

***Candidatus Liberibacter asiaticus* en citricultivos**

Baza Bermúdez Nicolle Esther

CC. 1.192.763.377

Código estudiantil: 201812493595

Correo: nicolle.baza@unisimon.edu.co

Escobar Díaz Jessica María

CC. 1.010.146.354

Código estudiantil:

Correo: jessica.escobar@unisimon.edu.co

Herrera Yepes Andrés Elías

CC. 1.005.605.885

Código estudiantil: 201812293167

Correo: andres.herrera@unisimon.edu.co

Trabajo de Investigación del Programa de Microbiología

Tutor:

Aranguren Díaz Yani Cristina

Cotutor:

Machado Sierra Elwi Guillermo

RESUMEN

Introducción

Los frutos cítricos desempeñan un papel importante en la alimentación de millones de personas a nivel mundial, ya que son cultivos permanentes y poseen alta adaptabilidad a diversas condiciones climáticas, lo que facilita su alta propagación a lo largo y ancho del mundo. Existen numerosas enfermedades que afectan a los cítricos, de origen viral, fúngica, bacteriana o parasitaria.

Materiales y método

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLas) es una bacteria Gram negativa que tiene la capacidad de alojarse en los tubos del tamiz del floema, lo que le permite moverse por toda la planta, para ubicarse en órganos con alta demanda de nutrientes. CLas es transmitida por el insecto vector *Diaphorina citri* por medio del cual logra afectar a diferentes cultivos pertenecientes a la familia Rutaceae y causar la enfermedad conocida como Huanglongbing (HLB) o “enfermedad del dragón amarillo”. CLas altera funciones metabólicas de los carbohidratos celulares en plantas de cítricos; lo que produce la acumulación de almidón, sacarosa y glucosa, afectando el flujo de nutrientes en toda la planta y disminuyendo su capacidad fotosintética. El problema fitosanitario central radica en la dificultad de cultivar a CLas, por ser una bacteria fastidiosa, generando una demanda especial atención de estudio y búsqueda de métodos de diagnóstico y control de la enfermedad HLB. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue conocer la biología de *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Para ello se realizó una revisión sobre CLas y la enfermedad en Colombia. Además, se realizó un análisis bioinformático de los genes 23S y 16S.

Resultados

Se obtuvieron las secuencias de los genes completamente secuenciados para solo dos de los seis genes que empleamos en la investigación, los cuales fueron 23s y 16s, para el caso de *rplA-rplJ*, *rpoB*, *nttA* y *omp*, las secuencias analizadas no tenían suficiente homología con las secuencias de referencias, por lo tanto, se realizó una selección de los dos genes cuyas secuencias son más informativas y de mayor calidad.

A partir del análisis bioinformático se determinó que según 23S existen similitudes entre *Oricola thermophila* y según 16S *Devosia spp.*, que se observó en agrupamientos basados en diferentes métodos, donde se mantuvo siempre la estructura topológica de este clado.

Discusión y conclusión

La información recopilada y las secuencias analizadas reafirman la necesidad de conocer mejor el estado etiológico del HLB, en particular la caracterización genética, que permita manejar y controlar esta enfermedad que ha afectado tanto la citricultura del mundo entero.

Cabe destacar que CLas se ha especializado tanto en el ecosistema endófito de la como en el aparato bucal y digestivo del vector que evolutivamente se ha distanciado de las especies relacionadas a ellas, ya que las especies evolucionan y cambian gracias a los cambios que estas puedan sufrir en su entorno específico. En el caso de CLas se ha diferenciado al sistema cítricos-psílicos, por lo que también realizar un árbol filogenético es un modo que permite inferir sus relaciones evolutivas.

Se observaron similitudes entre *Oricola thermophila* y *Enterococcus* spp. según el gen 23S y *Devosia* sp. según 16S, al mantener siempre la estructura topológica en los 4 árboles. Esto indica que estas las especies más cercanas al clado de *Candidatus liberibacter asiaticus*, pero la brecha aún existe, y es necesario un análisis más profundo para mejorar la investigación y la inferencia en los resultados.

PALABRAS CLAVE: cítricos, *Diaphorina citri*, Huanglongbing, filogenia, fitopatógeno.

ABSTRACT

Introduction

Citrus fruits play an important role in feeding millions of people worldwide, since they are permanent crops and have high adaptability to various climatic conditions, which facilitates their high spread throughout the world. There are numerous diseases that affect citrus, of viral, fungal, bacterial or parasitic origin.

Materials and method

Candidatus Liberibacter asiaticus (CLas) is a Gram negative bacterium that has the ability to lodge in the tubes of the phloem sieve, which allows it to move throughout the plant, to locate in organs with high demand for nutrients. CLas is transmitted by the vector insect *Diaphorina citri* through which it affects different crops belonging to the Rutaceae family and causes the disease known as Huanglongbing (HLB) or "yellow dragon disease". CLas alters metabolic functions of cellular carbohydrates in citrus plants; which produces the accumulation of starch, sucrose and glucose, affecting the flow of nutrients throughout the plant and reducing its photosynthetic capacity. The central phytosanitary problem lies in the difficulty of cultivating CLas, as it is a bothersome bacterium, generating a special demand for study and search for methods of diagnosis and control of HLB disease. For this reason, the objective of this work was to know the biology of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. For this, a review was carried out on CLas and the disease in Colombia. In addition, a bioinformatic analysis of the 23S and 16S genes was performed.

Results

The sequences of the completely sequenced genes were obtained for only two of the six genes that we used in the research, which were 23s and 16s, in the case of rplA-rplJ, rpoB, nttA and omp, the analyzed sequences did not have enough homology With the reference sequences, therefore, a selection was made of the two genes whose sequences are more informative and of higher quality.

From the bioinformatic analysis it was determined that according to 23S there are similarities between *Oricola thermophila* and according to 16S *Devosia spp.*, Which was observed in groupings based on different methods, where the topological structure of this clade was always maintained.

Discussion and conclusión

The information collected and the sequences analyzed reaffirm the need to better understand the etiological status of HLB, in particular the genetic characterization, which allows the management and control of this disease that has affected so much the citrus industry around the world.

It should be noted that CLas has specialized both in the endophytic ecosystem of the as well as in the oral and digestive system of the vector that has evolutionarily distanced itself from the species related to them, since the species evolve and change thanks to the changes that they may undergo. in your specific environment. In the case of CLas, the citrus-psilid system has been differentiated, so making a phylogenic tree is also a model that allows inferring its evolutionary relationships.

Similarities were observed between *Oricola thermophila* and *Enterococcus spp.* according to the 23S gene and *Devosia sp.* according to 16S, by always maintaining the topological structure in the 4 trees. This indicates that these are the species closest to the *Candidatus liberibacter asiaticus* clade, but the gap still exists, and further analysis is necessary to improve research and inference in the results.

KEY WORDS: citrus, *Diaphorina citri*, Huanglongbing, phylogenesis, phytopathogen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alejandro Orjuela-Garzón, W., Arlen Araque Echeverry, W., & Cabrera Pedraza, R. (2020). Identificación de tecnologías y métodos para la detección temprana del Huanglongbing (HLB) a través de cienciometría en artículos científicos y patentes. 5. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num2_art:1208
2. Alejandro Orjuela-Garzón, W., Arlen Araque Echeverry, W., & Cabrera Pedraza, R. (2020). Identificación de tecnologías y métodos para la detección

- temprana del Huanglongbing (HLB) a través de cienciometría en artículos científicos y patentes. 5. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num2_art:1208
3. Alemán, J., Baños, H., & Ravelo, J. (2007). Artículo reseña *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. In Rev. Protección Veg (Vol. 22, Issue 3).
 4. Araque, W., & Arévalo, E. (2018). Potencial distribución espacial del vector del HLB de los cítricos *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en el departamento del Tolima, Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas, 12(3), 545–560. <https://doi.org/10.17584/rcch.2018v12i3.9521>
 5. Botero, V., Ochoa, A., Zamora, J. G., Ortiz, A., Fuel, S., Moná, E., Mejía, L. M., Guarín, J. H., Orduz, J., Chaparro, N., & Arévalo, E. (2014). *Diaphorina citri*. Identificación de la dinámica poblacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en los cultivos de cítricos de Colombia: una herramienta para implementar un sistema piloto de seguimiento de poblaciones del insecto vector del HLB. Universidad de Nacional de Colombia, Sede Medellín. <https://doi.org/10.13140/2.1.5056.6087>
 6. CCI Corporación Colombia Internacional. (n.d.). Retrieved March 7, 2021, from <http://www.cci.org.co/inicio/>
 7. Choi, A. L., Grandjean, P., Sun, G., & Zhang, Y. (2013). Developmental Fluoride Neurotoxicity: Choi et al. Respond. In Environmental Health Perspectives (Vol. 121, Issue 3, p. a70). National Institute of Environmental Health Sciences. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206192R>
 8. Corrales. (n.d.). Serie Lasallista Investigación y Ciencia CÍTRICOS: CULTIVO, POSCOSECHA E INDUSTRIALIZACIÓN.
 9. do Carmo Teixeira, D., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, P. I., Ayres, A. J., & Bové, J. (2005). “*Candidatus Liberibacter americanus*”, associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(5), 1857–1862. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63677-0>
 10. Doe, D., Om, N., Dorji, C., Dorji, T., Garnier, M., Jagoueix-Eveillard, S., & Bové, J. M. (2003). First Report of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”, the Agent of Citrus Huanglongbing (Ex-greening) in Bhutan . Plant Disease, 87(4), 448–448. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.4.448a>
 11. Ebratt Ravelo, C., Emilio, E., González, R., Tatiana, L., Antonio, V., Gómez, Z., Milena, E., Ávila, C., Patricia, Á., Galindo, S., & Yohany, M. (2011). Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín, 64(2), 6141–6146. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179922664011>
 12. Fagen, J. R., Leonard, M. T., Coyle, J. F., McCullough, C. M., DavisRichardson, A. G., Davis, M. J., & Triplett, E. W. (2014). *Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. International Journal of Systematic and Evolutionary

- Microbiology, 64(PART 7), 2461–2466.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.063255-0>
13. Gómez Barros, G. E. T. W. C. A. Á. P. Z. M. J. B. M. C. L. E. A. Á. M. P. R. A. R. G. V. L. F. (2008). Tecnología para el cultivo de los cítricos en la región caribe colombiana /. <https://1library.co/document/yevd6p4z-tecnologia-cultivo-citricos-region-caribe-colombiana.html>
 14. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In Nucleic acids symposium series (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
 15. Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. (2011, September 18). La bacteria HLB que ataca los cítricos y su insecto vector. <https://www.ica.gov.co/noticias/agricola/2011/la-bacteria-hlb-que-ataca-los-citricos-y-su-insect.aspx>
 16. J.M. Bové. (2006). Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus.
 17. Jorge Luis Flores-Sánchez, Gustavo Mora-Aguilera 1, Emiliano Loeza-Kuk 2, J. Isabel López-Arroyo 3, Santiago Domínguez-Monge 1, Gerardo Acevedo-Sánchez 1, & Pedro Robles-García 4. (2015). Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa, en Yucatán México.
 18. Munyaneza, J. E., Sengoda, V. G., Buchman, J. L., & Fisher, T. W. (2012). Effects of temperature on “*Candidatus liberibacter*” and zebra chip potato disease symptom development. Plant Disease, 96(1), 18–23. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0185>
 19. Nelson, W. R., Munyaneza, J. E., McCue, K. F., & Bové, J. M. (2013). The Pangaeian origin of “*Candidatus Liberibacter*” species. Journal of Plant Pathology, 95(3), 455–461. <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.001>
 20. Olvera-Vargas, L. A., Quiroz Gaspar, Á. de J., Contreras-Medina, D. I., & Aguilar-Rivera, N. (2020). Análisis de riesgo potencial de Huanglongbing a través de tecnología geoespacial en Colombia. Ciencia & Tecnología Agropecuaria, 21(3), 1–23. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1552
 21. Pedreira de Miranda, M., Takao Yamamoto, P., Beozzo Bassanezi, R., Aparecido Lopes, S., Belasque Júnior, J., Bellato Spósito, M., Juliano Ayres, A., & Elena Diaz Gil, M. (n.d.). Situación del huanglongbing (hlb) en brasil y manejo de la enfermedad.
 22. Pourreza, A., Lee, W. S., Etxeberria, E., & Zhang, Y. (2016). Identification of Citrus Huanglongbing Disease at the Pre-Symptomatic Stage Using Polarized Imaging Technique. IFAC-PapersOnLine, 49(16), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2016.10.021>

23. Raddadi, N., Gonella, E., Camerota, C., Pizzinat, A., Tedeschi, R., Crotti, E., Alma, A. (2011). "*Candidatus Liberibacter europaeus*" sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. *Environmental Microbiology*, 13(2), 414–426. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02347.x>
24. Robles-González, M., Manuel, M., Orozco-Santos; Manzanilla-Ramírez, M.; Ángel; Velázquez-Monreal, M., Joaquín, J., Carrillo-Medrano; & Heréndira, S. (2017). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263152411008>
25. Salinas, A., & Cantero, J. (2017). Análisis Filogenético de bacterias del genero *Candidatus Liberibacter* causantes del HLB en Cítricos y otras enfermedades en plantas vasculares. In *Anais: I Seminário Internacional de Pós-Graduação em Desenvolvimento Rural Sustentável e IV Jornada Questão Agrária e Desenvolvimento* (20th ed., Vol. 94). Marechal Candido Rondon: UNIOESTE-PPGDRS. Retrieved from <https://midas.unioeste.br/sgev/eventos/SIPGDRS/anais>
26. Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, and Koichiro Tamura (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549
27. Teixeira, D. A. B., & Borges, I. (2005). Effect of increasing level of whole cottonseed on intake and apparent digestibility of fiber fraction of *Brachiaria decumbens* hay in sheep. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57(2), 229–233. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352005000200015>
28. Vegetale, P. (2011). Molecular characterization and phylogenetic analysis of 16s rRNA from a new "*candidatus liberibacter*" strain associated with zebra chip disease of potato (*solanum tuberosum*) and the potato psyllid (*bactericera cockerelli* sulc). *Journal of Plant Pathology*, 16–17b.
29. Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y., Li, J., Rangel, L. T., & Martins, J. (2017). The *Candidatus Liberibacter*-Host Interface: Insights into Pathogenesis Mechanisms and Disease Control. In *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 55, pp. 451–482). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035513>
30. Yudis, A., & Garcia, G. (2018). Análisis de experiencias en el mundo sobre la investigación y el manejo del huanglongbing (HLB) de los cítricos y la aplicación en Colombia.
31. Zhou, Y., Wei, X., Li, Y., Liu, Z., Duan, Y., & Zou, H. (2020). *Candidatus liberibacter asiaticus* SDE1 effector induces huanglongbing chlorosis by downregulating host DDX3 gene. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms21217996>