

Detección molecular de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) en el norte de Tamaulipas, México

Detecção molecular de *Candidatus Liberibacter asiaticus* em laranja azeveda (*Citrus aurantium* L.) no norte de Tamaulipas, México

DOI: 10.34188/bjaerv6n1-066

Recebimento dos originais: 20/12/2022

Aceitação para publicação: 02/01/2023

María Genoveva Álvarez Ojeda

Dr. en Microbiología por la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. INIFAP-Campo Experimental Río Bravo. Km 61, Carretera Matamoros-Reynosa. CP. 88900, Río Bravo, Tamaulipas, México. Tel: 01 55 38 71 8700. Ext. 83210
Correo electrónico: alvarez.genoveva@inifap.gob.mx

Cynthia Guadalupe Rodríguez Quibrera

M.C. en Biotecnología Genómica por el Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica. INIFAP-Campo Experimental Ixtacuaco. Km 4.5, Carretera Martínez de la Torre-Tlapacoyan. C.P. 93655, Martínez de la Torre, Veracruz, México
Correo electrónico: rodriguez.cynthia@inifap.gob.mx

Roberto Omar Castañeda Arreola

M.C. en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural por la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. INIFAP-Sitio Experimental Pichucalco-Campo Experimental Huimanguillo. Km 8, Carretera Federal Pichucalco, C.P. 29520, Pichucalco, Chiapas, México
Correo electrónico: castaneda.roberto@inifap.gob.mx

Isidro Humberto Almeyda León

Dr. en Biotecnología por la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. INIFAP-Campo Experimental General Terán. Km 31, Carretera Montemorelos-China, Ex-hacienda Las Anacuas, C.P. 67400, Cd. General Terán, Nuevo León, México. Tel: 01 55 38 71 8700. Ext. 83615
Correo electrónico: almeyda.isidro@inifap.gob.mx

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB), es una de las enfermedades más devastadoras de los cítricos a nivel mundial, el agente causal es una bacteria del género *Candidatus Liberibacter spp.*, y afecta a todas las especies de cítricos, especialmente los cítricos agrios. Actualmente se han confirmado tres especies de la bacteria: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* y *Ca. L. africanus*. Esta bacteria es transmitida por dos insectos vectores: *Diaphorina citri* (América y Asia) y *Trioza erytrae* (África), lo que favorece su rápida y eficaz diseminación, ocasionando cuantiosas pérdidas económicas, así como problemas sociales y ambientales. En este trabajo se realizó la optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final y Tiempo Real (PCR punto final y PCR-TR) para la detección de HLB en naranjo agrio en la zona norte del estado de Tamaulipas, México. Se procesaron 178 muestras (168 fueron de nervadura central de la hoja, ocho de raíz y dos muestras del vector). Mediante PCR punto final se detectó a la bacteria a partir del DNA extraído de hoja, pero no se detectó en el DNA extraído a partir de raíz y del vector. Mediante la PCR-TR se detectó a la bacteria a partir del ADN extraído de hoja y raíz de naranjo agrio y del insecto vector. Estos

resultados demuestran que la PCR-TR es más eficiente que la PCR punto final para la detección de la bacteria en diferentes tejidos de la planta de naranjo agrio y en el insecto vector.

Palabras clave: HLB, RT-PCR, cítricos.

RESUMO

Huanglongbing (HLB) é uma das doenças mais devastadoras dos citros em todo o mundo, o agente causal é uma bactéria do gênero *Candidatus Liberibacter* spp., e afeta todas as espécies cítricas, principalmente os citros azedos. Atualmente, três espécies da bactéria foram confirmadas: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* e *Ca. L. africanus*. Essa bactéria é transmitida por dois insetos vetores: *Diaphorina citri* (América e Ásia) e *Trioza erytrae* (África), o que favorece sua disseminação rápida e eficaz, causando perdas econômicas consideráveis, além de problemas sociais e ambientais. Neste trabalho, foi realizada a otimização do endpoint e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (endpoint PCR e RT-PCR) para a detecção de HLB em laranja azeda na zona norte do estado de Tamaulipas, México. Foram processadas 178 amostras (168 da nervura central da folha, oito da raiz e duas do vetor). Usando o endpoint PCR, a bactéria foi detectada no DNA extraído da folha, mas não foi detectada no DNA extraído da raiz e do vetor. Por meio de RT-PCR, a bactéria foi detectada a partir do DNA extraído da folha e raiz da laranjeira azeda e do inseto vetor. Esses resultados demonstram que o RT-PCR é mais eficiente que o endpoint PCR para a detecção da bactéria em diferentes tecidos da planta de laranjeira azeda e no inseto vetor.

Palavras-chave: HLB, RT-PCR, citros.

1 INTRODUCCIÓN

En México el Huanglongbing (HLB), también conocido como “enverdecimiento de los cítricos” o “dragón amarillo” fue reportada por primera vez en el 2009 en el estado de Yucatán (Esquivel *et al*, 2012). El HLB, es una de las enfermedades más devastadora que afecta a los cítricos a nivel mundial (Collazo-Cordero *et al*, 2011), debido a los daños que ocasiona, su rápida diseminación, así como por su difícil y tardío diagnóstico. El HLB es causado por una alfa-proteobacteria gram negativa no cultivable in vitro y está restringida al floema vascular de la planta, causando improductividad y eventualmente su muerte. (Robles *et al*, 2013). Actualmente se conocen tres especies de esta bacteria: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* y *Ca. L. africanus* (Teixeira *et al*, 2005), la forma principal de dispersión de la bacteria es por medio de dos insectos vectores: *Trioza erytrae* en África y *Diaphorina citri* en Asia y América (Hall *et al*, 2008). La sintomatología inicial que presentan las plantas afectadas es: clorosis difusa en tejido y follaje, moteado asimétrico difuso, brotes de hojas amarillas, defoliación y engrosamiento de la nervadura debido a que el patógeno se disemina a través del floema vascular de la planta provocando oclusión en la nervadura central de las hojas, tallo, raíz, corteza y fruto (Robles *et al*, 2013). Estos síntomas en las plantas no son propios y exclusivos de la enfermedad, por lo que en etapas tempranas fácilmente pueden llegar a confundirse con una deficiencia de minerales. (Collazo-Cordero *et al*, 2011).

El primer reporte del HLB en América fue en 2004 en Araraquara, Brasil (Bové y Ayres, 2007), en el 2005 se reportó en el estado de Florida, Estados Unidos; en México el primer reporte fue en 2009 en el estado de Yucatán, extendiéndose hacia los estados de Colima, Jalisco, Nayarit y Quintana Roo (FAO, 2013). El HLB afecta a todas las especies comerciales de cítricos y a otras especies de la familia Rutaceae a nivel mundial (da Graca, 2008). En México, las plantaciones más afectadas y por tener mayor prevalencia se encuentran los cítricos agrios, como el limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y el limón persa (*Citrus latifolia*) (Esquivel *et al*, 2012; FAO, 2013). Actualmente se ha detectado en 391 municipios de 22 entidades de México, de los cuales, 314 son considerados citrícolas, lo que representa una producción de 6.7 millones de toneladas anuales, con un valor de \$8,050 millones de pesos (SIAP, 2014). En el estado de Tamaulipas se cuenta aproximadamente con 39,027 hectáreas de cítricos, lo que representa el 6.9 % de la superficie total nacional, de donde se obtienen 739 mil toneladas de fruta, generando 1,486 millones de pesos anuales (SIAP, 2014). Recientemente el HLB se ha detectado en los municipios de Bustamante, Victoria, Tula, Madero, Xicoténcatl, Jaumave, Padilla y Palmillas (SENASICA, 2016). Debido a que los cítricos son de gran importancia y demanda en nuestro país, esta enfermedad representa una amenaza seria, ya que no existe cura, trayendo consecuencias negativas de gran impacto en los sectores social, económico y ambiental. La detección de la presencia de la bacteria es mediante técnicas moleculares, debido a su alta especificidad y sensibilidad (Okuda *et al*, 2005). El objetivo de este trabajo fue detectar a la bacteria a partir del ADN extraído de diferentes tejidos de naranjo agrio y del vector mediante PCR-TR y PCR punto final, y realizar su identificación molecular.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo y colecta de muestras. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental de Río Bravo, Tamaulipas, Km 61 Carretera Matamoros-Reynosa, C.P. 88900, Cd. Río Bravo, localizado en las coordenadas (25° 57' de latitud norte y 98° 01' de longitud oeste, a una media altura de 20 metros sobre el nivel del mar (msnm). La recolección de las muestras se realizó en el ciclo Invierno-primavera 2016-2017 en distintas localidades del norte de Tamaulipas (Valle Hermoso, Reynosa, Comales, Río Bravo y ejidos de la misma localidad como: la brecha 25, 28 y una huerta ubicada en la brecha 105). Las muestras de tejido vegetal (nervadura central de la hoja), fueron colectadas de árboles que presentaban sintomatología de HLB (Figura 1), las muestras de raíz, se colectaron de árboles que habían sido positivos a *Ca. L. asiaticus* a partir del ADN extraído de hoja. El vector *D. citri*, fue colectado directamente de los árboles que presentaban sintomatología de HLB.

Figura 1. Hojas de naranjo agrio con sintomatología de la enfermedad e insectos vectores colonizando las hojas.



En total se colectaron 178 muestras de las cuales: 176 muestras fueron de tejido vegetal de plantas de naranjo (168 de la nervadura central de la hoja y 8 muestras fueron de raíces absorbentes) de árboles de naranjo agrio con sintomatología de HLB (brotes cloróticos, moteado asimétrico difuso y engrosamiento de nervadura), dos muestras fueron del insecto vector. Las muestras eran colocadas en sobres identificados y transportados al Laboratorio de Biotecnología donde se almacenaban a 4 °C hasta su procesamiento.

Desinfección y lavado de muestras. El tejido vegetal (nervadura central hoja) y las raíces, fueron lavadas con agua destilada y jabón, después se enjuagó con agua destilada y por último se lavaron con agua tridestilada estéril, las raíces se desinfectaron con etanol al 70 %, posteriormente las muestras se colocaron en toallas secantes para su secado final a temperatura ambiente. Los insectos vectores colectados fueron colocados en tubos Eppendorf de 1.5 ml con etanol al 70 %, para ser preservados hasta su uso.

Extracción de ADN. La extracción se realizó por el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987), modificado por Almeyda, *et al.* (2001). Se pesaron 250 mg de cada muestra (nervadura central o raíz) y se maceraron en nitrógeno líquido, las muestras maceradas se colectaron en tubos Eppendorf de 2.0 ml y se le agregaban 750 ul de solución de extracción previamente calentada a 65 °C de 2 ME/CTAB (2 % p/v CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 1 % p/v polivinylpyrrolidona 40,000), con β -mercaptoetanol a una concentración final de 0.2 % y se incubaron durante 45 min a 65°C. Después se adicionó a las muestras un volumen igual de Sevag frío (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa de las muestras y se les agregó un volumen de Sevag frío y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente a la fase acuosa recuperada se le adicionó 0.5 volúmenes de acetato de amonio (7.5 M, pH 7.6), y

se dejaron incubando en hielo por 10 minutos y luego se centrifugaron a 14,000 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante se transfirió directamente a un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril. Para precipitar el ADN se le agregó 0.6 volúmenes de isopropanol y se dejaron incubando de 30 minutos a 18 horas a temperatura ambiente, después, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 minutos, y se decantó el sobrenadante. Las muestras se lavaron dos veces con etanol al 70 % frío, centrifugándose a 10,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, el precipitado fue recuperado en 50 µl de buffer TE-1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) estéril y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso.

Determinación de la cantidad y calidad de ADN. El ADN se cuantificó en un nanodrop (Genova Nano Spectrophotometer®) y se visualizó en geles de agarosa al 0.8 % para verificar su calidad.

Optimización de la PCR punto final. Para definir las temperaturas óptimas de amplificación con los iniciadores utilizados (OI1/OI2c), los cuales son específicos para *Ca. L. asiaticus* y *Ca. L. africanus* (Jagoueix *et al*, 1996), se realizaron reacciones de PCR con gradientes de temperatura.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR punto final). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: Buffer de PCR (1X), MgCl₂ (1.5mM), dNTPs (2.5 mM), iniciadores (25 pmoles), 1 unidad de MyTaq™ polimerasa (Bioline) y ADN (100 ng), el volumen total se completó agregando agua ultrapura estéril libre de nucleasas. En todas las corridas de PCR se utilizó un control positivo y un control negativo. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Bio Rad, Thermal Cycler), las condiciones se especifican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones de las PCR punto final en el termociclador.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	5 min	1
95° C	30 seg	
62° C	30 seg	35
72° C	1 min	
72° C	10 min	1
4° C	∞	1

Electroforesis en geles de agarosa. Los productos amplificados en las PCR punto final fueron fraccionados y separados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5 %, durante 90 minutos a 80 voltios. Los geles fueron analizados en un transiluminador (Bio Rad, UV Transiluminator 2000).

Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real (q-PCR). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo: Master Mix TaqMan® Environmental (2 unidades), iniciadores HLBas/COX (1µM c/u), sonda HLB/COX (10 µM) y ADN (100 ng), para obtener el volumen final se agregó agua ultrapura estéril libre de nucleasas. En todas las reacciones de PCR-TR se incluyó un control positivo, 2 controles negativos (ADN de plantas de cítricos sanas y agua sin ADN) y un control interno. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador StepOne™ Real time-PCR (Applied Biosystems), las condiciones se especifican en la Cuadro 2.

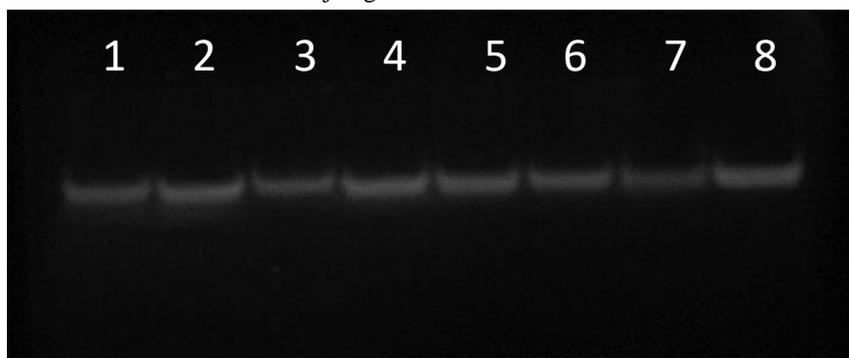
Cuadro 2. Condiciones de las PCR-TR en el termociclador.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	2min	1
95 °C	15 seg	40
58 °C	40 seg	
60 °C	1 min	1

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

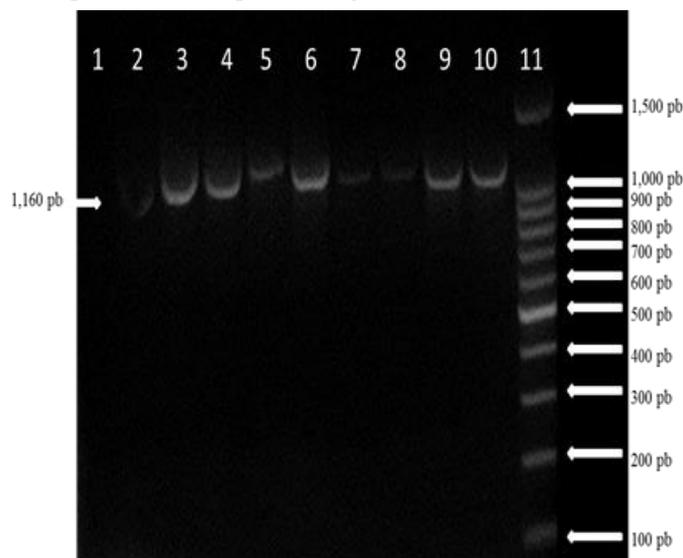
Extracción de ADN. La maceración de las muestras con nitrógeno líquido y la técnica de extracción por el método CTAB, fueron eficientes para obtener ADN de buena calidad (Figura 2) y cantidad suficiente para ser utilizado con éxito en las reacciones de PCR punto final y PCR-TR).

Figura 2. ADN extraído a partir de muestras de tejido vegetal (nervadura central) de diferentes especies de cítricos. Carril 1: Árbol de naranjo agrío; Carril 2: Árbol de limón; Carriles 3-4: Árboles de naranjo agrío; Carriles 5-6: Árboles de naranjo dulce; Carriles 7-8: Árboles de naranjo agrío.



Estandarización de la PCR punto final. Para definir la temperatura óptima de alineamiento con los oligonucleotidos utilizados se realizaron reacciones de PCR con gradiente de temperatura y se determinó que la mejor temperatura fue de 62 °C, amplificándose un fragmento de 1160 pb (Figura 3), el cual, es el tamaño esperado para *Ca. L. asiaticus* de acuerdo a la región donde fueron diseñados los iniciadores empleados (Jagoueix *et al*, 1996).

Figura 3. Fragmentos amplificados por PCR utilizando los iniciadores OI1 y OI2c y ADN de diferentes especies de cítricos. Carril 1: Control negativo; Carriles 2-3: Árboles de naranjo agrío; Carriles 4-5: Árboles de naranjo dulce; Carriles 6-7: Árboles de naranja agría; Carril 8: Árbol de limón; Carril 9: Árbol de naranjo agrío; Carril 10: Control positivo; Carril 11: Marcador de peso 100-1000 pb (Promega)



Resultados obtenidos con las técnicas de PCR punto final y PCR-TR: De las 178 muestras procesadas solo se logró la amplificación en 20 muestras (11.23 %) mediante la técnica de PCR punto final. Las muestras positivas fue ADN extraído de nervaduras de las hojas, no se obtuvo amplificación con el ADN extraído de muestras de raíz y del vector. Mediante la técnica de PCR-TR se obtuvo un 100 % de amplificación a partir del ADN extraído de plantas con síntomas de HLB (tanto de hojas como de raíz), superando ampliamente el porcentaje obtenido con la técnica de PCR punto final. En el cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos con las dos técnicas a partir del ADN extraído de raíz. Los resultados obtenidos confirman la presencia del Huanglongbing en el norte del estado de Tamaulipas, lo cual debe servir de base para establecer y/o incrementar las estrategias para el manejo del insecto vector y de la enfermedad misma.

Cuadro3. Comparación de resultados obtenidos en la detección de *Ca. L. asiaticus* mediante PCR punto final y PCR-TR.

Especie	Tejido	PCR punto final	PCR-TR
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de limón	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo dulce	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo dulce	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)
Árbol de naranjo agrío	Raíz	(-)	(+)

4 CONCLUSIONES

Se confirmó la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en la región norte del estado de Tamaulipas y la técnica más eficiente para detectar a la bacteria en muestras vegetales fue PCR en Tiempo Real.

REFERENCIAS

- Almeyda, L. I. H., Rocha, P. M. A., Piña, R. J. y Martínez, S. J. P., 2001. The use of polymerase chain reaction molecular hybridization for detection of phytoplasmas in different plant species in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19(1): 1-9.
- Bové J. M. and Ayres, A. J. 2007. Etiology of tree recent diseases of citrus in Sao Paulo: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life*. 59: 346-354.
- Collazo-Cordero, C.; Núñez-Luis, J. Y., Luis-Pantoja, M. and Llauger-Riverón, R. 2011. Optimización de una reacción en cadena de la polimerasa anidada para el diagnóstico de la enfermedad ``huanglongbing`` de los cítricos. *Revista Citri Frut*, vol. 28(2): 19-30.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Da Graca J. V. 2008. Biology, history and world Status of huanglongbing. En: *Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psilido asiático de los Cítricos*. Hermosillo, Sonora. Págs:60-68.
- Esquivel-Chávez, F., Valdovinos-Ponce, G., Mora-Aguilera, G., Gómez-Jaime, R., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Flores-Sánchez, J. L., y Arroyo-López, J. I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* 46(8): 769-782.
- FAO. 2013. Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. Santiago de Chile, 76 p.
- Hall, D. G., Hentz, M. G. and Adair, R. C. 2008. Population Ecology and Pheonology of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae) in two Florida Citrus Groves. *Environmental Entomology* 37(4): 914-924.
- Jagoueix, S., Bové, J. M., and Garnier M. 1996. PCR detection of the two “*Candidatus*” liberibacter species associated with greening disease of citrus. *Mol. Cell. Probes*, 10: 43-50.
- Okuda, M., Matsumoto, M. and Tanaka, Y., 2005. Characterization of the tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB Gene cluster of the citrus greening organism and detection by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease*, 89(7). 705-711.
- Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A., Orozco-Santos, M., Medina-Urrutia, V. M., López-Arroyo, J. I. y Virgen, R. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19(1): 15-31.
- SIAP (Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2014. Ficha Técnica. <http://www.siafeson.com>. SENASICA, 2016. Informe de acciones operativas. (senasica.gob.mx/id=4608). (Consultado el 10 de julio 2016).
- SENASICA. 2016. Informe de acciones operativas. <http://www.siafeson.com>. SENASICA. (senasica.gob.md.mx/id=4608). (Consultado el 10 de julio de 2016).
- Teixeira, D. C., Danet, J. L., Eveillard, S., Martins, E. C., de Jesus, W. C. J. R., Yamamoto, P. T.,

Lopes, S. A., Bassanezi, R. B., Ayres, A. J., Saillard, C. and Bové, J. M. 2005. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the ``*Candidatus*'' Liberibacter species associated with the disease. *Molecular and Cellular Probes* 19(3): 17-179.