

TÉCNICAS DE INOCULACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Candidatus Liberibacter asiaticus* EN LIMÓN MEXICANO

Christian Salvador
Mendoza-Hernández,
Evangelina Esmeralda
Quiñones-Aguilar,
Gabriel Rincón-Enríquez*
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.,
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL
BICENTENARIO

Norma Elena Leyva-López
CIIDIR-IPN SINALOA;

*Autor responsable:
equinones@ciatej.mx
grincon@ciatej.mx

TECHNIQUES OF INOCULATION AND QUANTIFICATION OF
Candidatus Liberibacter asiaticus IN MEXICAN LEMON

R E S U M E N

Los cítricos como el limón tienen su origen en Asia oriental, cultivándose hoy en día en la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales del planeta. En México tienen una gran importancia cultural y económica. Actualmente el limón mexicano (Lm) es amenazado por el Huanglongbing (HLB), enfermedad considerada como la más devastadora de los cítricos a nivel mundial y cuyo agente causal es la bacteria fastidiosa *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas). Debido a que CLas, no se ha logrado cultivar *in vitro* para su estudio, el manejo de la enfermedad se ha enfocado principalmente al control del vector (*Diaphorina citri* Kuwayama) sin éxito hasta el momento. Una alternativa que se está explorando en Lm, es la inducción de resistencia sistémica contra el patógeno y su evaluación mediante herramientas moleculares, bajo la hipótesis de que el empleo de inductores de resistencia, podría permitir a la planta convivir con la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estandarizar técnicas de inoculación y cuantificación de CLas en Lm. El método de PCR en tiempo real permitió detectar título desde 18 células bacterianas en 100 ng de ADN y el método de injerto con yema infectada con CLas fue el más eficiente para lograr inocular artificialmente a las planta de Lm bajo condiciones de invernadero.

Palabras clave:

Huanglongbing, Resistencia
Sistémica, Quitosano, Ácido Salicílico,
Rizobacterias

ABSTRACT: Citrus fruits like the mexican lemon have their origin in East Asia, and at present they are cultivated in most of the tropical and subtropical regions of the planet. In Mexico, they have great cultural and economic importance. At present, Mexican lemon (ML) is threatened by “Huanglongbing” (HLB), a disease considered to be the most devastating of citrus fruits worldwide. The causal agent of HLB is the fastidiosa bacterium *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). Because it has not been possible to isolate *in vitro* CLAs for study, the phytosanitary management of the disease has been focused mainly on the control of the vector (*Diaphorina citri* Kuwayama), without success at the moment. An exploratory alternative in ML is the induction of systemic resistance against the pathogen and its evaluation by molecular tools, under the hypothesis that the use of resistance inducers, could allow to the plant to coexist with the disease. Therefore, the aim of this work was to standardize techniques for inoculation and quantification of CLAs in ML. The real-time PCR method allowed detecting titer from 18 bacterial cells in 100 ng DNA and the grafting method (with bud infected with CLAs) was the most efficient to artificially inoculate the bacterium in ML plants under greenhouse conditions.

Key words: Huanglongbing, systemic resistance, chitosan, salicylic acid, rhizobacteria.

INTRODUCCIÓN

La citricultura en México, es una actividad socioeconómica de gran importancia, siendo México el cuarto país en producción de cítricos en el mundo (Miranda *et al.*, 2012) y segundo lugar en producción de limón. La superficie citrícola se encuentra distribuida en 23 estados, con una producción del 68.5, 20.5 y 5.2% correspondiente a naranja, limón mexicano (Lm; *Citrus aurantifolia*) y a limón persa junto con toronjas, mandarinas y tangerinas (Trujillo *et al.*, 2010).

La citricultura mexicana se ve amenazada por la presencia de *Diaphorina citri* Kuwayama (García-Pérez *et al.*, 2010), causante de daños en todas las zonas citrícolas en México (CONACyT-SAGARPA, sf) (Mireles-Rodríguez, 2010). La mayor amenaza en cuanto a pérdidas económicas no se debe a este insecto, sino a la enfermedad bacteriana que éste transmite denominada Huanglongbing (HLB) (Sánchez-Borja *et al.*, 2010). El agente causal del HLB, es una bacteria fastidiosa restringida al floema, Gram-negativa de la que se conocen actualmente tres especies: *C. Liberibacter asiaticus* (CLAs), *C. Liberibacter africanus* (CLaf) y *C. Liberibacter americanus* (CLam), siendo la primera vinculada al HLB en México (Jeong-Soon *et al.*, 2008; Robles *et al.*, 2010). La enfermedad, originaria de Asia, fue reportada en Sao Pablo, Brasil en 2004 y Florida, Estados Unidos en 2005 (Li *et al.*, 2006). En México se detectó

en Yucatán en 2009, dispersándose desde entonces a estados del pacífico y del centro (Arratia-Castro *et al.*, 2014). El HLB es considerado actualmente una de las enfermedades más devastadoras para los cítricos a nivel mundial (Lin *et al.*, 2010). Diversas prácticas se han desarrollado para mantener o tratar de eliminar los síntomas producidos por el HLB, así como para erradicar la bacteria de los cultivos citrícolas. El tratamiento térmico ha demostrado disminuir el título (Tt) de CLas en plántulas de cítricos, siendo posible que el estrés causado a los cítricos indujera la respuesta de defensa de las plantas, ayudando a combatir a la enfermedad (Hoffman *et al.*, 2013). Shen y *co/s.*, (2013) evaluaron la relación entre la nutrición, la producción de hormonas, la aplicación de insecticidas y de bacterias endófitas con los Tt de CLas en árboles infectados con HLB encontrando que: 1) los tratamiento con insecticidas no reducen la dispersión del HLB; 2) los Tt de CLas aumentaron en árboles que recibieron nutrientes en los dos primeros años del experimento; 3) la nutrición puede mitigar los Tt de CLas y la severidad de los síntomas del HLB después del tercer año de aplicación; 4) la aplicación de insecticidas y nutrición puede atenuar los síntomas del HLB y mantener la producción de los árboles infectados durante más tiempo. Por otro lado, inducir resistencia es definido como el realce de la capacidad defensiva de las plantas contra un amplio espectro de patógenos que es adquirida después de una apropiada estimulación (Van Wess *et al.*, 1997). La habilidad de los patógenos a infectar depende de la efectividad de sus efectores, los cuales pueden antagonizar la virulencia de un patógeno al provocar la defensa del hospedero (Mackey y McFall, 2006). En plantas se han caracterizado varios tipos de resistencia como la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) (Molina y Rodríguez-Palazuela, 2008). Utilizando inductores sinérgicos para la SAR como el quitosano y el ácido salicílico ha sido posible generar resistencia en las plantas contra enfermedades víricas, bacterianas y fúngicas (Heil y Bostock, 2002). Otra forma de resistencia es la elicitada por microorganismos benéficos en especial rizobacterias promotoras del crecimiento de la planta (PGPR), denominada “resistencia sistémica inducida” (ISR) (Mauch-Mani y Métraux, 1998).

Por lo anteriormente mencionado es necesario investigar nuevas alternativas de tratamientos contra el HLB, con el fin de propiciar soluciones eficientes a los productores de Lm. En el presente trabajo el objetivo fue establecer técnicas de inoculación y cuantificación de CLas para posteriormente evaluar la resistencia sistémica al HLB por medio de inductores foliares y biológicos.

M E T O D O L O G Í A

Para establecer las dos técnicas de inoculación y cuantificación de CLas en árboles de limón mexicano se colocaron dos experimentos en invernadero, el primero con el fin de evaluar el método de inoculación mediante injerto con yemas con síntomas de HLB, y el segundo con la finalidad de estandarizar la técnica para cuantificar el título de CLas por PCR tiempo real.

EXPERIMENTO 1.

Para evaluar, métodos de inoculación de CLas, se obtuvieron varetas de árboles de Lm con síntomas de HLB de Tecomán, Colima; el 12 de junio del 2014; a partir de los cuales se realizaron injertos de yema (13 de julio del 2014) en 210 plantas de Lm (*C. aurantifolia*) injertadas sobre *C. macrophylla* certificadas (con un año 2 meses de edad), se injertaron 2 yemas por cada uno de los pies, una en el injerto ya establecido (*C. aurantifolia*) y otra en el patrón (*C. macrophylla*). Se realizó una poda a los 15 días después del injerto y otra a los 35 días con el objetivo de promover el crecimiento del injerto de yema con CLas.

EXPERIMENTO 2.

Se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo de CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Zhang *et al.*, 1998) al 3% para lo cual se lavaron las hojas con agua destilada para posteriormente desprender la nervadura central y los peciolo de 5 hojas por muestra. Se cortaron en trozos pequeños, se liofilizaron (Lyophilizer, Labconco, Kansas City, MO) y 20 mg de las nervaduras se transfirieron a un tubo de 1.5 mL. Posteriormente se molieron con 800 μ L de buffer de extracción CTAB (3% de CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 0.2% mercapto-etanol, pH 8.0) caliente a 60°C, se prosiguió a incubar la muestra a 60°C durante 30 minutos. Se añadió cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), 4 μ L de RNasa A (100 mg mL⁻¹) y se incubaron a 37°C durante 10 min. Se precipitó el ADN con 600 μ L de isopropanol frío, se prosiguió con los lavados de la pastilla utilizando etanol al 70%, secado y resuspendido el ADN en 30 μ L de agua ultra-pura (milli-Q). La concentración de las muestras de ADN se determinó a 260 nm (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectropotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Para determinar el Tt de CLas se realizó un análisis por PCR en tiempo Real siguiendo lo descrito por Li y cols., (2006), usando una sonda Taqman y primers específicos basados en la región 16S rADN, en una reacción de 25 μ L con: 100 ng de ADN genómico, 250 nM de cada primer (HLBas/HLBr), 150 nM de sonda (HLBp) y Taq-

Man® master mixture (ABI, Foster City, CA). El protocolo de amplificación fué: 50°C durante 2 min y 95°C durante 10 min seguido de 95°C por 20 s posteriormente 50 ciclos a 95°C por 1 s y 58°C por 40 s utilizando el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California).

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N

La Figura 1 presenta de manera esquemática el proceso de inoculación de CLAs. Se taparon con plástico durante 15 días e inmediatamente fueron podadas para promover el crecimiento del injerto, así como el desarrollo y diseminación de CLAs.

Del total de las muestras injertadas aparentemente una no presentó viabilidad en ninguno de los dos injertos realizados, en 26 de ellas no mostraron viabilidad en el injerto realizado en *C. aurantifolia* y solamente tres no mostraron viabilidad en *C. macrophylla* (Figura 2), teniendo un 99.5% de viabilidad aparente.

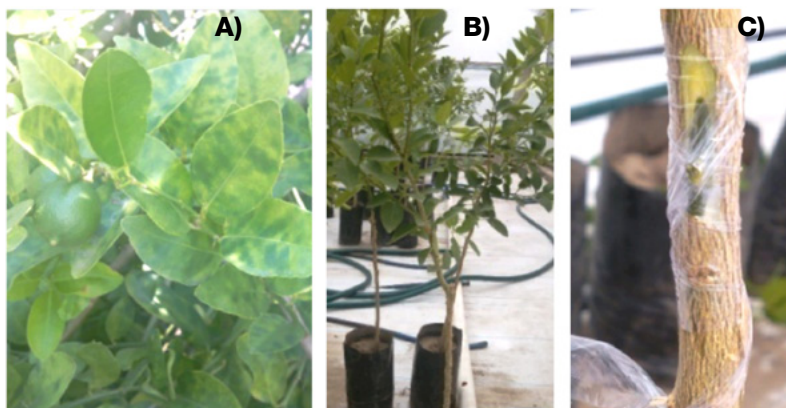
FIGURA 1.

Injerto de plantas de limón mexicano con material vegetal recolectado de Tecomán, Colima.

A) Planta con síntomas de HLB del huerto de Lm, de donde se obtuvieron las muestras para los injertos.

B) *Citrus aurantifolia* con patrón de *Citrus macrophylla* de uno a dos meses de edad, sin síntomas de HLB y certificadas.

C) Detalle del injerto de yema de Lm enfermo con HLB en plantas comerciales de limón mexicano injertadas en *C. macrophylla*.



Los títulos (Tt) bacterianos de CLAs en las muestras de Lm de las plantas infectadas con CLAs fueron muy variables, desde 18.31 hasta 4773.95 células de CLAs en 100 ng de ADN. Esta variabilidad puede ser debida a algunas de las siguientes causas: 1) comportamiento aleatorio de la distribución de CLAs en el tejido vegetal; 2) muestreo de zonas con poco o alto grado de concentración bacteriana; 3) variabilidad ambiental en los diferentes árboles muestreados. Finalmente resulta importante indicar que Li y cols., (2006) pudieron estimar a CLAs dado que el método de PCR en tiempo real no requiere que las células se cultiven y es muy específico a fragmentos de ADN característicos de CLAs. A partir de la cuantificación del Tt se diseñó un experimento para evaluar el efecto de 4 inductores de resistencia foliares y edáficos (Figura 3), sobre la evolución del Tt de CLAs durante un. Esa evaluación se encuentra en curso.

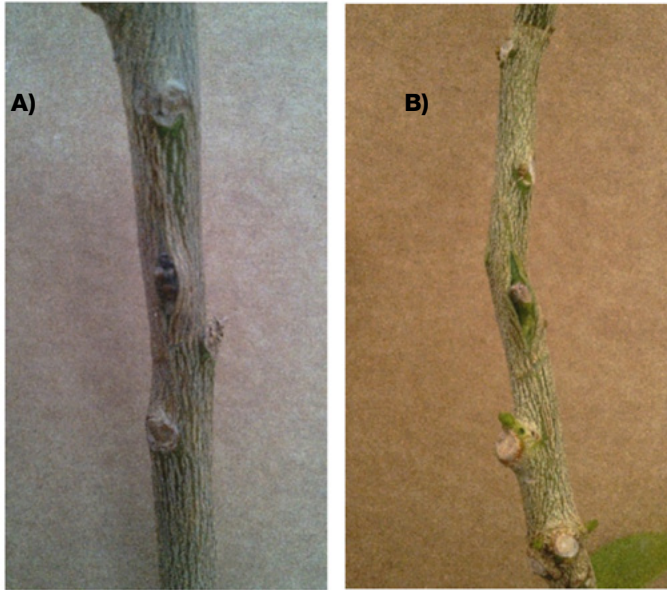


FIGURA 2.

Plantas de Lm con injertos de yemas de plantas con síntomas de HLB, de Tecomán, Colima.

A) Se muestra la yema injertada con síntomas de HLB sin viabilidad en limón mexicano (*C. aurantifolia*).

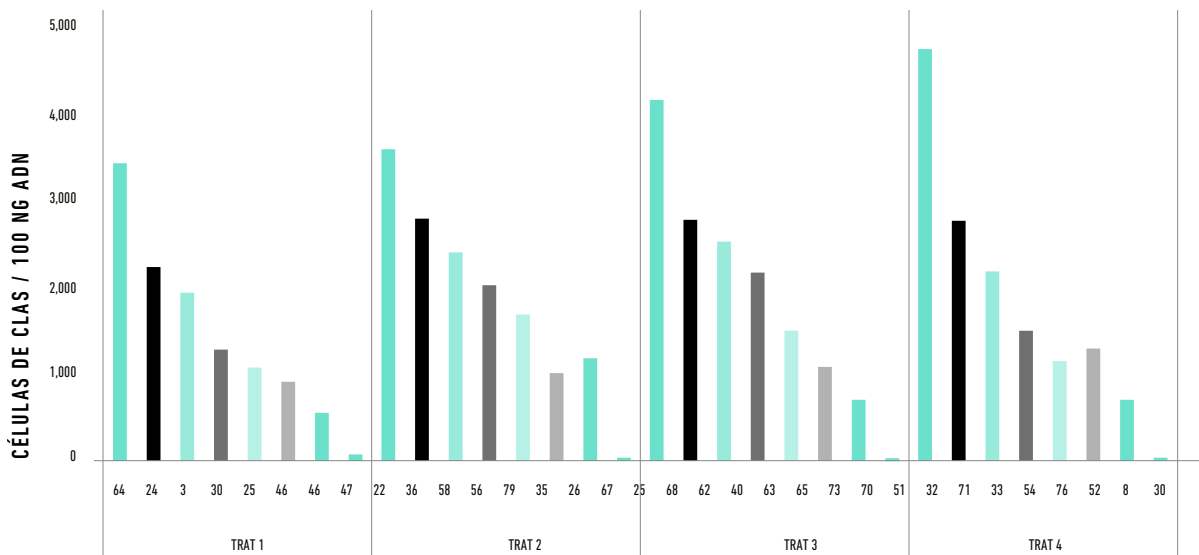
B) Yema injertada con síntomas de HLB viable el patrón de la planta comercial (*C. macrophylla*).

C O N C L U S I Ó N

Se estableció que la metodología de injerto con yema enferma con HLB es capaz de transmitir la enfermedad a árboles sanos de limón mexicano, además que el método de PCR en tiempo real permite cuantificar de manera efectiva el título bacteriano de CLas.

FIGURA 3.

Homogeneización de las unidades experimentales consistente en una maceta con una planta de limón enfermas con HLB bajo condiciones de invernadero. Cada tratamiento tiene representantes de los distintos niveles de concentración de CLas. Los números en el eje de las X representan la identificación de la unidad experimental.



HOMOGENIZACIÓN DE ÁRBOLES DE LIMÓN ENFERMO CON SÍNTOMAS DE HLB POR TRATAMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realiza con el apoyo del proyecto MICH-2012-03-193066 del Fondo Mixto Gobierno del Estado de Michoacán-CONACyT. A Ángela Paulina Arce Leal y Zeiiby G. Machuca López por el apoyo en la estandarización de la técnica de PCR en tiempo real.

P E R S P E C T I V A S

Evaluar la evolución del Tt de las plantas de Lm con más de un año con CLas y tratadas con inductores foliares y biológicos. Cuantificar la eficiencia de la transmisión de CLas en plantas de Lm injertadas e identificar tratamientos que induzcan a la planta a enfrentar efectivamente la enfermedad, manteniendo bajo el título de CLas. Así como establecer una metodología que permita realizar estudios sobre CLas.

R E F E R E N C I A S

- ARRATIA-CASTRO A A, Santos-Cervantes M E, Fernández-Herrera E, Chávez-Medina J A, Flores-Zamora G L, Camacho-Beltrán E, Leyva-López N E (2014) Occurrence of *Candidatus Phytoplasma asteris* in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection* 62: 144-151.
- CONACYT-SAGARPA (sf) Manejo de la enfermedad Huanglongbing (HLB) mediante el control de poblaciones del vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), el psílido asiático de los cítricos. 10 de Junio de 2013: [https:// sites.google.com/site/diaphorina/home](https://sites.google.com/site/diaphorina/home)
- GARCÍA-PÉREZ F, Ortega-Arenas L, Lomelí-Flores J, Romero-Nápoles J, López-Arroyo J, González-Hernández A (2010) Caracterización morfológica de psílicos asociados a cítricos en cazones. 1er Simposio Nacional sobre Investigación para el Manejo del Psílido Asiático de los Cítricos y el Huanglongbing en México. Monterrey, Nuevo León México.
- HEIL M, Bostock R (2002) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. *Annals of Botany* 89: 503-512.
- HOFFMAN M, Doud M, Williams L, Zhang M, Ding F, Stover E, Duan Y (2013) Heat treatment eliminates «*Candidatus Liberibacter asiaticus*» from infected citrus trees under controlled conditions. *Phytopathology* 103: 15-22.
- JEONG-SOON K, S. Sagaram, U Burns, J Jian-Liang L, Wang N (2008) Response of sweet orange (*Citrus sinensis*) to «*Candidatus Liberibacter asiaticus*» infection: microscopy and microarray analyses. *Phytopathology*. doi:10.1094/PHYTO-99-1-0050.
- LI W, Hartung J, Levy L (2006) Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104-115.
- LIN H, Chen C, Doddapaneni H, Duan Y, Civerolo E (2010) A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Hu. *Journal of Microbiological Methods* 81: 17-25.

- MACKEY D, McFall A (2006) MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology* 6: 1365-1371.
- MAUCH-MANI B, Métraux J (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82: 535-540.
- MIRANDA S M, López A J, Padrón C J, Velázquez M J (2012) Fitosanidad y promética de la citricultura en el valle de Apatzingan, Michoacan. In: Curti-Días, SA, Loredó-Salazar RX, Soto-Estrada A Congreso Mexicano de Investigación en Cítricos. Veracruz México.
- MIRELES-RODRIGUEZ E (2010) Fluctuación poblacional de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera:Psyllidae), *Tamarixia radiata* e *Hirstuetella citrifomis* en tres localidades de la huasteca potosina. 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo de psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México. Monterrey, Nuevo León México.
- MOLINA A, Rodríguez Palazuela P (2008) Resistencia Sistémica Inducida: ¿Una herramienta bio-ecológica? II Conferencia internacional sobre Eco-Biología del suelo y el compost. Puerto de la Cruz, Tenerife: SoilACE.
- ROBLES Gonzalez M, Velázquez MJ, Manzanilla-Ramirez M, Orozco-Santos M, Flores-Virgen R, Medina-Urrutia V (2010) Diseminación del Huanglongbing HLB en la zona productora de limón mexicano del estado de Colima. 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo de psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México. Monterrey, Nuevo León México.
- SÁNCHEZ-BORJA M, Bautista-Martínez N, Bravo-Mojica H, Romero-Nápoles J, Ramírez-Alarcón S, López-Martínez B (2010) Biología, ecología y control de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera Psyllidae). 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo de psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México. Monterrey, Nuevo León México.
- SHEN W, Cevallos-Cevallos J, Nunes da R U, Arevalo H, Stansly P, Roberts P, van Bruggen A (2013) Relation between plant nutrition, hormones, insecticide applications, bacterial endophytes, and *Candidatus Liberibacter Ct* values in citrus trees infected with Huanglongbing. *Eur J Plant Pathol*. doi:10.1007/s10658-013-0283-7.
- TRUJILLO A J, Sánchez A H, Robles G P, De la Rosa A A, Delgadillo V I, Márquez S M (2010) Antecedentes y situación actual del Huanglongbing de los cítricos en México. 1er Simposio Nacional sobre investigación para el manejo de psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México. Monterrey, Nuevo León México.
- VAN Wess S, Piterse C, Trijssenaar A, Van't W Y, Hartog F, Van Loon L (1997) Differential Induction of Systemic Resistance in *Arabidopsis* by Biocontrol Bacteria. *The American Phytopathological Society* 10: 716-724.
- ZHANG Y, Uyemoto J, Kirkpatrick B (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71: 45-50.