

## ***Candidatus Liberibacter asiaticus* en citricultivos**

Baza Nicolle, Escobar Jessica, Herrera Andrés, Aranguren Yani, Machado Elwi

Programa de Microbiología. Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas. Universidad Simón Bolívar

---

### **RESUMEN**

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. Existen numerosas enfermedades que afectan a los cítricos, de origen viral, fúngica, bacteriana o parasitaria. *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. A partir de este 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. 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.

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

### **ABSTRACT**

Citrus fruits play an important role in the diets of millions of people worldwide, as they are permanent crops and are highly adaptable to various climatic conditions. There are numerous

diseases affecting citrus fruits, of viral, fungal, bacterial or parasitic origin. *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) is a Gram-negative bacterium that has the ability to lodge in the sieve tubes of the phloem, which allows it to move throughout the plant, to locate in organs with high nutrient demand. CLAs is transmitted by the insect vector *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, resulting in 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 fastidious bacterium, generating a special demand for study and search for methods of diagnosis and control of the HLB disease. For this reason, the objective of this work was to know the biology of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. For this purpose, a review of CLAs and the disease in Colombia was carried out. In addition, a bioinformatic analysis of the 23S and 16S genes was performed. From this, it was determined that according to 23S there are similarities between *Oricola thermophila* and 16S *Devosia* spp. according to 16S, which was observed in groupings based on different methods, where the topological structure of this clade was always maintained. The information gathered and the sequences analyzed reaffirm the need to better understand the etiological status of HLB, in particular the genetic characterization, which will allow the management and control of this disease that has affected citriculture worldwide.

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

## INTRODUCCIÓN

Los cítricos constituyen el género *citrus* que hace parte de la familia de las rutáceas, y conforman varias especies entre ellas: las naranjas (*citrus sinensis*, *citrus aurantium*); los limones (*citrus limón*); las mandarinas (*citrus reticulata*, *citrus reshni*) y los pomelos (*Citrus paradisi Maef*). Son cultivos permanentes de alta adaptabilidad a una amplia variedad de condiciones climáticas, lo que facilita su alta propagación a lo largo y ancho del mundo, entre los principales productores de cítricos se encuentra Brasil y Estados Unidos, le siguen en relevancia China, México, España, India Irán, Pakistán, Italia, Argentina, Egipto, Grecia, Turquía y Sudáfrica. Colombia se encuentra en el puesto 33 de los países con participación en la producción y rendimiento de citricultivos. Se caracterizan por presentar un sabor ácido o agridulce, son fuente importante de vitamina A y C, como también de minerales, entre ellos calcio y fósforo. (Gómez Barros, 2008).

La enfermedad de los cítricos más devastadora del mundo es la enfermedad de Huanglongbing (HLB). Se estima que ha causado la muerte de más de 63 millones de árboles, principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil (Robles-González et al., 2017).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Búsqueda bibliográfica

En este trabajo se realizó una revisión bibliográfica, durante el periodo de tiempo (1 de marzo hasta septiembre de 2021), por medio de las principales fuentes y bases de datos como NCBI Pubmed, Scielo, Scencedirect y Nature. La búsqueda se restringió a artículos publicados del año 2000 al 2021, relacionados a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, principalmente en relación a la enfermedad, y la bioquímica y genética de la bacteria. La búsqueda se realizó tanto en la lengua española como inglesa.

### Análisis bioinformático

Se analizaron siete genes específicos de *Candidatus liberibacter asiaticus* (rplA-rplJ, 16S, rpoB, 23S, nttA, omp), los cuales fueron identificados mediante la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Estos fueron comparados con otras bacterias a través del programa de alineamiento BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0 (Hall, 1999), luego se realizaron cortes de gaps para asegurar que todas las secuencias tuvieran las regiones homologas y obtener mejores resultados sin que haya variables en los alineamientos.

Para la construcción de los árboles filogénicos se utilizó el software MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, and Tamura, 2018). en base al mejor modelo de evolución predicho. Para lo cual, primero se calculó el mejor modelo evolutivo y se analizaron las distancias entre los aminoácidos. Luego, se realizaron agrupamientos para formar estimaciones de árboles con los métodos de Máxima Verosimilitud, Máxima parsimonia, Neighbor-Joining y UPGMA. Para los 4 métodos se hicieron 2000 réplicas, a fin de tener en cuenta las distintas tasas de evolución entre sitios que se pueden generar.

### Epidemiología

En Colombia, el ICA realiza visitas de campo para monitorear el HLB en cítricos con poca participación del sector privado. Estos atienden visitas a viveros, granjas y patios traseros en 26 departamentos, identificando sitios de prueba y puntos de muestreo basados en protocolos internacionales. Seleccionan y hacen seguimiento de posibles hospedadores de vectores de insectos y bacterias relacionadas, incluidos cultivos, viveros, plantas de traspatio, setos y plantas urbanas de especies de la familia Rutaceae. El Instituto, bajo la supervisión de representantes de cada departamento, establece un programa de visitas de campo mensuales de acuerdo con su personal, para verificar el cumplimiento.

Después de un seguimiento iniciado en el año 2007, en noviembre de 2015 se detectó *Candidatus Liberibacter asiaticus* en insectos y en marzo de 2016 en *Citrus aurantifolia*, formando el primer reporte de HLB para Colombia. (Araque & Arévalo, 2018).

A noviembre de 2019 se detectaron casos positivos en 40 ciudades centrales de Atlántico, Bolívar, Cesar, La Guajira, Magdalena, Norte de Santander, y más recientemente en Córdoba y Sucre. Esto corresponde a 754 sitios positivos entre las 7178 muestras analizadas, es decir, en el 10% de las muestras, correspondientes a 396 (53%) sitios positivos en plantas y 358 (47%) sitios positivos en insectos. (Olvera-Vargas et al., 2020).

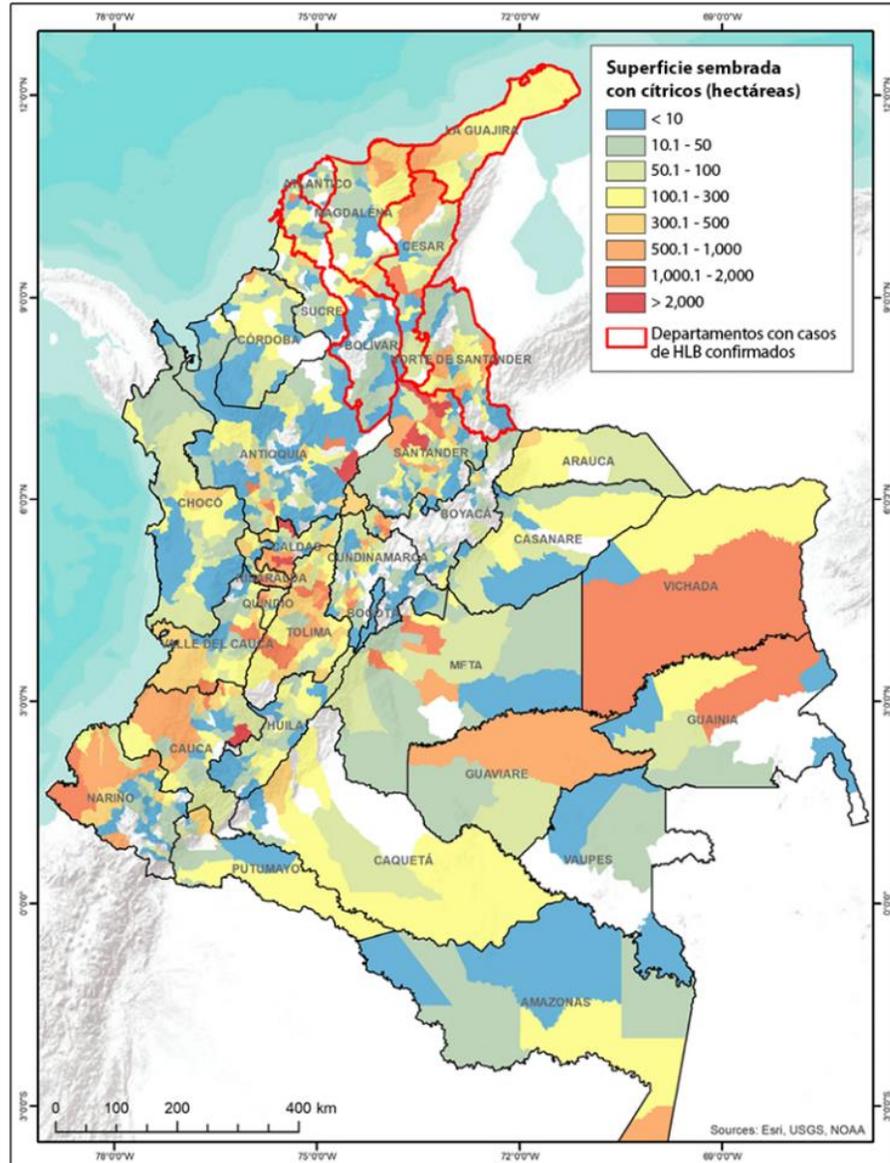
El Departamento de Protección Vegetal determinó que en Atlántico existe una mayor intensidad epidemiológica de la enfermedad con 250 casos positivos en 22 municipios, lo que representa el 96% del total de ciudades del Departamento, seguido de La Guajira con 67%, en el menor Bolívar (31%), mientras que en otras provincias no más del 15% del número total de municipios directamente dependientes del gobierno central (Botero et al., 2014).

En cuanto a la representación de cítricos en la zona afectada, Magdalena y Cesar cuentan con 3334 y 2921 árboles de cítricos plantados (Botero et al., 2014), que representan la mayor superficie de cultivo, mientras que Atlántico y La Guajira tienen 1537 y 390, respectivamente. La Guajira también posee traspatios con representatividad de la enfermedad (Olvera-Vargas et al., 2020).

El primer informe de *D. citri* en América del Sur se realizó en São Paulo (Brasil) en 1942; Posteriormente se informó de otros países de la región: Argentina (Entre Ríos) en 1984, Uruguay en 1991, Estados Unidos (Florida) en 1998, Cuba en 1999, México (Campeche) en 2002, Bolivia en 2004 y Paraguay en 2008 (EPPO, 2020; CABI / OEPP, 2017). En Colombia, la presencia de *D. citri* se informó por primera vez en 2007 en los departamentos de Tolima y Valle del Cauca (Ebratt Ravelo et al., 2011). Posteriormente fue descubierto en Antioquia, Atlántico, Caldas, Casanare, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Bolívar, Cauca, Huila, Meta, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Santander y Vichada. Actualmente, está presente en 25 departamentos en todo el país. (Resolución 1668, 2019).

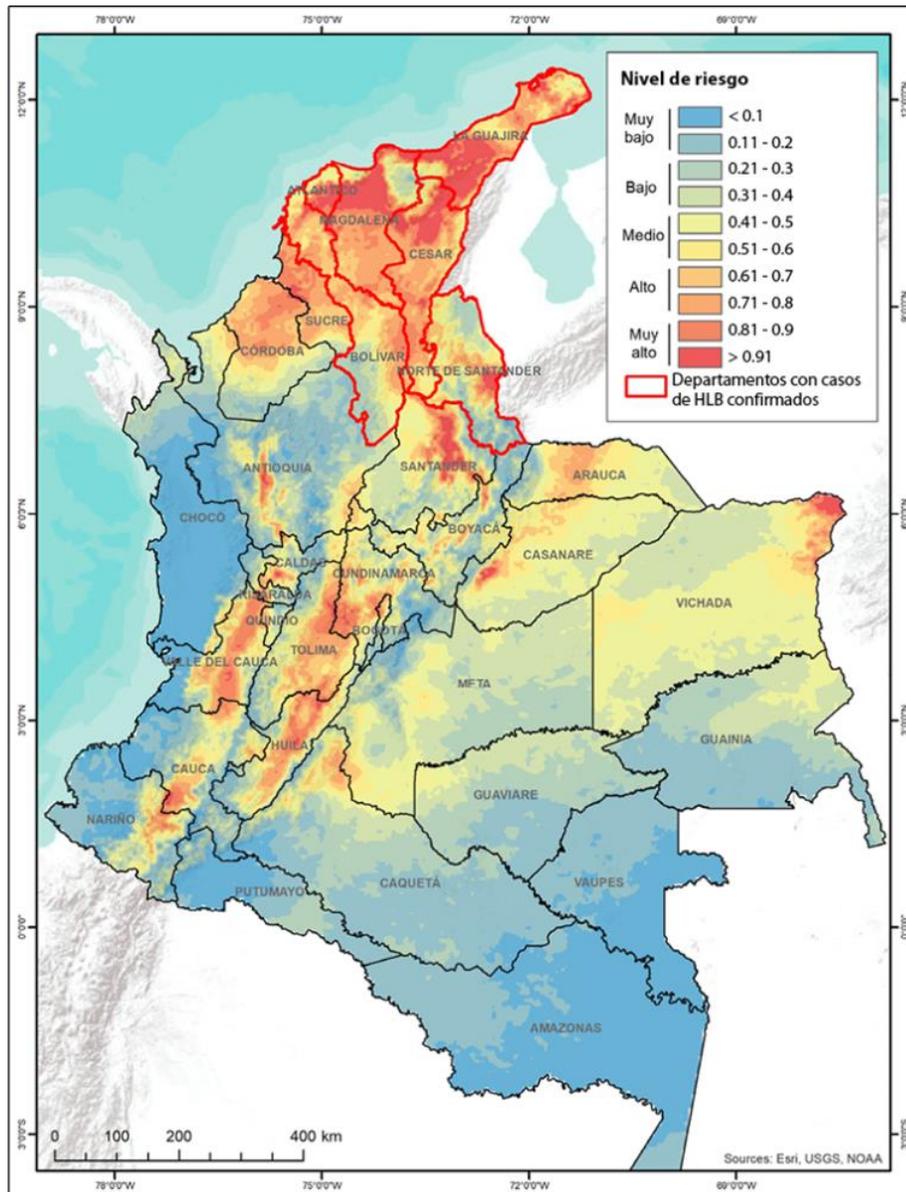
Se cree que entre 2004 y 2011, el área comercial de cítricos en Florida disminuyó en un 28%, y dada la cantidad de árboles producidos, el HLB es una de las principales causas (Pourreza et al., 2016). En México, la enfermedad se detectó por primera vez en julio de 2009 en limoneros mexicanos en áreas urbanas de la Península de Yucatán. Posteriormente se reportó en árboles de la misma especie en los estados de Nayarit y Jalisco, y en 2010 en Colima (Olvera-Vargas et al., 2020a). En el segundo estado, a diciembre de 2010 se detectaron 164359 limoneros mexicanos con síntomas asociados a HLB, en 1062 fincas ubicadas en diferentes áreas de producción (Robles-González et al., 2017).

A noviembre de 2015, HLB está presente en 347 ciudades de administración central en 18 de los 24 estados productores de cítricos de México (Olvera-Vargas et al., 2020).



**Figura 1.** Ubicación geográfica de la superficie sembrada con cítricos en Colombia, la escala de colores indica el área de cultivo y las líneas rojas representan los casos confirmados en la región nacional.

Fuente: Olvera-Vargas et al., 2020. Análisis de riesgo potencial de Huanglongbing a través de tecnología geoespacial en Colombia.



**Figura 2.** Potencial de riesgo de la enfermedad con respecto a los demás departamentos, mapa de riesgo de proliferación de HLB en Colombia reportado en diciembre de 2018, cuando las condiciones ambientales y climáticas son óptimas para el desarrollo de la enfermedad.

Fuente: Olvera-Vargas et al., 2020. Análisis de riesgo potencial de Huanglongbing a través de tecnología geoespacial en Colombia.

## Factores de virulencia

El progreso en los mecanismos de patogénesis de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) se presentan por medio de los rasgos de virulencia, como los sistemas de secreción a través de una vía secretora general completa (Sec) y lipopolisacáridos (LPSs), y otros rasgos importantes contribuyen al desarrollo de la enfermedad como flagelos, profagos e hidroxilasa del ácido salicílico. CLAs secretan Sec-dependientes de efectores (SDEs) y otros factores de virulencia en el floema del hospedador, causando muerte celular, necrosis u otros. Los receptores de los orgánulos del floema, como del plastidio, vacuola, mitocondria o retículo endoplásmico, interactúan con las SDEs secretadas de CLAs desencadenando respuestas celulares (Wang et al., 2020).

CLAs posteriormente a la infección, libera un conjunto de efectores que modulan las respuestas del huésped; varios de estos SDEs presentan diferentes niveles de expresión en cítricos y psíidos de manera que logran manipular las diferentes respuestas del huésped. El efector 1 liberado por Sec (SDE1) es una proteína compuesta que puede secretarse al fluido extracelular de la célula a través de la vía Sec SDE1 que se dirige a la helicasa de ARN DEAD-box DDX3 donde se da una regulación a la baja del gen del anfitrión DDX3 que está asociada con la clorosis de la hoja (da Graça et al., 2016).

El efector 1 liberado por Sec (SDE1) que se localiza en las vesículas de cloroplasto e induce clorosis y muerte celular en las plantas. La helicasa de ARN DEAD-box (DDX3) interactúa con SDE1 y el gen SDE1 presenta una sobreexpresión que da como resultado la supresión de la expresión de un gen en la membrana celular, que desencadena la clorosis de la hoja, el síntoma principal de la infección por CLAs en plantas de cítricos, lo que presenta un papel crítico de SDE1 en la modulación de la expresión de NbDDX3. Ahora bien, la identificación de CsDDX3 como objetivo crítico de SDE1, en su asociación con el desarrollo de síntomas de HLB indica que el gen DDX3, es un blanco importante para la edición de genes, de esta manera interrumpir la interacción entre DDX3 y SDE1 e interferir en la susceptibilidad del huésped (da Graça et al., 2016).

## Generalidades de *Candidatus liberibacter asiaticus*

CLAs es un parásito obligado de plantas entre 0.2 a 0.3  $\mu\text{m}$  de diámetro. Su nombre se deriva del término "*Candidatus*" utilizado en la asignación de los microorganismos fastidiosos, es decir, los microorganismos que no son cultivables, ya que su crecimiento solo se da en presencia del hospedador (Palomo et al., 2017).

CLAs es una bacteria Gram negativa, de clase Alpha Proteobacteria, del orden Rhizobiales. Presenta forma redonda al finalizar su ciclo celular (Palomo et al., 2017). Varios estudios filogenéticos de la región 16Ss ARN indican que pertenece al grupo de las  $\alpha$ -Proteobacterias que comparten características genéticas con los siguientes géneros de bacterias del subgrupo

$\alpha$ 2Proteobacteria como *Alfipia* spp., *Agrobacterium* spp., *Brucella* spp. y *Bartonella* spp. (Doe et al., 2003).

CLas es el agente etiológico de HLB y se establece principalmente en los tubos cribosos del floema en los que se desplaza o transporta a través de sus poros (Doe et al., 2003). Y tienen la capacidad de multiplicarse en las glándulas salivares de los psílidos vectores y en la hemolinfa (da Graça et al., 2016).

Un factor muy clave para su crecimiento y desarrollo como también para la aparición de los síntomas de la enfermedad es la temperatura alta, ya que CLas es tolerante al calor lo que favorece no solo su distribución geográfica sino también sus diseminadores e insectos vectores (Munyanza et al., 2012). CLas es fluido por el calor, es por ello que la aparición de sus síntomas se da en condiciones bajas y por encima de 35°C (Bové, 2006).

CLas tiene afinidad por todos los cítricos que se ven afectados por el HLB, pero algunos *Citrus* muestran una mayor tolerancia, sin embargo, estos mecanismos de afinidad no se comprenden completamente. Se sabe que CLas tiene una predominancia mayor hacia los *Citrus aurantifolia*, comúnmente conocido como limón mexicano ocasionando le afecciones a sus características organolépticas como olor, sabor, textura y color por el clima al cual pertenecen (Jorge Luis Flores-Sánchez et al., 2015).

## **Enfermedad HLB**

Los árboles infectados de HLB (dragón amarillo) pueden mostrar una variedad de síntomas, sin embargo, estos no siempre son correlacionados a la enfermedad y todas las veces no se expresan en un mismo cultivo y tiempo. Al inicio de la enfermedad producida por CLas se observa la presencia de clorosis en algunas zonas de los árboles infectados. Con el avance y desarrollo de la enfermedad, la clorosis se expande en una mayor proporción en los cultivos que contengan o den indicio de la enfermedad (Doe et al., 2003).

Al extremo de las ramas que se observan severamente afectadas es común presenciar síntomas inducidos por HLB, los cuales, son similares a los que se expresan por la deficiencia de nutrientes. Otros de los síntomas que se pueden observar en los árboles es la muerte progresiva de pequeñas ramas, la caída severa de hojas o defoliación, que resultan en un follaje más disperso. También puede ocurrir una caída intensa de frutos que puede conllevar a una reducción de la cosecha, aunque los frutos enfermos pueden permanecer en ciertos casos en el árbol, a pesar de esto pueden presentar un tamaño menor que el normal (Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, 2011).

No obstante, un síntoma foliar descrito como moteado se considera el síntoma característico de HLB en muchas variedades de cítricultivos. Además de esto, la fruta puede mostrar varios síntomas, entre los que se incluyen el tamaño insuficiente, la deformación, y la deficiencia de color

y reducción en el peso de los frutos. Todos estos signos negativos, dan lugar a un árbol debilitado y por ende a una gran afectación en la producción de los frutos, el cual puede conllevar a la erradicación de los cultivos cuando se encuentra la enfermedad en una proporción muy elevada (Alejandro Orjuela-Garzón et al., 2020).

Otra de la expresión de los síntomas en el fruto es la “coloración invertida”, que ocurre en la maduración, cuando la parte basal del fruto retiene el color verde en lugar de mostrar la coloración naranja que desarrollan normalmente los frutos sanos. El síntoma de mayor diagnóstico de la enfermedad “Huanglongbing” es el moteado difuso, amarillo o clorótico que ocurre en las hojas, el cual se observa mejor en la parte interior de la copa del árbol (Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, 2011).

La síntesis del almidón y la sacarosa como la descomposición del primero son ficha clave para el metabolismo y crecimiento vegetal (Griffiths et al., 2016).

No obstante, CLas puede llegar a generar diversas alteraciones a nivel metabólico que de alguna u otra forma afectarán el proceso de crecimiento y desarrollo vegetativo (Bonfig et al., 2006), un ejemplo de ello es cuando se da el consumo excesivo de fructosa generando cambios en la distribución de los metabolitos de la planta.

### **Aspectos bioquímicos de la planta enferma**

En el proceso de fotosíntesis de una planta es vital la producción de carbohidratos, los cuales regulan las etapas de crecimiento y desarrollo a partir de la modulación de la actividad enzimática por medio de tejidos encargados de su transporte; cabe destacar, que un canal de interacciones en la planta es el floema, donde es transportado el principal carbohidrato que es la sacarosa (Ainsworth & Bush, 2011), metabolito de señalización cuya función es proporcionar información relacionada a la disponibilidad de las variables esenciales para un óptimo desarrollo vegetativo (Wind et al., 2010).

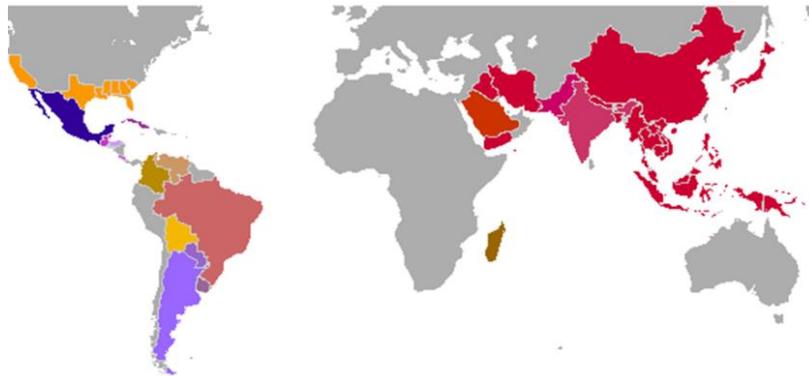
La infección por CLas altera funciones metabólicas de los carbohidratos celulares en la planta; lo que produce la acumulación de almidón, sacarosa y glucosa, de tal manera que afecta el flujo de nutrientes en toda la planta y disminuye la capacidad fotosintética. Por ende, CLas se establece en los tubos cribosos del floema; lo que ocasiona un desequilibrio en el proceso de carbohidratos en hojas infectadas durante la aparición de los síntomas de la enfermedad y esto se puede relacionar con la disminución en la producción y calidad del fruto, en el progreso de la enfermedad en la planta en etapa sintomática (Arce-Leal et al., 2019).

### **Vector *Diaphorina citri***

*D. citri* también conocido como el psílido asiático de los cítricos, es un hemíptero que pertenece a la familia Liviidae. Los adultos del psílido presentan un tamaño muy pequeño, entre 2 a 3 mm aproximadamente. Se caracterizan por tener una coloración de manchas pardas oscuras en el borde de sus alas lo cual lo hace diferente de otras especies (King, 2012).

El floema en donde se aloja el patógeno es el canal por donde circula la savia adsorbida por el insecto, que al ser muy recurrente este hábito en la planta se desencadenará una serie de complicaciones como el daño en los brotes jóvenes provocando enrollamiento y caída en sus hojas causando la muerte en las yemas apicales. (Spicer, 2014)

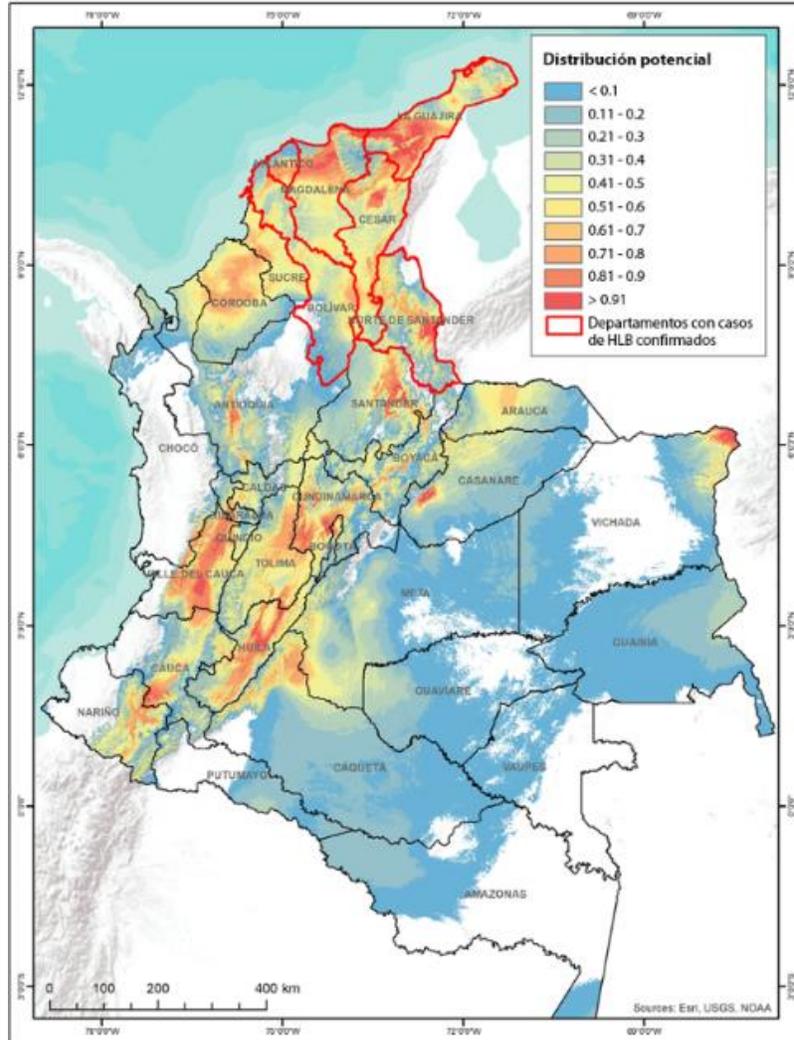
Su importancia fitosanitaria en las zonas en las que se encuentra distribuido es porque presenta un daño directo e indirecto al ser diseminado o transportado, siendo este el vector de la enfermedad devastadora de citricultivos conocida como Huanglongbing (HLB), cuyo agente etiológico pertenece a la especie *Candidatus liberibacter asiaticus* (CLas) (Instituto Colombiano Agropecuario - ICA, 2011).



**Figura 3.** Presencia del vector *Diaphorina citri* a nivel mundial, Tiene una amplia distribución en el sur de Asia y se extiende a otras zonas productoras de cítricos del continente americano.

Fuente: Grafton-Cardwell et al. 2006. García-Darderes, C.S. 2009.

<http://www.invasivespeciesinfo.gov/animals/acp.shtml>.



**Figura 4.** Presencia del vector *Diaphorina citri* en Colombia y su potencial de riesgo.

Fuente: Olvera-Vargas et al., 2020. Análisis de riesgo potencial de Huanglongbing a través de tecnología geoespacial en Colombia.

### Métodos de Diagnóstico

Como la enfermedad no tiene cura, la única solución es el diagnóstico oportuno tanto del vector como los síntomas, pero a nivel de laboratorio se puede verificar gracias a las herramientas biotecnológicas.

En el diagnóstico dentro laboratorio, se han desarrollado varias tecnologías diferentes a lo largo del tiempo, pero la más efectiva es realizar una qPCR tomando una muestra de una de las hojas,

Esto es el método regulador estándar para detectar CLAs, que puede detectar tan solo una copia única de bacterias en una muestra. Sin embargo, debido a la falta de síntomas obvios y la distribución desigual de CLAs en el árbol, elegir la mejor muestra es el principal obstáculo para la detección temprana de qPCR. La prueba reglamentaria CLAs para qPCR especifica el muestreo de hojas maduras. Estos cortes son útiles para la inspección visual de los síntomas del HLB, pero pueden ser tejidos poco fiables para la detección temprana.

## **Muestreo y control del vector**

### **Método visual.**

Este tipo de identificación se realiza por medio de la observación minuciosa de la planta con ayuda de una lupa para obtener una mayor visualización de las diferentes expresiones de la enfermedad (HLB) de manera directa producida por CLAs. A partir de esto se hace un muestreo para el control del insecto donde se debe priorizar a los brotes nuevos en plantas, ya que en estas estructuras es donde van a predominar huevos, ninfas y adultos de *D. citri*, por medio del cual se puede hacer una mejor observación de su comportamiento en el cultivo; como consiguiente, el muestreo se debe iniciar y terminar en los bordes de los predios, debido a que es el primer punto de llegada de *D. citri* en las plantas. Luego, el material colectado es transportado al laboratorio para su análisis y diagnóstico.

### **Método de tableros adhesivos:**

Según investigaciones se dice que *D. citri* tiene una atracción mayor por el color amarillo; por esta razón este muestro consiste en tableros amarillos que contiene adhesivos los cuales son colocados en la copa de los árboles. Para el proceso de lectura de estos tableros se deben retirar semanalmente o cada quince días, y ser transportados inmediatamente al lugar donde van a ser revisados de una manera muy cuidadosa con una lámpara de aumento para una mejor observación. Ha sido considerado como primera medida para el monitoreo de *D. citri* el muestreo por medio de los tableros amarillos en zonas donde se establecen las áreas de control, como también, donde se evidencia la dinámica poblacional de *D. citri* pero no hay presencia del HLB aun en plantas.

### **Método de golpeado de ramas o stem-tap:**

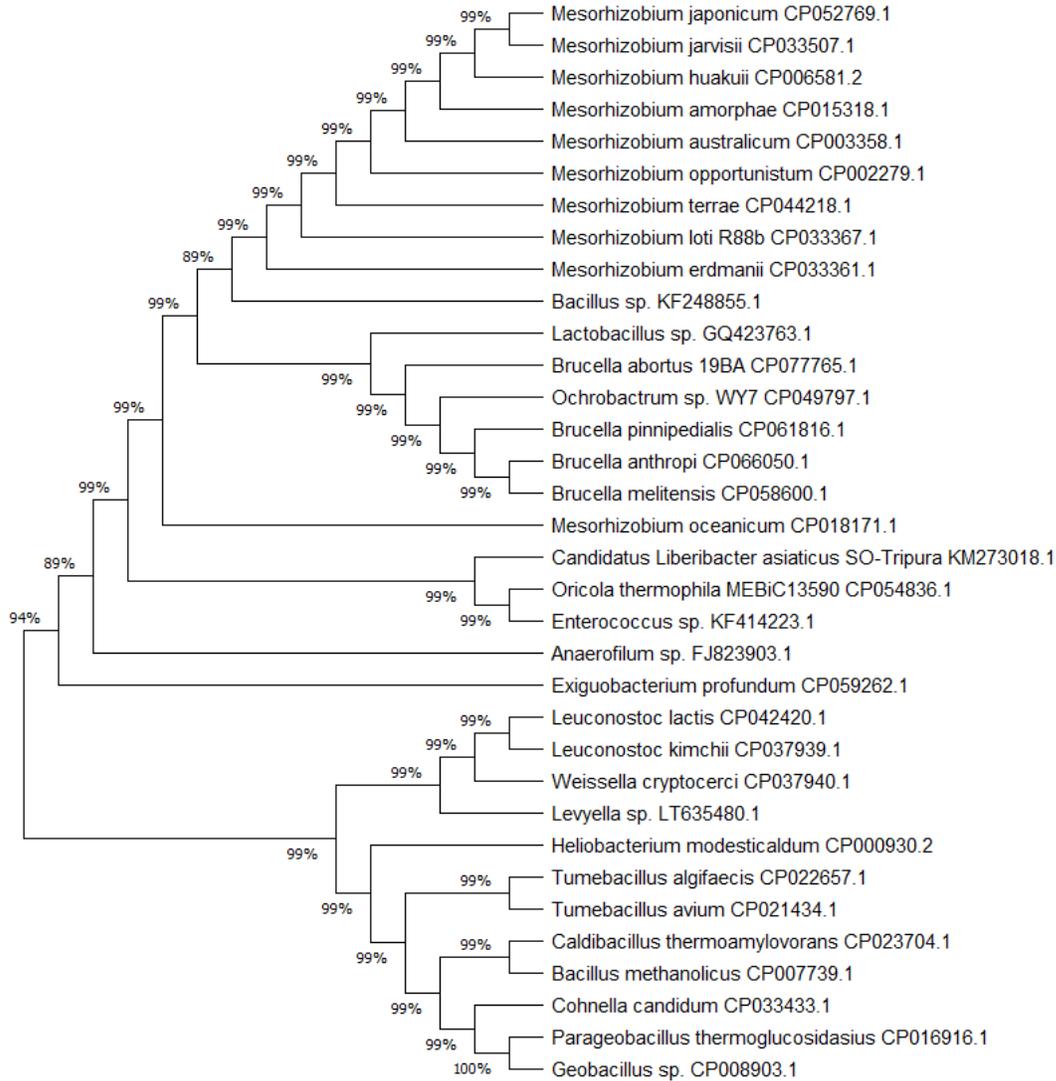
Este muestreo se basa colocar una hoja laminada de color blanco debajo de la rama de una planta infectada, que va ser golpeada por lo menos tres veces por medio de un tubo PVC. Para el análisis de este muestreo se deben contar los adultos de *D. citri* muy rápido ya que estos pueden saltar o volar de forma inmediata.

## RESULTADOS

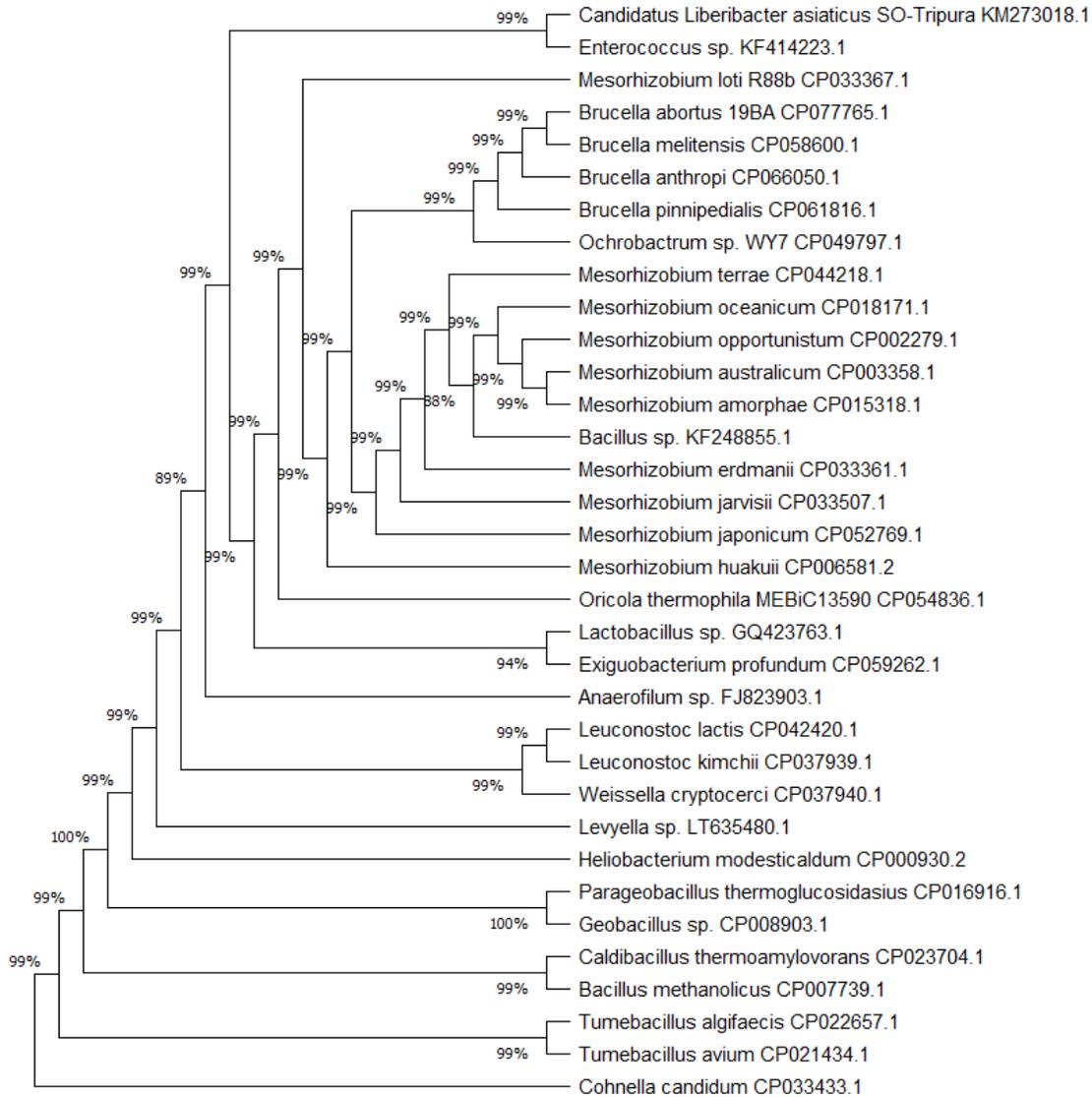
Se obtuvieron las secuencias de los genes completamente secuenciados para solo dos de los seis genes que empleamos en la investigación, los cuales fueron 23s y 16s, para el caso de rplA-rplJ, rpoB, nttA y omp. Las secuencias analizadas no tenían suficiente homología con las secuencias de referencias,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

La primera secuencia seleccionada fue la correspondiente al gen ARNr 23S de CLas, que se comparó con las secuencias totales de *Mesorhizobium loti*, *Oricola thermophila*, *Brucella abortus*, *Ochrobactrum* sp, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella anthropi*, *Mesorhizobium terrae*, *Brucella melitensis*, *Mesorhizobium oceanicum*, *Mesorhizobium opportunistum*, *Mesorhizobium australicum*, *Mesorhizobium amorphae*, *Mesorhizobium huakuii*, *Mesorhizobium japonicum*, *Mesorhizobium jarvisii*, *Mesorhizobium erdmanii*, *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Exiguobacterium profundum*, *Tumebacillus algifaecis*, *Tumebacillus avium*, *Anaerofilum* sp., *Caldibacillus thermoamylovorans*, *Bacillus methanolicus*, *Levyella* sp., *Parageobacillus thermoglucosidasius*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc kimchii*, *Geobacillus* sp., *Cohnella candidum*, *Weissella cryptocerci*, *Heliobacterium modesticaldum*. Los árboles muestran las relaciones obtenidas por métodos filogenéticos (Figura 5 y 6) y métodos de distancia (Figura 7 y 8).

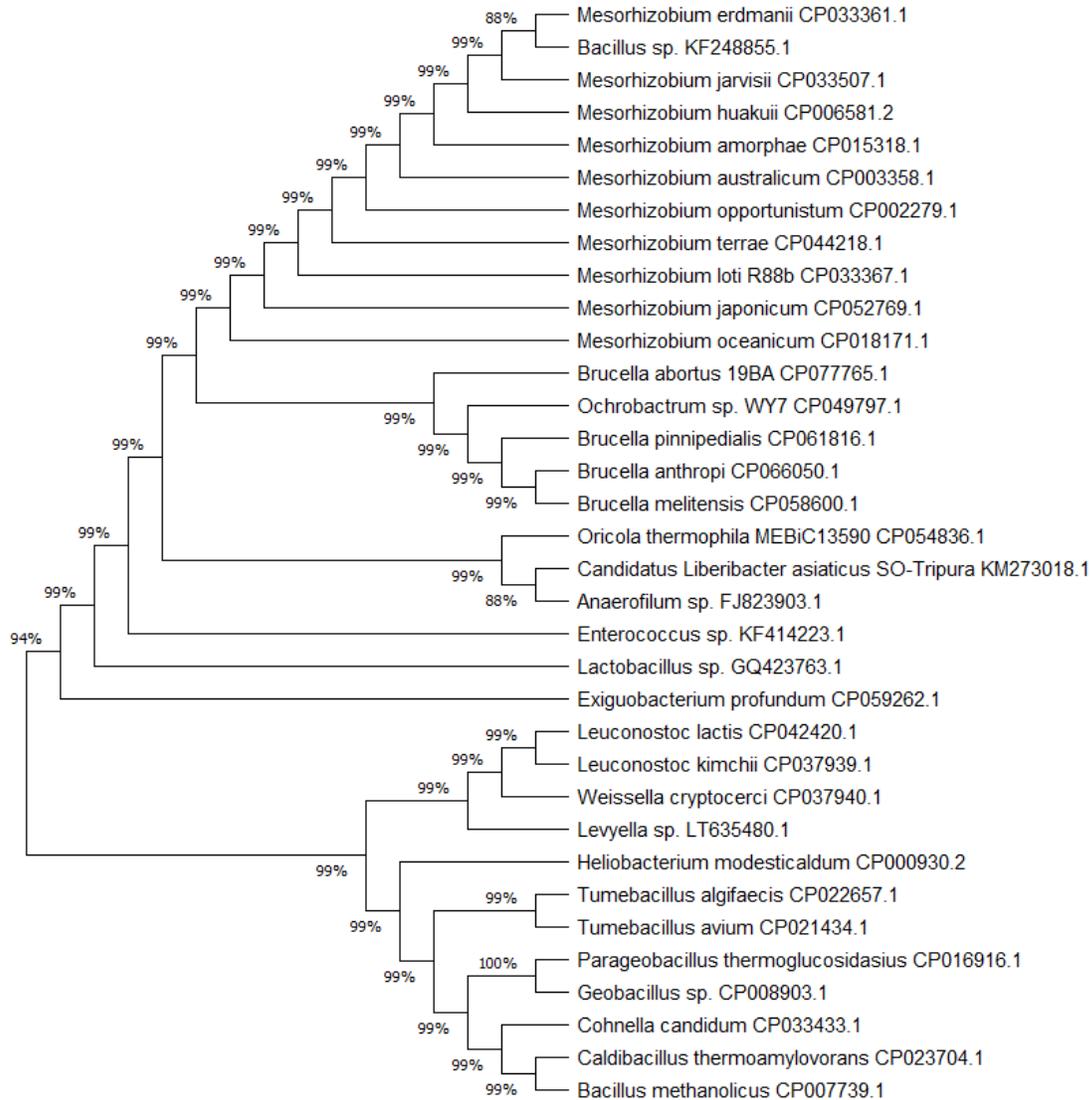
En segundo lugar, se seleccionó el gen ARNr 16S de CLas, que fue comparada con *Shimia biformata*, *Thalassobius gelatinovorans*, *Marivita roseacus*, *Marivita byunsanensis*, *Octadecabacter ascidiaceicola*, *Planktomarina temperata*, *Boseongicola aestuarii*, *Marine bacterium*, *Paracoccus* sp., *Planococcus* sp., *Paenibacillaceae bacterium*, *Paenibacillaceae bacterium*, *Exiguobacterium profundum*, *Hyphobacterium indicum*, *Devosia* sp., *Labrenzia* sp., *Paenibacillus sophorae*, *Bacillus pumilus*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bacillus* sp., *Exiguobacterium indicum*, *Rhizobium etli*, *Sinorhizobium* sp., *Ensifer* sp., *Shinella zoogloeoides*, *Bacillus methylotrophicus*, *Lysinibacillus macroides*, *Bacillus firmus*, *Bacillus aryabhattai*, *Weissella cibaria*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactobacillus plantarum*, *Tissierella* sp., *Serpentinicella alkaliphila*, *Natranaerovirga pectinivora*. Los árboles muestran las relaciones obtenidas por métodos filogenéticos (Figura 9 y 10) y métodos de distancia (Figura 11 y 12).



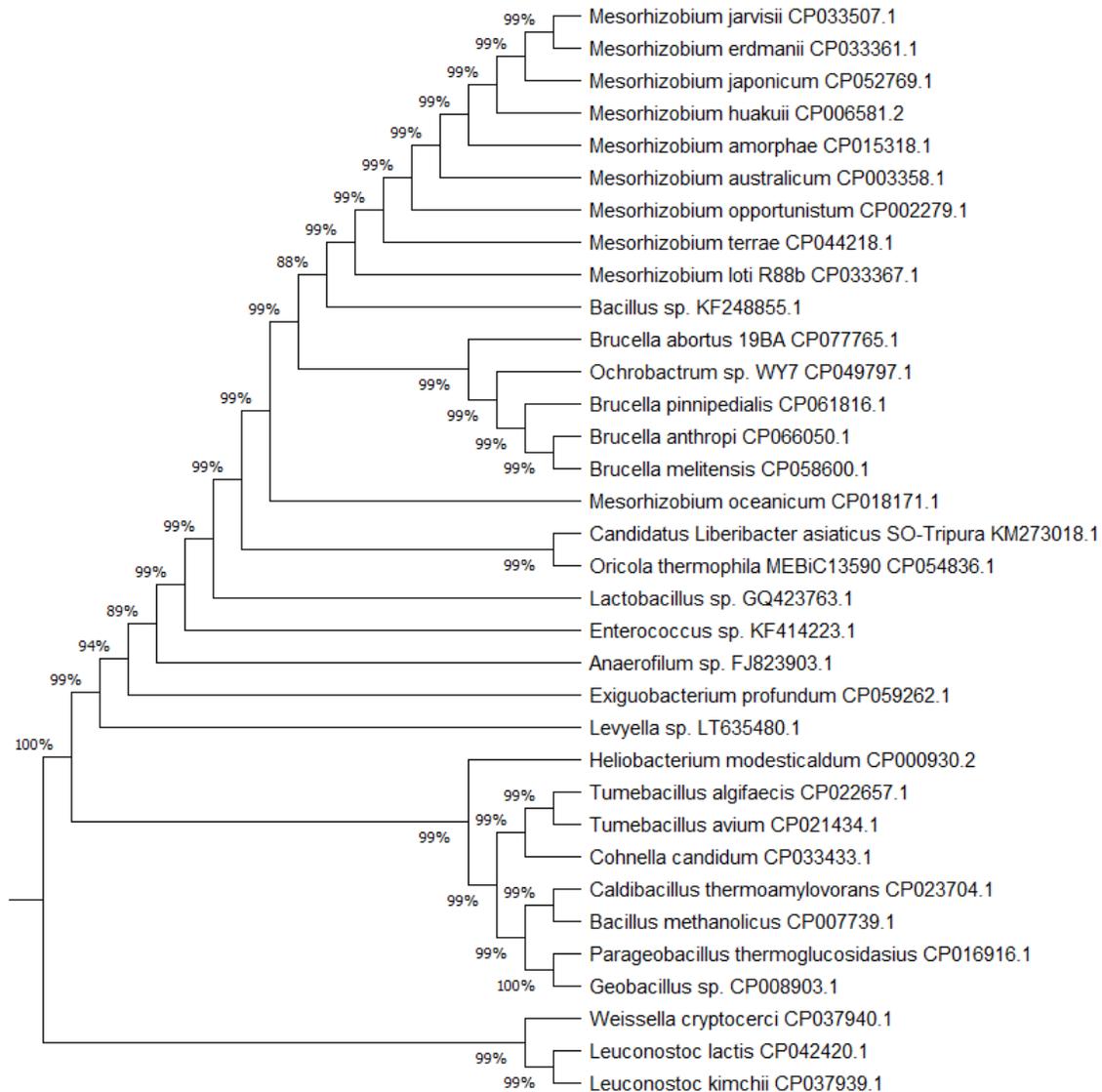
**Figura 5.** Árbol filogenético de CLs construido a partir del gen 23s mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo T92+G (Tamura 3-parameter + discrete gamma) con un BIC de 3778,882 y 2000 réplicas.



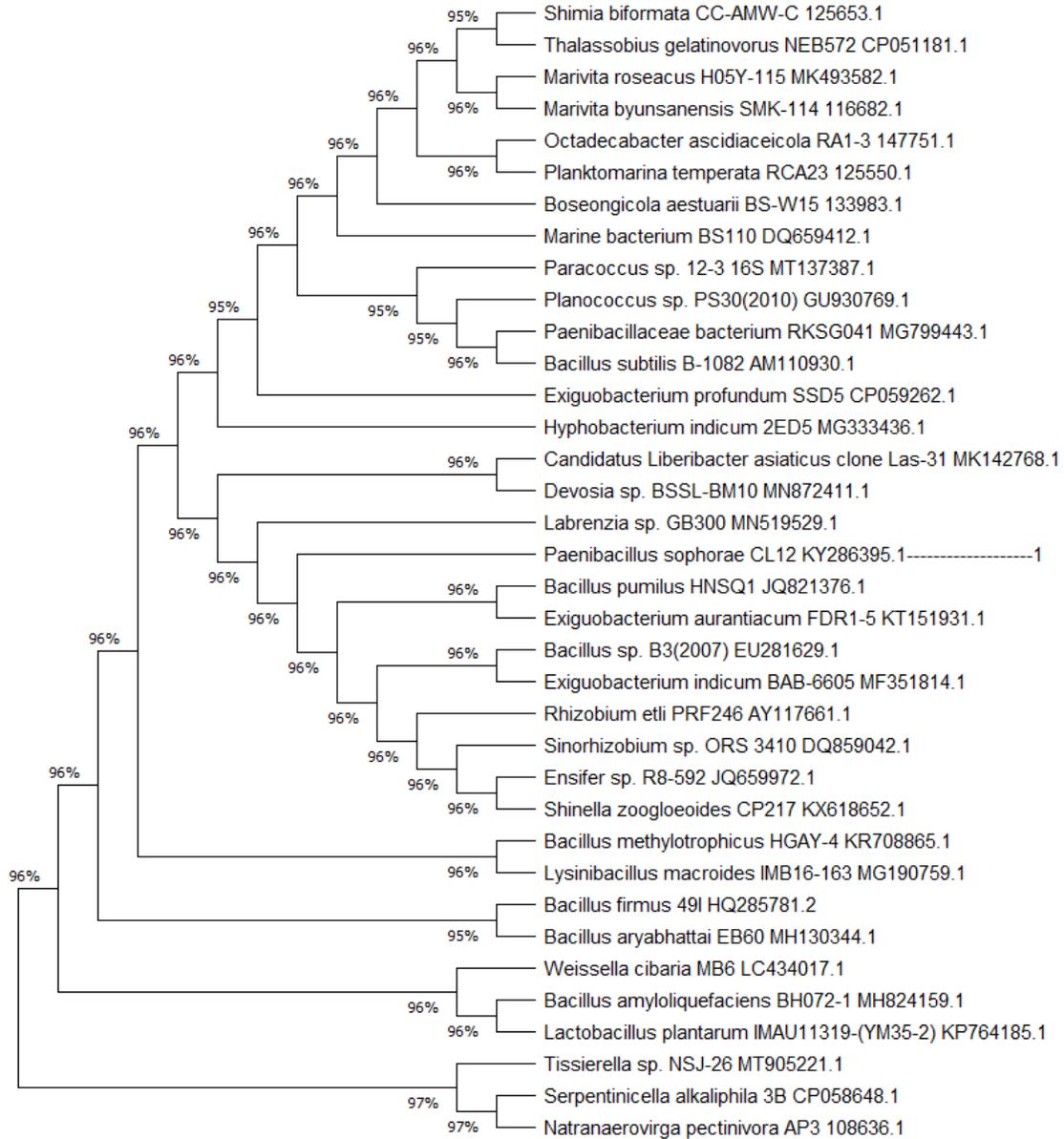
**Figura 6.** Árbol filogenético de CLas construido a partir del gen 23s mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo T92+G (Tamura 3-parameter + discrete gamma) con un BIC de 3778,882 y 2000 réplicas.



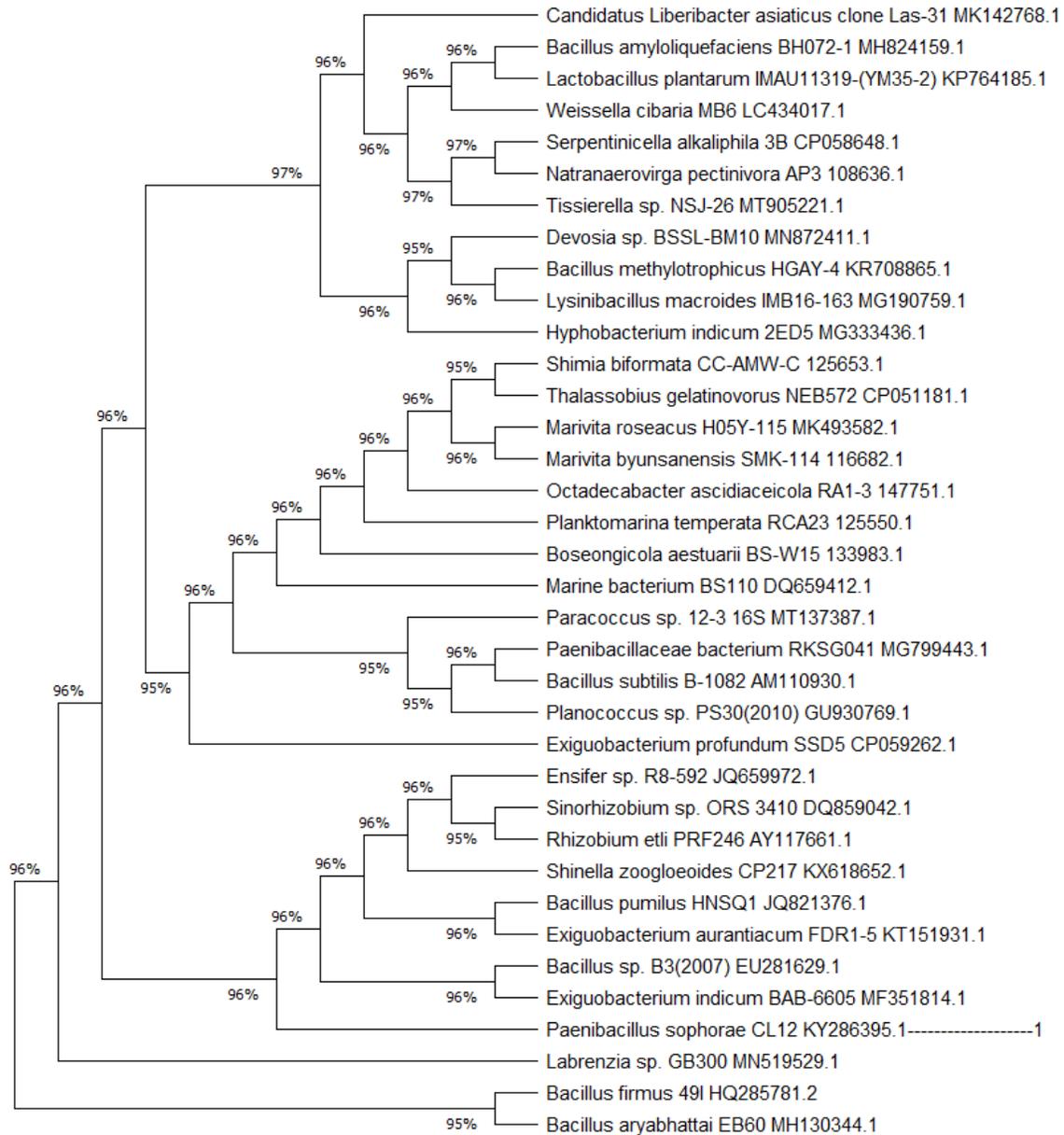
**Figura 7.** Árbol filogenético de CLas construido a partir del gen 23s mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo T92+G (Tamura 3-parameter + discrete gamma) con un BIC de 3778,882 y 2000 réplicas.



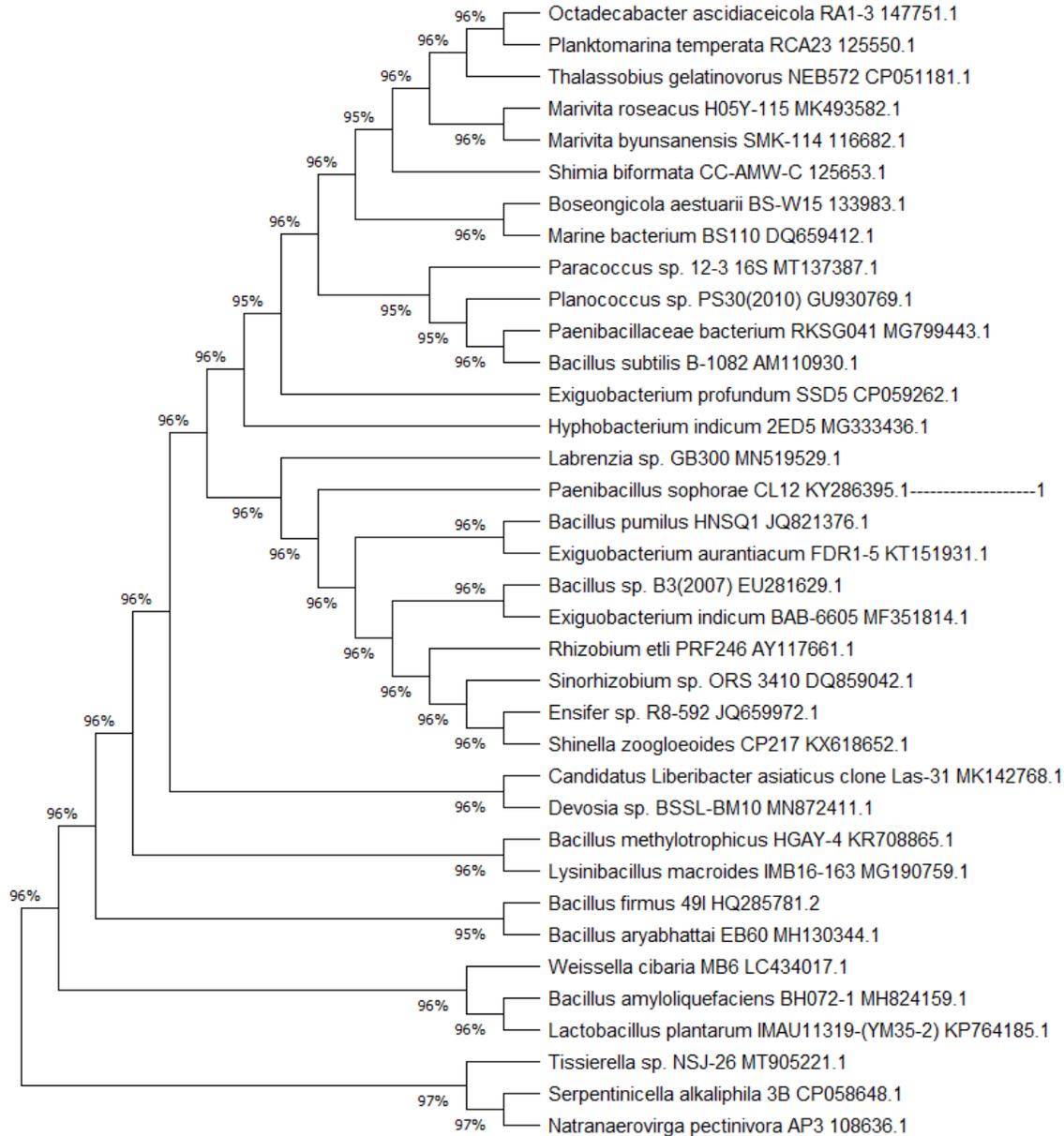
**Figura 8.** Árbol filogenético de CLas construido a partir del gen 23s mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo T92+G (Tamura 3-parameter + discrete gamma) con un BIC de 3778,882 y 2000 réplicas.



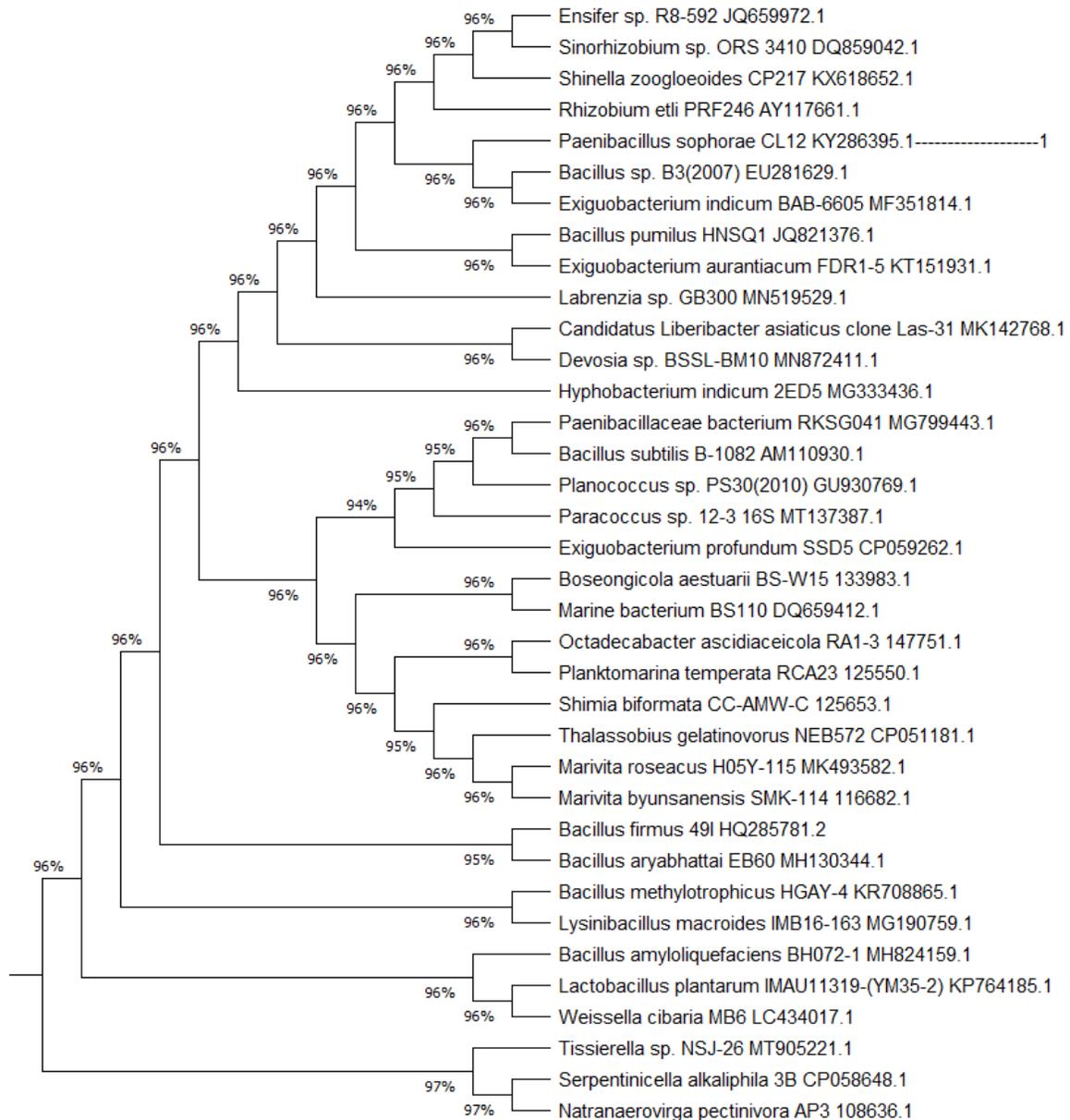
**Figura 9.** Árbol filogenético de CLs construido a partir del gen 16s mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo GTR+G+I (General time reversible model + gamma distributed with invariant sites) con un BIC de 20445,216 y 2000 réplicas.



**Figura 10.** Árbol filogenético de CLAs construido a partir del gen 16s mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo GTR+G+I (General time reversible model + gamma distributed with invariant sites) con un BIC de 20445,216 y 2000 réplicas.



**Figura 11.** Árbol filogenético de CLas construido a partir del gen 16s mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo GTR+G+I (General time reversible model + gamma distributed with invariant sites) con un BIC de 20445,216 y 2000 réplicas.



**Figura 12.** Árbol filogenético de CLAs construido a partir del gen 16s mediante el método de Máxima Verosimilitud utilizando el modelo GTR+G+I (General time reversible model + gamma distributed with invariant sites) con un BIC de 20445,216 y 2000 réplicas.

## DISCUSIÓN

Para el análisis de secuencias realizado en BioEdit y la construcción de los dendrogramas se descartaron los genes *rplA-rplJ*, *rpoB*, *nttA* y *omp* ya que las secuencias no eran de calidad, por lo tanto, los resultados no eran favorables. Esto refleja las dificultades para amplificar y secuenciar genes de CLAs. En el caso de los genes de 23S y 16S que son los más estudiados las secuencias poseen mayor calidad que se evidencia con las similitudes con las secuencias correspondientes a especies hermanas. La poca calidad de los datos se debe a que CLAs es una bacteria poco estudiada dado que es fastidiosa, es decir, no se puede cultivar en el laboratorio, entonces esto representa una dificultad a la hora de realizar investigaciones o trabajos relacionados al tema porque hay poca información básica en las bases de datos, y las metodologías son limitadas, las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizan principalmente para la identificación de la enfermedad (HLB).

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-psilidos, por lo que también realizar un árbol filogenético es un moderado 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.

En los árboles del gen 23S (Figuras 5-8) se observa que *Oricola thermophila* y *Enterococcus* sp. son las especies reportadas más cercanas a CLAs, por lo que son más emparentados con *Mesorhizobium*, lo que nos da un indicio de pensar que estas dos especies relacionadas con CLAs no sufrieron tantos cambios en la evolución. En cambio, *Anaerofilum* sp. ss la especie que más se diferenció en los eventos de especiación.

Para los árboles del gen 16S (Figuras 9-12) se observa que *Devosia* sp. es la especie más cercana de CLAs, por lo tanto, se puede decir que esta especie es la que menos sufrió cambios respecto a CLAs. *Bacillus* sp. se puede inferir está más distante de CLAs ya que esta se diversificó en el grupo de las bacterias Gram positivas del filo Firmicutes. El árbol filogenético tiene relación con trabajos anteriores (Salinas & Cantero, 2017) y a su vez con otros estudios que reportan la filogenia (Bové, 2006; Fagen et al., 2014; Nelson et al., 2013; Raddadi et al., 2011; Vegetale, 2011) para el gen ARNr 16S.

## CONCLUSIONES

La enfermedad Huanglongbing (HLB) constituye un riesgo a nivel mundial para los cultivos de cítricos y contando que no existe un método de eliminación de la enfermedad, su detección oportuna es nula y por consecuencia se procede a la eliminación del árbol.

El análisis filogénico de CLAs permite obtener información sobre las relaciones de parentesco con otras especies de bacterias. Y este es un modelo o simulación basado en las pocas secuencias disponibles, que demuestran un vacío en el conocimiento de la especie y en las dificultades técnicas para su estudio.

Los resultados del análisis evolutivo de especies relacionadas con *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediante la reconstrucción de los árboles filogenéticos de genes 23S y 16S son consistentes con los resultados de trabajos previos e informes estándar.

## 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](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](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 Pangaeon 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](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 Veterinaria 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>