

# ***Candidatus* Liberibacter solananeorum-jitomate como modelo experimental para el estudio de genes asociados al Huanglongbing en limón mexicano**

María Cristina Hernández-Peraza, Ángela Paulina Arce Leal, Ana Marlenne Bojórquez-Orozco, Edgar Antonio Rodríguez-Negrete, María Elena Santos-Cervantes, Jesús Méndez-Lozano, Norma Elena Leyva-López\*. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa), Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Guasave, Sinaloa. CP: 81101, México.

\*Autor para correspondencia: neleyval@ipn.mx.

Recibido: Agosto 24, 2022.

Aceptado: Noviembre 12, 2022.

Hernández-Peraza MC, Arce APL, Bojórquez-Orozco AM, Rodríguez-Negrete EA, Santos-Cervantes ME, Méndez-Lozano J y Leyva-López NE. 2022. *Candidatus* Liberibacter solananeorum-jitomate como modelo experimental para el estudio de genes asociados al Huanglongbing en limón mexicano. Revista Mexicana de Fitopatología 40(4).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-5>

**Resumen.** El creciente impacto de bacterias restringidas al floema en cultivos de importancia económica ha llevado a un renovado interés en comprender la patogénesis a nivel genómico e histológico de estas enfermedades. El género *Candidatus* Liberibacter está asociado con enfermedades económicamente devastadoras, destacando *Candidatus* Liberibacter asiaticus (CLas) y *Candidatus* Liberibacter solanacearum (CLso) en cítricos y hortalizas. Los estudios de interacción planta-patógeno se encuentran limitados debido a la naturaleza no cultivable de las especies patogénicas del género Ca. Liberibacter, así como por la carencia de modelos experimentales. El objetivo del presente trabajo fue implementar un modelo para el estudio

de bacterias del género *Candidatus* Liberibacter, usando tomate-CLso como modelo experimental. Mediante un análisis curso temporal del proceso infectivo tomate-CLso, se determinó que existe una correlación directa entre la carga bacteriana y el desarrollo de síntomas, diferenciados en etapas temprana, intermedia y tardía. Adicionalmente, un análisis comparativo a nivel transcripcional de genes marcadores de defensa antibacteriana (PR-P1, miR160, y miR393) determinó que la respuesta de dichos genes en los patosistemas tomate-CLso y limón-CLas, son equivalentes. Los resultados demuestran que el sistema tomate-CLso puede ser utilizado como modelo para el estudio de la interacción planta y bacterias no cultivables in vitro restringidas al floema.

**Palabras clave:** *Candidatus* Liberibacter asiaticus, HLB, Zebra Chip, miRNAs.

Actualmente los fitopatógenos limitados al floema se han dispersado de manera alarmante en el mundo, aumentando su incidencia debido a los climas cada vez más cálidos y a la creciente interco-

nexión entre los sistemas agrícolas. Los métodos tradicionales de control de dichos organismos se restringen a la eliminación de plantas enfermas, tratamientos paliativos de las enfermedades (como el uso de antibióticos, termoterapia y manejo agronómico) y al uso frecuente de insecticidas para controlar a los insectos vectores que transmiten a dichos patógenos (Bendix y Lewis, 2018). Dentro de esta categoría de fitopatógenos destacan las bacterias del género *Candidatus Liberibacter*; bacterias Gram-negativas que viven como parásitos obligados limitados al floema de sus hospederos, son transmitidas por insectos vectores del género *Diaphorina* y se asocian con enfermedades de cultivos de interés agronómico en el mundo (Haapalainen, 2014). Evolutivamente, las especies patogénicas de ‘Ca. Liberibacter’ han sufrido amplias reducciones de su genoma (1.2 Mb), por lo que son altamente dependientes de sus hospederos (Naranjo *et al.*, 2019) y a la fecha no se ha logrado su cultivo in vitro. En este género destacan *Candidatus Liberibacter solanacearum* (CLso) asociado a la enfermedad de “Zebra Chip” en papa (Munyaneza, 2012) y otras enfermedades en hortalizas (Liefting *et al.*, 2009); y *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) asociado al huanglongbing (HLB) de los cítricos (Bové, 2006).

En la actualidad, el HLB es una de las enfermedades que generan mayor preocupación en el sector citrícola, ya que es considerada como la más devastadora y destructiva hasta el momento (Wang, 2019). La citricultura hasta hace poco tiempo era una actividad altamente rentable; sin embargo, con la llegada del HLB la producción se ha visto reducida, tan solo en el estado de São Paulo, Brasil, se eliminaron 55.5 millones de árboles de naranja dulce con síntomas de la enfermedad entre enero de 2005 y junio de 2019 (Bassanezi *et al.*, 2020). En Sudáfrica se reportan pérdidas en la cosecha que alcanzan hasta el 100% (Alemán *et al.*, 2007).

En Florida, desde que se detectó HLB, la superficie y el rendimiento de naranja han disminuido en un 44%, generando un aumento del 300 % en su precio (Dala-Paula *et al.*, 2018). La pérdida económica en Florida ocasionada por el HLB durante 2006-2014 fue de \$7.80 mil millones de dólares en la producción con una pérdida promedio anual de \$975 millones de dólares (Hodges *et al.*, 2014; Singerman *et al.*, 2017). En Colima, antes de la llegada del HLB el rendimiento promedio de limón superaba las 20.97 t ha<sup>-1</sup>. Esta cifra disminuyó a partir del 2011, obteniendo solo 9.43 t ha<sup>-1</sup> en el año 2014. Actualmente se ha observado una recuperación (14.26 t ha<sup>-1</sup>) (SIAP-SAGARPA, 2022), empero, esa cifra sigue representando una reducción del 32 %.

A pesar de los esfuerzos por mitigar la enfermedad, hasta la fecha no hay variedades con resistencia real, ni tratamientos efectivos para eliminar el HLB en ninguna especie de cítricos (Gao *et al.*, 2018). Por ello, se han buscado estrategias para elucidar el mecanismo regulatorio de la enfermedad, siendo las aproximaciones “ómicas” (genómica, transcriptómica, metabolómica) las más utilizadas en los últimos años (Ventura-Medina *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2022). Con la ayuda de tecnologías como RNA-Seq, actualmente es posible caracterizar el transcriptoma de plantas de manera rápida y con una mayor sensibilidad, lo que ha supuesto un cambio relevante en el estudio de plantas no modelo ante el estrés biótico y abiótico. En cítricos con HLB, se han identificado diversos genes involucrados en la biosíntesis de carbohidratos y fitohormonas que han sido inducidos en los mecanismos de defensa de la planta (Huot *et al.*, 2018). No obstante, el estudio funcional de estos genes aún se encuentra limitado a sistemas modelo como *Arabidopsis-Pseudomonas*, por lo cual se sabe poco sobre el mecanismo regulatorio en la interacción planta-patógeno en plantas con genoma no

disponible y más aún en patógenos no cultivables. El entendimiento del proceso de patogénesis en la interacción planta-bacteria se ha enfocado en sistemas de bacterias cultivables como *Pseudomonas* y *Agrobacterium*, usando modelos experimentales alternativos como *Arabidopsis thaliana* (el cual no es el hospedero natural de dichos patógenos) (Yin *et al.*, 2019). Estos sistemas experimentales han permitido avances en el desarrollo de alternativas para el manejo de fitopatógenos más complejos y de importancia económica.

La caracterización funcional de genes, tratamientos terapéuticos o preventivos en cítricos ha sido complicada debido a la vida prolongada de los árboles de cítricos y los patrones fluctuantes del desarrollo de HLB dentro de un árbol (Fletcher *et al.*, 2018). Además, la manipulación genética de los cítricos requiere tiempo y esfuerzo, lo que hace que la detección genética funcional a gran escala sea casi imposible (Huang *et al.*, 2021).

El creciente avance de los estudios transcriptómicos relacionado a la expresión de genes involucrados en la defensa contra patógenos del género *Candidatus Liberibacter* va en aumento, por lo que se requieren de modelos de estudio para conocer y validar el papel biológico de estos mecanismos de regulación. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue la implementación de un modelo experimental que permita realizar estudios sobre la interacción planta-bacteria del género *Candidatus Liberibacter*, utilizando a CLso como patógeno, y jitomate su hospedero natural, como planta modelo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Obtención del inóculo.** La fuente de inóculo de la bacteria CLso se obtuvo de tubérculos de papa de la variedad Citlali (INIFAP-5-10) con síntomas característicos de la enfermedad “Zebra Chip”.

Los tubérculos fueron cosechados en agosto del 2017 en el INIFAP Campo Experimental Valle de México, Estado de México, y proporcionados por Oswaldo Angel Rubio Covarrubias. Posterior a la ruptura de latencia con ácido giberélico a 15 ppm durante 30 min, los tubérculos brotados se trasplantaron a macetas con sustrato SOGEMIX® PG-M y Vermiculita (1:1).

**Detección y secuenciación de CLso.** Para la detección de *Candidatus Liberibacter solanacearum* se realizó extracción de ADN genómico utilizando el método CTAB (Zhao *et al.*, 1998; Arratia-Castro *et al.*, 2014). La concentración y la calidad del ADN se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Se emplearon los iniciadores OA2 y OI2c diseñados en la región 16S rRNA que amplifican un fragmento de 1160 pb (Liefing *et al.*, 2008; 2009).

Los amplicones de PCR se purificaron empleando el kit PureLink® Quick Gel Extraction (Invitrogen), siguiendo el protocolo del fabricante. Los fragmentos se clonaron utilizando el vector pGEMT- Easy (Promega, Madison, WI, EU) y se transformaron en células quimio-competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Posteriormente, se secuenciaron en Langebio de CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato, Guanajuato.

**Transmisión y dinámica del proceso infeccioso de CLso en plantas de jitomate.** Las plantas de papa detectadas como positivas para CLso por PCR se emplearon como fuente de inóculo para la propagación del patógeno por medio de injertos a plantas de jitomate. Se estableció un diseño experimental anidado donde se utilizaron 47 plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*, híbrido Maya), incluyendo 37 réplicas injertadas y 10 controles negativos. Las plantas se cultivaron bajo condicio-

nes de invernadero a una temperatura que osciló de los 25 a los 30 °C. Se colectó tejido vegetal y se fotodocumentaron los síntomas de todas las plantas a los 14, 28, 42, 56 y 70 días posteriores a la inoculación (dpi). El registro fotográfico de síntomas se realizó cada 14 días (14, 28, 42, 56 y 70 dpi). El tejido vegetal colectado se criopreservó con nitrógeno líquido para la posterior extracción de ácidos nucleicos. Para determinar el porcentaje de incidencia y seleccionar las plantas portadoras de la bacteria se realizó un análisis de PCR a los 42 dpi (etapa sintomática) usando los iniciadores OA2 y OI2c. Solo las plantas CLso-PCR positivas se incluyeron en la dinámica del proceso infeccioso de CLso en plantas de jitomate. Para la cuantificación de la bacteria por qPCR se usaron los oligonucleótidos CLsoF y CLsoR diseñados en este estudio (Cuadro 1). Se realizó una gráfica de dispersión y un análisis ANOVA con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$  en Excel.

**Cuantificación absoluta de CLso por qPCR.** Se realizaron curvas estándar con ADN plasmídico conteniendo el amplicon bacteriano OA2-OI2C de

1160 pb de la región 16SrRNA de CLso con diluciones seriales de  $10^2$  hasta  $10^7$  moléculas. La curva estándar se obtuvo mediante la regresión lineal de la gráfica generada de la representación de los valores de la concentración del estándar en  $\text{Log}_{10}$  versus el correspondiente ciclo de detección (Cq). La eficiencia del qPCR se calculó mediante la fórmula  $E = 10^{-1/m}$ , donde E es la eficiencia y m es la pendiente de la curva estándar, el porcentaje de eficiencia es obtenido mediante la fórmula  $\%E = (E-1)*100$ . Los valores de concentración se obtuvieron mediante la extrapolación de los valores de amplificación (Cq) con la correspondiente curva estándar.

Se utilizó el kit SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Foster City, CA, EE. UU.) en un termociclador de PCR en tiempo real CFX96TM (Bio-Rad). La reacción de qPCR consistió en 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 100  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido, 5  $\mu\text{L}$  de EvaGreen supermix, y 2  $\mu\text{L}$  de DNA molde (20 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ). El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial 95 °C por 30 s, seguido de 40 ciclos (95 °C por 5 s y 58 °C por 10 s). El programa de la curva de disociación fue de 60 a 95 °C con un rango de aumento de temperatura de 0.5

**Cuadro 1. Listado de iniciadores, secuencia, tamaño de amplicón y referencia.**

Nombre	Secuencia	Amplicón	Referencia
OA2	GCGCTATTTTTTAATAGGAGCGGCA	1160 pb	Li <i>et al.</i> , 2007
OI2c	GCCTCGGACTTCGCAACCCAT		
CLso-F	GTAAAGGCCTACCAAGGCTACG	165 pb	Este estudio
CLso-R	CCTAAGGCCTTCTTCACTCACG		
tomPR1-F	CCGTGCAATTGTGGGTGTC	100 pb	Casteel <i>et al.</i> , 2012
tomPR1-R	GAGTTGCGCCAGACTACTTGAGT		
EF-1F	GATTGGTGGTATTGGAAGTGTGTC	150 pb	Rotenberg <i>et al.</i> , 2006
EF-1R	AGCTTCGTGGTGCATCTC		
miR160	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG GTATTTCGCACTGGATACGACTGGCAT	55 pb	Este estudio
miR160-R	GCGGCGGTGCCTGGCTCCCTGT		
miR393	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG TATTTCGCACTGGATACGACTGGATCA	56 pb	Este estudio
miRNA393-R	GCGGCGGTCCAAAGGGATCGCAT		
Universal stem-loop RT	GTGCAGGGTCCGAGGT	NA	Varkonyi-Gasic <i>et al.</i> , 2007

°C por segundo y una cuantificación continua de fluorescencia. El análisis se realizó con dos réplicas técnicas y cinco réplicas biológicas. Los valores de la cuantificación del título del patógeno se representaron como número de células bacterianas por cada 100 nanogramos de DNA vegetal.

**Cuantificación del gen PR-P1 en plantas de jitomate infectadas con CLso.** Para evaluar los niveles de regulación genética en plantas de jitomate infectadas con CLso se seleccionó un gen marcador de defensa, *Phatogenesis-related protein-P1* (PR-P1) relacionado con la producción de ácido salicílico. Se analizaron cinco plantas sanas y cinco enfermas en etapa temprana (14 dpi) y etapa tardía (56 dpi) de la infección. Para el análisis de RT-qPCR se partió de 1000 ng ARN total extraído con el protocolo estándar del reactivo Trizol® (Thermo-Scientific), el cual se trató con DNasa I (New England Biolabs, Beverly, MA) a 37 °C durante 30 minutos, inactivando la reacción a 85 °C por 10 min. Las muestras de ARN se transcribieron inversamente en cADN utilizando M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen).

Los reactivos y condiciones de amplificación fueron las mismas a las previamente descritas empleando 2 µL de cADN por reacción. Se usaron los iniciadores tomPR1-F/tomPR1-R para cuantificar el gen PR1 (Casteel *et al.*, 2012) y el gen EF-1α (*Elongation factor 1 alpha*) (Rotenberg *et al.*, 2006) para normalizar los niveles de transcripción (Cuadro 1). La expresión relativa se determinó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). Todas las reacciones se analizaron utilizando dos réplicas técnicas. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de un solo factor con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$ .

**Cuantificación de miRNAs en los patosistemas jitomate-CLso y limón-CLas.** Se realizó un aná-

lisis comparativo de la respuesta transcripcional de los genes marcadores de defensa antibacteriana, miR160 y miR393 a los 14, 28 y 56 dpi en plantas de jitomate inoculadas con CLso y a los 56 y 112 dpi en plantas de limón inoculados con CLas. Se seleccionaron miRNAs involucrados en mecanismos de defensa antibacteriana de plantas y asociados a la respuesta de limón a la infección por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Bojórquez-Orozco, 2021). Los miR160 y miR393 están involucrados en la señalización de auxinas, un proceso descrito como mecanismo de defensa en etapas iniciales de infección frente a diversos patógenos, especialmente contra bacterias en diferentes especies vegetales (Chen *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018).

Para el diseño de iniciadores, se realizó un análisis comparativo de las secuencias de miRNAs reportados de *Solanum lycopersicum*, *Citrus sinensis* y *Arabidopsis thaliana*, descargados de la base de datos <http://www.mirbase.org/>. En limón mexicano, se obtuvieron las secuencias de miR160 y miR393 en un previo trabajo (Bojórquez-Orozco, 2021). Posteriormente se llevó a cabo el diseño de iniciadores específicos para la cuantificación de los miRNAs (Cuadro 1) de acuerdo a la metodología propuesta por Varkonyi-Gasic *et al.* (2007) utilizando el software Primer Select (DNASTAR Lasergene, Madison, WI, EE. UU.).

Para la cuantificación de los miRNAs del patosistema CLso-jitomate se utilizó el tejido colectado y criopreservado de cinco plantas sanas y cinco infectadas con CLso de tres tiempos de muestreo (14, 28 y 56 dpi), consideradas etapas tempranas y tardía en la cinética de infección. Mientras que en el patosistema CLas-limón, se empleó tejido criopreservado de un estudio previo (Arce-Leal *et al.*, 2020). A partir de tejido de limón mexicano (*C. aurantifolia*) previamente inoculado con CLas se realizó la cuantificación de la expresión de los

miRNAs a las 56 y 112 dpi, con cinco réplicas biológicas cada uno y usando como control tejido las correspondientes plantas sanas colectadas en los mismos puntos de muestreo (56 y 112 dpi).

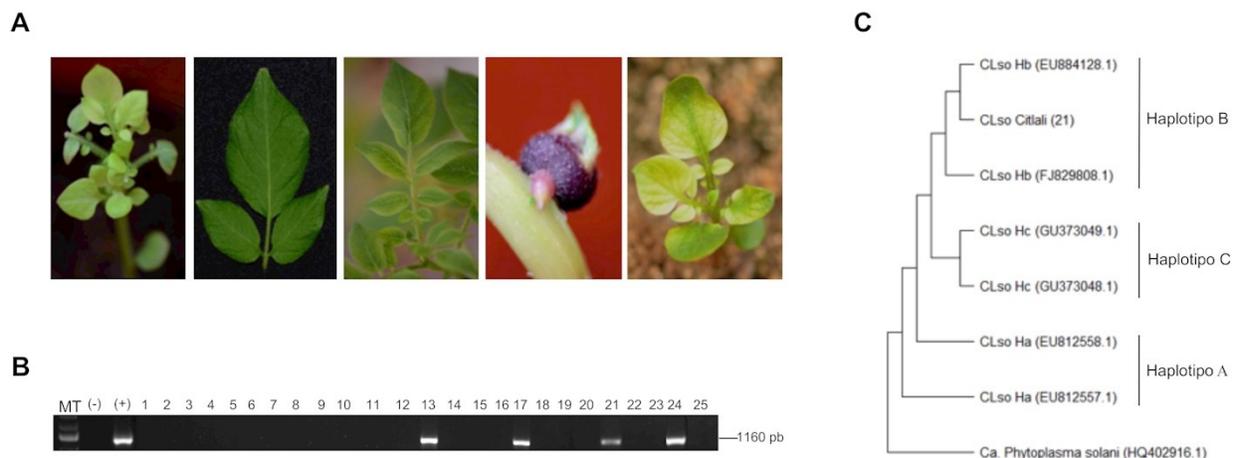
El ARN total se extrajo de manera individual de cada una de las plantas con el reactivo Trizol (Thermo-Fisher) y posteriormente se trataron con DNasa I (New England Biolabs, Beverly, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa de miRNA stem-loop se realizó de acuerdo con lo descrito por Varkonyi-Gasic *et al.* (2007), utilizando 500 ng de muestra de ARN total y la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen).

El análisis cuantitativo qPCR se realizó utilizando SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Foster City, CA, EE. UU.) de acuerdo al protocolo anteriormente descrito. Los niveles de expresión de los miRNAs se obtuvieron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). El valor de cambio de expresión "Fold Change", se obtuvo a partir de

la relación de expresión entre la muestra inoculada con la bacteria frente a la muestra control (planta sana). Todas las reacciones de qPCR se analizaron usando dos réplicas técnicas. Los datos se analizaron mediante un análisis ANOVA de un solo factor con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$ .

## RESULTADOS

**Fuente de inóculo.** Un total de 25 tubérculos de papa (var. Citlatli) se brotaron y el desarrollo de las plantas se documentó. Cuatro de las 25 plantas desarrollaron síntomas típicos de la enfermedad de "Zebra Chip", que incluyen proliferación de brotes axilares, amarillamiento, clorosis, tubérculos aéreos, acortamiento de entrenudos y hojas de coloración morada-roja "punta morada" (Figura 1A). El ADN total proveniente de las 25 plantas se utilizó como molde para la detección molecular de CLso



**Figura 1. Caracterización de la fuente de inóculo de CLso proveniente de tubérculos de papa de la variedad Citlatli.** Panel A, sintomatología observada en plantas PCR-positivas a CLso. Panel B, detección de CLso por PCR con los oligonucleótidos OA2/OI2C (1160pb) en plantas de papa. MT marcador de peso molecular; (-), control negativo de PCR; (+), control positivo de PCR en forma de DNA plasmídico; 1-25, plantas provenientes de tubérculos sintomáticos a "Zebra Chip". El tamaño del amplicón esperado es indicado. Panel C, Relación filogenética del aislado de CLso Citlatli-21 con aislados previamente reportados, basado en secuencias parciales del DNA ribosomal 16S. La reconstrucción filogenética se realizó mediante el método Neighbor-Joining (Bootstrap valores de arranque 1000) usando el modelo Tamura-Nei en el software MEGA X.

por PCR, resultando positivas las muestras 13, 17, 21 y 24 (Figura 1B). La identidad de CLso aislado Citlali-21 se confirmó por secuenciación, encontrándose un porcentaje de similitud del 99% con el aislado de CLso YARL1 (Número de accesión en el GenBank: KU588194.1). El análisis filogenético del aislado CLso Citlali-21 y diferentes aislados pertenecientes a distintos haplotipos depositados en las bases de datos mostró que pertenece al haplotipo B (Figura 1C).

Para confirmar la viabilidad de la fuente de inóculo, se utilizó tejido de la planta original infectada para transmitir la bacteria por injerto a plantas de papa, observándose nuevamente los síntomas asociados al “Zebra Chip” desde los 24 dpi, observándose a las plantas muy débiles y con rápida senescencia alrededor de los 40 dpi (Figura 2A). A nivel molecular, se detectó CLso por PCR en dos de tres submuestras de tres plantas analizadas a los 24 dpi (Figura 2B), confirmándose así la correlación entre los síntomas observados y la presencia del patógeno.

**Patosistema jitomate-CLso.** 27 de las 37 plantas inoculadas por injerto en plantas de jitomate se detectó por PCR a CLso desde los 14 dpi, a pesar de que ninguna de las plantas presentó síntomas (datos no mostrados). Los primeros síntomas se presentaron a los 28 dpi (Figura 3).

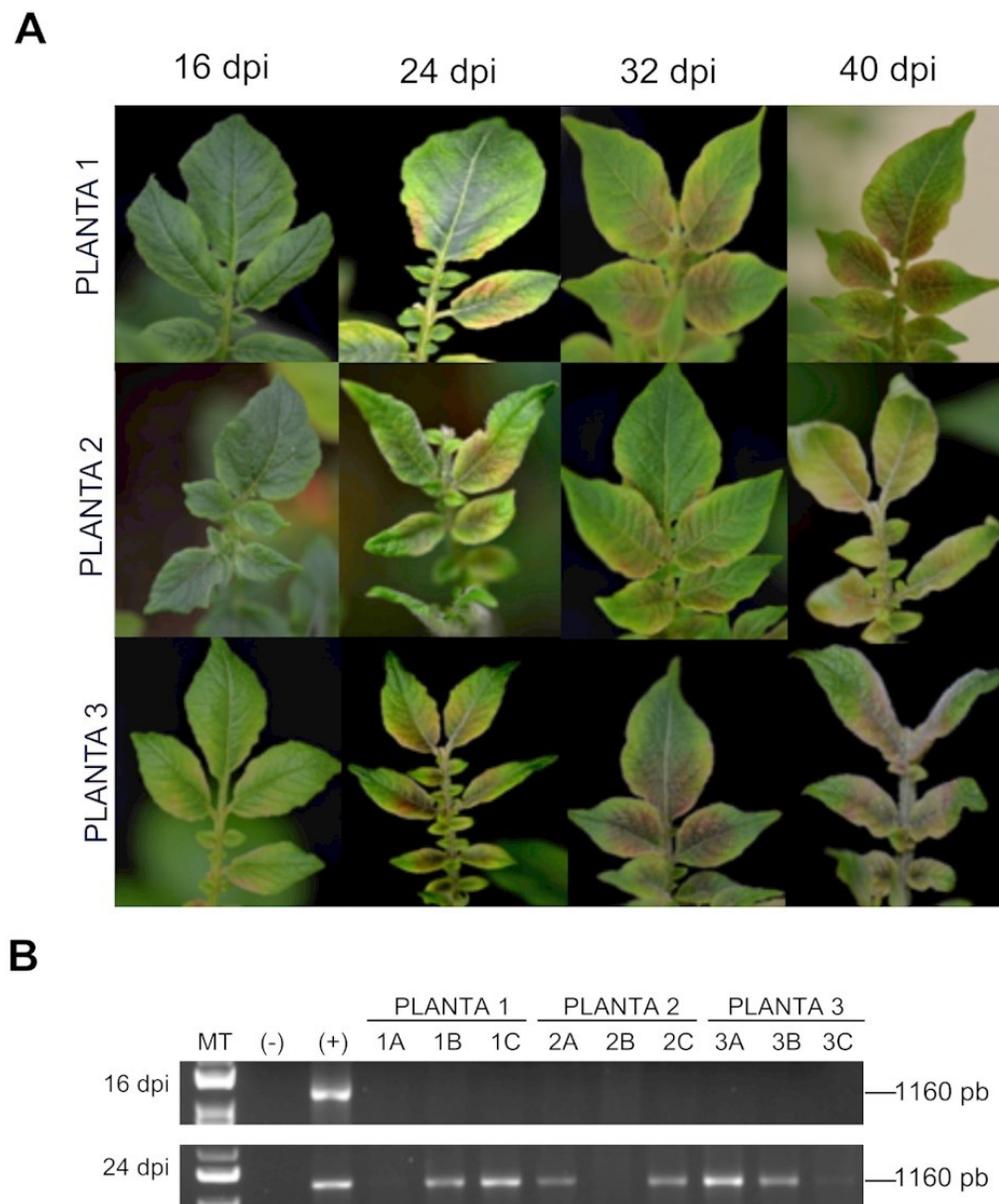
**Dinámica del proceso infeccioso de CLso en jitomate.** Para determinar la dinámica del proceso infeccioso en el patosistema jitomate-CLso se cuantificó la bacteria por qPCR a los 14, 28, 42, 56 y 70 dpi de todas las plantas identificadas como positivas por PCR (27/37). El título bacteriano se determinó de manera absoluta mediante una curva estándar construida con concentraciones seriales (1,00E+02 a 1,003+E08 moléculas) del amplicón de 1160 pb de gen 16S rRNA de CLso. Este ensayo

consistió en 27 réplicas biológicas (plantas CLso PCR positivas) y 10 controles negativos, con dos réplicas técnicas en todos los casos, obteniendo una eficiencia del 94%,  $R^2=0.999$  y la ecuación de la curva de  $y=-3.5082x+37.667$ .

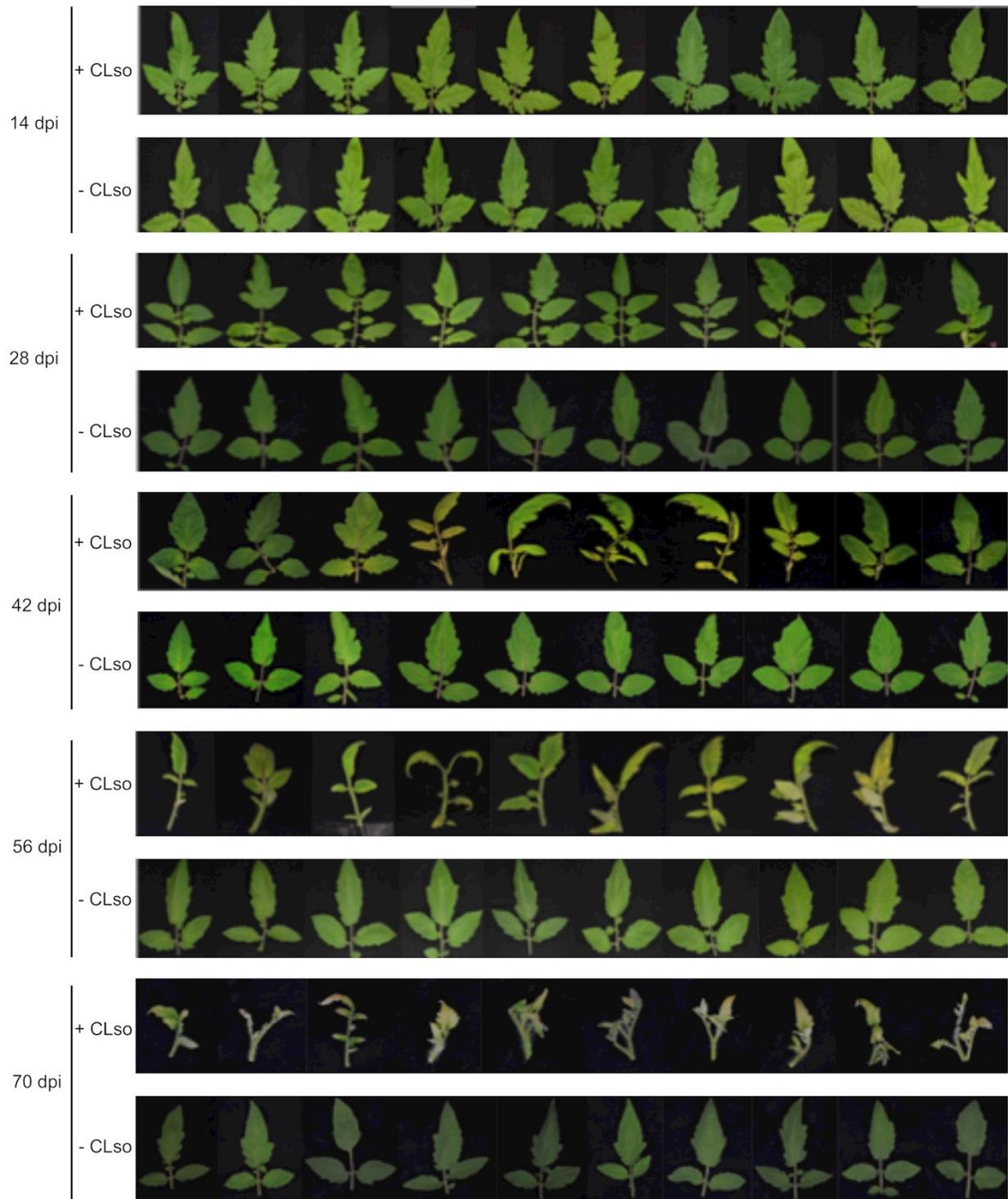
Durante el desarrollo del proceso infeccioso de CLso en jitomate se observó un título bacteriano ( $t$ ) (indicando la desviación estándar,  $\sigma$ ) ascendente con respecto al tiempo de muestreo y presencia de síntomas (Figuras 3 y 4A). A los 14 dpi se obtuvo un promedio de  $1.21E+03$  células ( $\sigma \pm 8.88E+02$ ), a los 28 dpi  $9.53E+03$  células ( $\sigma \pm 9.83E+03$ ), a los 46 dpi  $1.36E+04$  ( $\sigma \pm 9.36E+03$ ), a los 56 dpi  $1.74E+05$  ( $\sigma \pm 1.24E+05$ ) y finalmente a los 70 dpi  $2.08E+05$  ( $\sigma \pm 1.43E+05$ ). El análisis ANOVA arrojó un valor de  $P = 0.001$ , siendo menor al valor de  $\alpha=0.05$ , lo que sugiere que las diferencias entre algunas de las medias son estadísticamente diferentes separándolos en dos grupos mediante una prueba de Tukey con el 95% de confianza, grupo A (14, 28 y 42 dpi) y grupo B (56 y 70 dpi) (Figura 4A). Considerando los resultados de qPCR y los síntomas observados, se estimó que la etapa temprana del desarrollo de la enfermedad fue a los 14 dpi, etapa intermedia a los 28 y 42 dpi y tardía a los 56 y 70 dpi.

#### **Expresión del gen marcador de defensa PR-P1.**

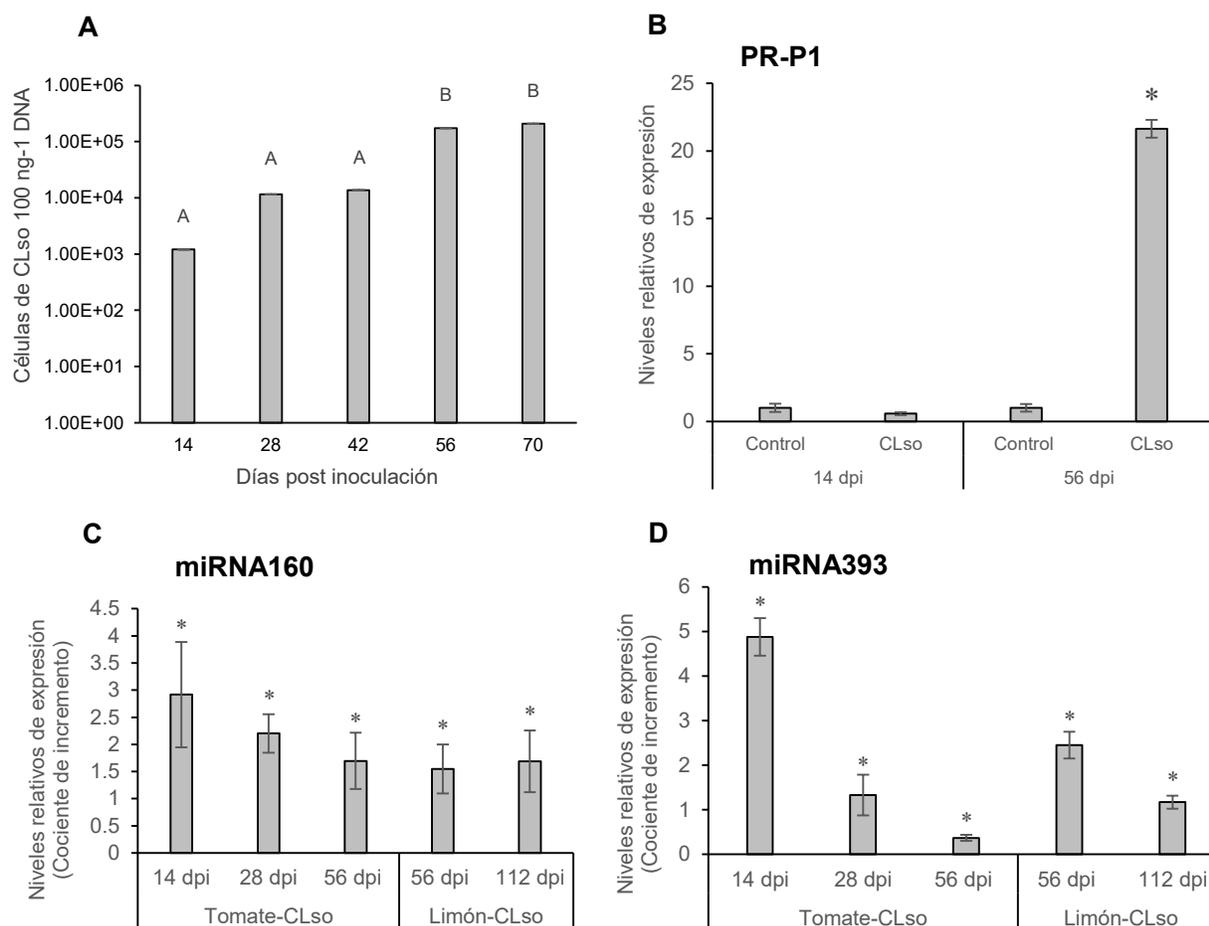
Para validar a nivel molecular la respuesta del jitomate a la infección por CLso, en este estudio se determinó la expresión del gen marcador de defensa, *Phatogenesis-related protein P1* (PR-P1) relacionado con la producción de ácido salicílico en la etapa temprana (14 dpi) y etapa tardía (56 dpi) de la infección de CLso en jitomate por PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos muestran que el gen PR-P1 presentó una inducción exponencial significativa de ~20 veces mayor con relación al control a los 56 dpi (Figura 4B).



**Figura 2. Transmisión de CLso a plantas de papa.** Para confirmar la viabilidad de la fuente de inóculo, CLso fue inoculado por injerto a plantas de papa variedad 302285.27 libre de patógenos (proveniente de cultivo *in vitro*). Panel A, sintomatología observada en las plantas de papa (tres plantas independientes en diferentes puntos del proceso infeccioso (16, 24, 32 y 40 dpi). Panel B, detección por PCR con los oligonucleótidos OA2/OI2C (1160pb) en plantas de papa inoculadas a los 16 y 24 dpi. MT marcador de peso molecular; (-), control negativo de PCR (coctel sin molde); (+), control positivo de PCR en forma de DNA plasmídico; 1A, 1B, 1C, submuestras de Planta 1; 2A, 2B, 2C, submuestras de Planta 2; 3A, 3B, 3C, submuestras de Planta 3. El tamaño del amplicón esperado es indicado.



**Figura 3. Implementación del patosistema jitomate-CLso.** En la figura se muestra la sintomatología asociada a CLso en plantas de jitomate durante 70 días posteriores a la inoculación y sus respectivos controles sanos en cada tiempo de muestreo (14, 28, 42, 56 y 70 dpi).



**Figura 4. Dinámica del proceso infeccioso de CLso en plantas de jitomate y respuesta transcripcional de genes de defensa.** Panel A, cuantificación CLso por PCR en tiempo real a los 14, 28, 42, 56 y 70 dpi. El título bacteriano fue determinado de manera absoluta mediante una curva estándar construida con concentraciones seriales de DNA plasmídico que contiene el fragmento de 1160 pb de gen 16S rRNA de CLso. Las letras sobre las barras indican grupos con diferencias estadísticamente significativas. Panel B, cuantificación del gen *Pathogenesis-related protein P1* (PR-P1) en la etapa temprana (14 dpi) y etapa tardía (56 dpi) del proceso infeccioso. El asterisco \* marca diferencias significativas. Páneles C y D, cuantificación de miR160 y miR393 de modo comparativo en plantas de jitomate infectadas con CLso y de limón infectadas con CLas en etapas tempranas y tardías de la infección en cada sistema. Las barras representan los cocientes de incremento de expresión en cada tratamiento contra su respectivo control, los asteriscos representan diferencias significativas con un valor de significancia de  $\alpha=0.05$ .

**Expresión diferencial de miRNAs en los patosistemas jitomate-CLso y limón-CLas.** Los resultados mostraron una inducción diferencial asociada a la infección en ambos casos. Para el patosistema jitomate-CLso se observó que ambos miRNAs presentaron una inducción de la expresión en los tres

tiempos de muestreo analizados, observándose la mayor inducción en la etapa temprana (asintomática) del desarrollo de la enfermedad, a los 14 dpi. En el patosistema limón-CLas, los niveles de expresión de miRNA160 y miR393 aumentaron significativamente ( $P<0.05$ ) tanto a los 56 dpi (etapa asin-

tomática) como a los 112 dpi (etapa sintomática) en comparación con plantas sanas (Figura 4 C y D).

## DISCUSIÓN

En el proceso de la elucidación de los mecanismos moleculares que gobiernan las interacciones planta-patógeno, uno de los principales cuellos de botella es el contar con modelos experimentales adecuados que permitan abordar de modo integral (bioquímico, genético y genómico) el mayor número posible de preguntas biológicas. En el caso de la interacción planta-bacteria, sistemas experimentales que incluyen bacterias cultivables de los géneros *Pseudomonas* y *Agrobacterium* usando principalmente como hospedador artificial a *Arabidopsis thaliana*, han permitido generar un amplio conocimiento de los mecanismos de defensa y de la patogénesis, siendo estos muchas veces extrapolables a patosistemas naturales de importancia agrícola (Yin *et al.*, 2019). Por otro lado, recientemente las aproximaciones masivas denominadas “ómicas” han acelerado y profundizado el conocimiento de la interacción planta-bacteria en los sistemas antes mencionados; sin embargo, en el caso de sistemas no modelo dichos estudios se ven limitados. En este sentido, las a-proteo bacterias no cultivables restringidas al floema del género *Candidatus Liberibacter* han cobrado una alta importancia en el mundo debido al alto impacto que causan en distintos cultivos de interés agrícola (Haapalainen, 2014). De modo específico, CLso asociado a la enfermedad “Zebra Chip” en papa (Munyaneza *et al.*, 2012) y otras hortalizas incluyendo el jitomate (Liefiting *et al.*, 2009); y *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs) asociado al huanglongbing (HLB) de los cítricos (Bové, 2006) destacan como los agentes causales que demandan una urgente generación de modelos para su estudio y potencial gene-

ración de estrategias de manejo. CLso y CLAs están asociadas a enfermedades en plantas de naturaleza diferente, siendo en el caso del HLB causado por CLAs en cítricos, de difícil manejo experimental debido al tamaño de los árboles, aunado a extensos tiempos de desarrollo de la enfermedad y la limitada disponibilidad de herramientas genéticas y moleculares para su estudio. Caso contrario de CLAs en papa y jitomate, donde es posible infectar y manejar una gran cantidad de plantas a la vez, aunado que en el caso particular del jitomate existen diversas herramientas genómicas (genoma, transcriptoma, epigenoma) y moleculares (vectores de transformación y para genética directa y reversa) disponibles en <https://solgenomics.net/>.

Adicionalmente, de modo interesante, ambas bacterias (CLso y CLAs) comparten una alta similitud y concordancia sintética a nivel de su genoma básico: 867 proteínas conservadas y 531 proteínas con un porcentaje de similitud > 70 % (Lin *et al.*, 2011), lo cual sugiere que ambos patosistemas pueden ser comparativos y extrapolables en diversos procesos y rutas genéticas y metabólicas.

De acuerdo con lo anterior, en este proyecto se implementó un modelo para el estudio de bacterias del género *Candidatus Liberibacter*, usando jitomate-CLso como modelo experimental. Inicialmente, se analizó a nivel fenotípico un total de 25 plantas de papa provenientes de tubérculos independientes presuntamente infectados con CLso, lográndose identificar los síntomas del “Zebra chip” en algunas de ellas. La asociación fenotípica de la enfermedad con el agente causal se validó a nivel molecular mediante PCR, secuenciación, y análisis filogenético, confirmando la presencia de CLso específicamente perteneciente al haplotipo B. Estos resultados concuerdan con reportes previos que identificaron al haplotipo B de CLso como el predominante en los campos comerciales de papa en Estados Unidos y México (Munyaneza, 2012). Posteriormente, para

evaluar la viabilidad de la fuente de inóculo, la planta con el aislado denominado CLso Citlali-21 se utilizó para ensayos de transmisión por injerto a plantas de papa, resultando en un 100 % de transmisión, corroborado fenotípica y molecularmente por PCR. Una vez determinada la viabilidad de la fuente de inóculo CLso Citlali-21 se realizó un ensayo curso temporal de infección de plantas de jitomate inoculadas con yemas provenientes de papas CLso positivas. El jitomate se seleccionó como modelo de estudio por la disponibilidad de herramientas biotecnológicas antes mencionadas, aunado a que la viabilidad de injerto entre papa y jitomate ha sido previamente demostrada (Peres *et al.*, 2005). Un total de 37 plantas de jitomate fueron inoculadas y la eficiencia de infección se evaluó por PCR punto final, resultando en un 75 % (27/37) de eficiencia de transmisión. El desarrollo de la enfermedad se documentó fotográficamente en las plantas CLso positivas a los 14, 28, 42, 56, y 70 dpi, resultando en una progresión de la sintomatología proporcional al tiempo, lográndose diferenciar tres etapas principales: 1) Etapa temprana con sintomatología ligera (14 y 28 dpi), 2) etapa intermedia con síntomas moderados (42 y 56 dpi), y 3) etapa tardía con sintomatología severa (70 dpi). Adicionalmente, el título de CLso se determinó por qPCR, encontrándose que existe una correlación entre la intensidad de los síntomas y la carga bacteriana. Esta observación concuerda con distintos sistemas de interacción planta-patógeno donde dicho fenómeno está ampliamente descrito, incluyendo el patosistema limón-CLso (Arce-Leal *et al.*, 2020). Estos resultados, muestran que el patosistema jitomate-CLso presenta etapas de infección perfectamente diferenciables, y cargas bacterianas homogéneas de modo similar al patosistema limón-CLso, posicionándolo como un buen modelo biológico para estudios intra e inter específicos. Posteriormente, para validar

a nivel molecular la respuesta del jitomate ante la infección de CLso se determinó la respuesta a nivel transcripcional del gen marcador PR-P1 de jitomate, el cual está involucrado en la señalización por ácido salicílico en respuesta a patógenos, incluidas las bacterias (Casteel *et al.*, 2012); obteniéndose una inducción significativa a los 56 dpi en plantas infectadas con CLso comparadas con los controles de plantas sanas. Este resultado demuestra que una vez establecida la infección y los síntomas de la enfermedad se han presentado, la planta genera las respuestas defensivas esperadas.

Finalmente, para ahondar en la posibilidad de usar el patosistema jitomate-CLas de modo extrapolable al patosistema limón-CLas, se realizó un ensayo comparativo de la respuesta transcripcional de dos genes marcadores de defensa antibacteriana que incluyen a los micro RNAs miR160 y miR393. Ambos micro RNAs son reguladores negativos del metabolismo de auxinas, y en el caso de *Pseudomonas* y *Agrobacterium* ha sido demostrado que su inducción está molecularmente relacionada con la respuesta antibacteriana por parte de la planta hospedadora (Peláez y Sánchez 2013). Los niveles de miR160 y miR393 se determinaron en etapas temprana y tardía de la infección, tanto en plantas de jitomate infectadas con CLso como en plantas de limón infectadas con CLas, tomando en cuenta que por la naturaleza de las plantas hospedadoras para el caso de jitomate 14, y 28 dpi se consideran etapas tempranas y 56 dpi etapa tardía, mientras que para limón 56 dpi es etapa temprana y 112 dpi etapa tardía. Los resultados demuestran que en ambos sistemas existe un incremento de expresión estadísticamente significativo de ambos miRNAs tanto en etapas tempranas como tardías y que presentan comportamientos de respuesta similares entre ambos sistemas.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos del análisis fenotípico, desarrollo de síntomas, carga bacteriana y respuesta defensiva a nivel transcriptómico, demuestran que el patosistema jitomate-CLso representa un atractivo modelo de interacción planta-bacteria y que los resultados obtenidos pueden ser extrapolables a sistemas más complejos como limón-CLas, dejando así las bases y herramientas para estudios posteriores que permitan generar estrategias de control de enfermedades devastadoras actualmente causadas por bacterias del género *Candidatus* Liberibacter.

## LITERATURA CITADA

- Alemán J, Baños H and Ravelo J. 2007. *Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción citrícola. *Revista de Protección Vegetal* 22(3):154-165. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522007000300003&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522007000300003&lng=pt&nrm=iso)
- Arce-Leal AP, Bautista R, Rodríguez-Negrete EA, Manzani-lla-Ramírez MÁ, Velázquez-Monreal JJ, Santos-Cervantes ME, Méndez-Lozano J, Beuzón CR, Bejarano ER, Castillo AG, Claros MG and Leyva-López NE. 2020. Gene expression profile of mexican lime (*Citrus aurantifolia*) trees in response to huanglongbing disease caused by *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Microorganisms* 8 (4):528. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040528>.
- Arratia-Castro AA, Santos-Cervantes ME, Fernández-Herrera E, Chávez-Medina JA, Flores-Zamora GL, Camacho-Beltrán E, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE. 2014. Occurrence of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection* 62:144-151. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>.
- Bassanezi RB, Lopes SA, de Miranda MP, Wulff NA, Volpe HXL and Ayres AJ. 2020. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 45:251-264. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00343-y>
- Bendix C and Lewis JD. 2018. The enemy within: phloem-limited pathogens. *Molecular Plant Pathology* 19(1):238-254. <https://doi.org/10.1111/mpp.12526>
- Bojórquez-Orozco AM. 2021. miRNAs expresados diferencialmente durante la infección por *Candidatus* Liberibacter asiaticus en limón mexicano. Instituto Politécnico Nacional. 92p.
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88(1):7-37. <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>
- Casteel CL, Hansen AK, Walling LL, and Paine TD. 2012. Manipulation of plant defense responses by the tomato psyllid (*Bactericera cockerelli*) and its associated endosymbiont *Candidatus* Liberibacter psyllaous. *PLoS ONE* 7(4):e35191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035191>
- Chen Z, Hu L, Han N, Hu J, Yang Y, Xiang T and Wang L. 2014. Overexpression of a miR393-resistant form of transport inhibitor response protein 1 (mTIR1) enhances salt tolerance by increased osmoregulation and Na<sup>+</sup> exclusion in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 56 (1): 73-83. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu149>
- Dai X, Zhuang Z and Zhao PX. 2018. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Research* 46 (W1):W49-W54. <https://doi.org/10.1093/nar/gky316>
- Dala-Paula BM, Plotto A, Bai J, Manthey JA, Baldwin EA, Ferrarezi RS and Gloria, MBA. 2018. Effect of Huanglongbing or greening disease on orange juice quality, a review. *Frontiers in Plant Science* 9:1976. doi: 10.3389/fpls.2018.01976
- Fletcher J, Berenbaum M, Gray S, Groves R, Scorza R, Triplett L, Trumble J, Yang B. 2018. Review of the citrus greening research and development efforts supported by the Citrus Research and Development Foundation: Fighting a ravaging disease. Washington DC: National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25026>.
- Gao S, Yu D, Meng X and Zhang F. 2018. Global dynamics of a stage-structured Huanglongbing model with time delay. *Chaos, Solitons & Fractals* 117:60-67. <https://doi.org/10.1016/j.chaos.2018.10.008>
- Haapalainen M. 2014. Biology and epidemics of *Candidatus* Liberibacter species, psyllid-transmitted plant-pathogenic bacteria. *Annals of Applied Biology* 165(2):172-198. <https://doi.org/10.1111/aab.12149>
- Hodges AW, Rahmani M, Stevens TJ and Spreen TH. 2014. Economic impacts of the Florida citrus industry in 2012-13. Final sponsored project report to the Florida Department of Citrus. Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida, Gainesville, FL. [https://fred.ifas.ufl.edu/pdf/economic-impact-analysis/Economic\\_Impacts\\_Florida\\_Citrus\\_Industry\\_2012-13.pdf](https://fred.ifas.ufl.edu/pdf/economic-impact-analysis/Economic_Impacts_Florida_Citrus_Industry_2012-13.pdf)
- Huang CY, Niu D, Kund G, Jones M, Albrecht U, Nguyen L, Bui C, Ramadugu C, Bowman KD, Trumble J and Jin H. 2021. Identification of citrus immune regulators involved in defence against Huanglongbing using a new functional screening system. *Plant Biotechnology Journal* 19(4):757-766. doi: 10.1111/pbi.13502
- Huot OB, Levy JG and Tamborindeguy C. 2018. Global gene regulation in tomato plant (*Solanum lycopersicum*) respon-

- ding to vector (*Bactericera cockerelli*) feeding and pathogen (*Candidatus Liberibacter solanacearum*) infection. *Plant Molecular Biology* 97(1-2):57-72. DOI: 10.1007/s11103-018-0724-y
- Islam W, Noman A, Qasim M and Wang L. 2018. Plant responses to pathogen attack: small RNAs in focus. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2):515. <https://doi.org/10.3390/ijms19020515>.
- Liefting LW, Perez-Egusquiza ZC, Clover GRG and Anderson JAD. 2008. A new '*Candidatus Liberibacter*' species in *Solanum tuberosum* in New Zealand. *Plant Disease* 92 (10): 1474-1474. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1474A>
- Liefting LW, Sutherland PW, Ward LI, Paice KL, Weir BS and Clover GR. 2009. A new '*Candidatus Liberibacter*' species associated with diseases of solanaceous crops. *Plant Disease* 93 (3):208-214. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-3-0208>
- Lin H, Lou B, Glynn JM, Doddapaneni H, Civerolo EL, Chen C, Duan Y, Zhou L and Vahling, CM. 2011. The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. *PLoS One* 6(4) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019135>.
- Liu SR, Zhou JJ, Hu CG, Wei CL and Zhang JZ. 2017. MicroRNA-mediated gene silencing in plant defense and viral counter-defense. *Frontiers in microbiology* 8:1801. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01801>.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25 (4):402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Munyanza JE. 2012. Zebra chip disease of potato: biology, epidemiology, and management. *American Journal of Potato Research* 89(5):329-350. DOI: 10.1007/s12230-012-9262-3
- Naranjo E, Merfa MV, Ferreira V, Jain M, Davis MJ, Bahar O, Gabriel DW and De La Fuente L. 2019. *Liberibacter crescens* biofilm formation *in vitro*: establishment of a model system for pathogenic '*Candidatus Liberibacter* spp.'. *Scientific Reports* 9:5150. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41495-5>
- Peláez P and Sanchez F. 2013. Small RNAs in plant defense responses during viral and bacterial interactions: Similarities and differences. *Frontiers in Plant Science* 4:343 <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00343>.
- Peres LEP, Carvalho RF, Zsögön A, Bermúdez-Zambrano OD, Robles WGR, and Tavares S. 2005. Grafting of tomato mutants onto potato rootstocks: An approach to study leaf-derived signaling on tuberization. *Plant Science* 169:680-688. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.05.017>
- Rotenberg D, Thompson TS, German TL, and Willis DK. 2006. Methods for effective Real time-RT PCR analysis of virus induced gene silencing. *Journal of Virological Methods* 138:49-59 <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.017>
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2021. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (consulta, julio 2022).
- Singerman A, Lence SH and Useche P. 2017. Is area-wide pest management useful? The case of citrus greening. *Applied Economic Perspectives and Policy* 39(4):609-634. <https://doi.org/10.1093/aep/pxp030>
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF and Hellens RP. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods* 3 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-12>
- Ventura-Medina PI, Gutiérrez-Espinosa MA, Febres V, Mora-Aguilera G and Robledo-Paz A. 2019. Identification and cloning of three endogenous genes that may confer resistance to pathogens in citrus including CLAs and CTV. *Mexican Journal of Phytopathology* 37(3): 399-420. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-6>
- Wang N. 2019. The Citrus Huanglongbing crisis and potential solutions. *Molecular Plant* 12(5):607-609. DOI: 10.1016/j.molp.2019.03.008
- Yin H, Hong G, Li L, Zhang X, Kong Y, Sun Z, Li J, Chen Y and He Y. 2019. miR156/SPL9 regulates reactive oxygen species accumulation and immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 109(4):632-642. DOI: 10.1094/PHYTO-08-18-0306-R
- Zeng C, Wu H, Cao M, Zhou C, Wang X and Fu S. 2022. Integrated Analysis of the miRNAome and transcriptome reveals miRNA-mRNA regulatory networks in *Catharanthus roseus* through *Cuscuta campestris*-mediated infection with '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Frontiers in microbiology* 13:799819. doi: 10.3389/fmicb.2022.799819.
- Zhang YP, Uyemoto JK and Kirkpatrick BC. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71 (1): 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(97)00190-0)