Norma Ávila Alistac
Hipólito Cortez Madrigal



Differentiation of the Mexican population of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by double-locus genomic with short tandem repeats

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

Received: August 28, 2022.

Accepted: November 07, 2022.

Ahumada-Rodríguez JS, Cervantes-Santos JA, Rivera-Villanueva B, Leyva-López NE, Sandoval-Castro E, Méndez-Lozano J, Santos-Cervantes ME and Velázquez-Monreal JJ. 2022. Differentiation of the Mexican population of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by double-locus genomic with short tandem repeats. Mexican Journal of Phytopathology 40(4): 150-161.

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 el segundo en el locus adenosina deaminasas. La distribución de los TRNs en la población Mexicana de CLAs en ambos loci mostraron variaciones con las poblaciones de 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 sitúa a México en el 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 nacional está siendo seriamente afectada por la enfermedad considerada más destructiva de los cítricos en el mundo llamada Huanglongbing (HLB) (da Graça *et al.*, 2016). El HLB en México se detectó por primera vez en el Municipio de Tizimín, Yucatan 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 las técnicas de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), a partir de la estimación del tamaño de los productos de PCR, análisis de secuencias de genes amplificados por PCR, caracterización de fragmentos de restricción de longitud polimorfa (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 CLas, tanto del tejido infectado como del insecto vector, *D. citri* (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; Lin *et al.*, 2015; 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. El objetivo del presente estudio fue realizar un estudio de diferenciación estructural de las subpoblaciones de CLas del Noroeste, Occidente, Centro y Sureste 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, con los estados de Sinaloa y Baja California Sur; Occidente, con Colima, Jalisco, Michoacán y Nayarit; Centro, con Estado de México y Morelos; y la Sureste, con Oaxaca, Veracruz Yucatán y Quintana Roo. El número de muestras por especie de cítrico 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 de 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%, con algunas modificaciones (Zhang *et al.*, 1998). Para la extracción de cada muestra se utilizaron 20 mg de tejido de cítrico liofilizado. A cada muestra se adicionó 800 µL del buffer CTAB al 3% (0.2% β-mercaptoetanol, pH 8, 100 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl) precalentado a 60°C. Posteriormente se in-

cubaron a una temperatura de 60 °C por 30 min en un baño de agua de 10L (PolyScience WD10A11B, USA) y se le adicionó a cada muestra 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), estas se agitaron por inversión varias veces. Las muestras se centrifugaron a 13 mil rpm por 10 min en una centrifuga de mesa (Thermo Scientific Sorvall Legend Serie Micro 17, USA) y posteriormente se realizó la recuperación del sobrenadante. Después se adicionaron 15 µL de la enzima RNAsa (100 µg/µL) y se incubó por 20 min a 37°C. Posteriormente se le adicionaron 600 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), esta se agitó por inversión varias veces y después se centrifugó a 13 mil rpm durante 10 min. Se realizó la recuperación del sobrenadante y se precipitó el ADN con 600 µL de isopropanol (-20 °C) al 100%. Posteriormente se centrifugó por 10 min a 13 mil rpm y se eliminó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 1000 µL de etanol al 70% y esta se centrifugó por 4 min a 13 mil rpm. Finalmente se dejó secar la pastilla que contenía el ADN y esta se resuspendió en 30 µL de agua bides-tilada estéril. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C para su análisis posterior.

Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

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 µL, conteniendo 1X de buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Brasil), 0.2 pmol de cada primer y 100 ng de ADN genómico total. Las mezclas de PCR se in-

cubaron 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.

Variación de la población Mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

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 ADN 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 AGACA-CA 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).

Cuadro 1. 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	gacattcaacggtatcgac	AGACACA	0.6379	Cheng <i>et al.</i> , 2010
LapGP-1r	gcgacataatctcaactcctt			
LasSSR-A-f	cgcctacaggaattcggttacg	TACAGAA	0.8247	Islam <i>et al.</i> , 2012
LasSSR-A-r	gacattcaacggtatcgac			

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; 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.

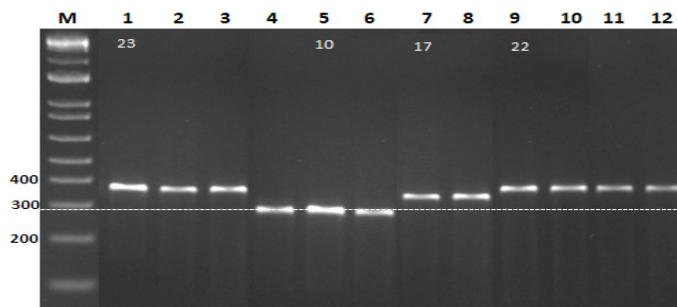


Figura 1. Genotipificación de cepas representativas de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ de regiones productoras de cítricos utilizando los iniciadores LasSSR-A-f/LasSSR-A-r que amplifican el locus adenosina deaminasas (STR TACAGAA). Carril M: Marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen Life 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.

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).

RESULTADOS

Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

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, obteniéndose el fragmento esperado de 703 pb (Datos no mostrados) (Hocquelllet *et al.*, 1999).

Variación de la población Mexicana de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

Para realizar el análisis de variación de la población Mexicana de CLas se seleccionaron 87 muestras 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 1), por lo que ambos marcadores se consideran informativos 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 (97.7%) muestras con simple amplicón (SA) y dos muestras con múltiple amplicón (MA) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución del número de repeticiones tándem (TRN) de único amplicón (SA) y múltiple amplicón (MA) en dos loci STR en la población mexicana de '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'.

Población	SA TRN AGACACA													Total	MA ^z	Total	
	5	8	9	10	12	13	14	15	16	17	19	22	23				24
Noroeste		1			2		16	1			1				21		21
Occidente						12	27	12							51	1	52
Centro							2								2	1	3
Sureste	3						6	1			1				11		11
Total	3	1			2	12	51	14			2			85	2	87	

Población	TRN TACAGAA													Total	MA ^z	Total	
	5	8	9	10	12	13	14	15	16	17	19	22	23				24
Noroeste			1	2			3			2		4		4	16	5(5)	21
Occidente			1	6	2		1		2	9		16	2	12	51	1(1)	52
Centro							2					1			3		3
Sureste	3	2	3									3			11		11
Total	3	4	11	2			6		2	11		24	2	16	81	6	87

^zLos números entre paréntesis en las muestras con múltiple amplicon fueron seleccionadas para secuenciación.

Mientras que, para el marcador TACAGAA amplificaron 81 (93.1%) muestras SA y en seis muestras se observaron de 2 a 3 amplicones (Cuadro 2). Con el marcador AGACACA los TRN con SA fueron de 5, 8, 12, 13, 14, 15 y 19 repeticiones, predominando en orden de mayor a menor repeticiones el de 14, 15 y 13 con el 90.5% de las muestras, correspondiente al total de las muestras de Occidente. 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%). Los TRN 8 y 9 se encontraron solo en la región Noroeste, aunque también en pocas muestras (1.1% y 2.3%, respectivamente). 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 citricolas (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 tres 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 2).

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 3), predominando el haplotipo B (HB) en todas las regiones citricolas con el 72.9% de las muestras, seguido por el haplotipo C (HC) encontrado en las regiones citricolas Noroeste, Occidente y Sureste con el 20.8% de las muestras y el haplotipo A (HA) se encontró con baja presencia en el Noroeste (1.1%), Occidente (1.1%) y Sureste (3.3%) (Cuadro 3).

El número de alelos de CLas de las regiones citricolas por cada marcador varió entre dos y once

(Cuadro 4). 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 4). Las cepas de CLas de la región Noroeste mostraron el mayor número de alelos (media de ocho alelos por marcador), 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 4). La diversidad genética de las cepas de CLas de las regiones citricolas mexicanas varió de 0.375 a 0.862 por marcador (Cuadro 4). La mayor variabilidad genética se obtuvo con el marcador TACAGAA en la región Noroeste (0.862), seguida por Occidente (0.797), Sureste (0.744) y Centro (0.375). Sin embargo, al tomar en cuenta la media de la diversidad genética de 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 (0.744) mostraron la mayor diversidad genética, seguida por la región Occidente (0.717), Noroeste (0.702) y Centro (0.375) (Cuadro 4).

DISCUSIÓN

Se describe la variación entre la población Mexicana de CLas asociada a la enfermedad más importante de los cítricos en la última década en el país, llamada Huanglongbing. Los resultados de distribución de los TRNs en la población Mexicana de CLas en el locus CLIBASIA_0164 y el locus adenosina deaminasas mostraron variaciones con

Cuadro 3. 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 4. Diversidad genética de la población Mexicana de ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ descrita mediante el número de alelos y el índice de diversidad de Nei (H) con base al análisis del número de repeticiones en tándem (TRN) por doble locus genómico.

Población	Número de Alelos			H		
	AGACACA	TACAGAA	Media	AGACACA	TACAGAA	Media
Noroeste	5	11	8	0.541	0.862	0.702
Occidente	4	9	6.5	0.638	0.797	0.717
Centro	2	2	2	0.375	0.375	0.375
Sureste	5	4	4.5	0.744	0.744	0.744
Total	9	12	5.25	0.574	0.694	0.634

las poblaciones de Florida, China y Brasil. En la población Mexicana de CLas analizada en este estudio, con el marcador STR AGACACA, predominó el TRN 14, mientras que, en las poblaciones de Florida, China y Brasil predominaron los TRNs 5, 7 y 15, respectivamente (Chen *et al.*, 2010; Matos *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014; da Silva *et al.*, 2019). Con el marcador STR TACAGAA en la población Mexicana de CLas predominó el TRN 22, mientras en las poblaciones de Florida, China y Brasil predominaron los TRNs 16, 26 y 18, respectivamente (Matos *et al.*, 2013).

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). Por otro lado, podría ser que los haplotipos HA y HB se introdujeron a la Península de Yucatán desde Florida y se hayan dispersado a las regiones cítricas productoras de México y debido a la importancia en cuanto a superficie establecida y producción de cítricos en el país, poblaciones altas del insecto vector, alta incidencia de árboles infectados y condiciones climatológicas favorables haya ocasionado variaciones genéticas y la aparición de un nuevo haplotipo de la bacteria en la población Mexicana. Además, otro resultado interesante es que las subpoblaciones del Occidente y Noroeste son diferentes a la del Sureste, ya que, el haplotipo HB fue el que predominó en estas subpoblaciones. La diferencia entre subpoblaciones podría estar asociado al impacto o intensidad de la enfermedad HLB, ya que la región de Occidente, en el pacífico mexicano es considerada de alta intensidad y la región de la Península de Yucatán de baja intensidad (Mora-Aguilera *et al.*, 2014). Sería interesante investigar en un futuro las poblaciones de CLas de los principales países productores de cítricos tales como China, Brasil, EUA y México que permita comprender la diversidad evolutiva, 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, Zucchini 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
- 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/PHYTO-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>
- 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>
- Lin H, Islam MS, Cabrera-La Rosa JC, Civerolo EL and Groves RL. 2015. Population structure of *Xylella fastidiosa* associated with almond leaf scorch disease in the San Joaquin Valley of California. *Phytopathology* 105(6):825-32. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0254-R>
- 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/PHYTO-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, Robles-García P, López-Arroyo JI, Flores-Sánchez J, Acevedo-Sánchez G, Domínguez-Monge S, Gutiérrez-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
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2018. Vigilancia del huanglongbing. Disponible en: <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, Goch 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. doi: <https://doi.org/10.1094/PHTO-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>.