

CTAB: nueva opción para la detección de Huanglongbing en cítricos

PEINADO-FUENTES, Luis, PACHECO-COVARRUBIAS, Juan y SAMANIEGO-RUSSO, Jesús

L. Peinado´, J. Pacheco´´ y J. Samaniego´´

´ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias – Centro de Investigación Regional del Noroeste, Campo Experimental Valle Del Fuerte, Carretera Internacional México-Nogales Km. 1609, Col. Juan José Ríos, Guasave, Sinaloa, México, CP 081101,

´´ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias – Centro de Investigación Regional del Noroeste, Campo Experimental Norman E. Borlaug, Calle Dr. Norman E. Borlaug km. 12, Valle del Yaqui, Cajeme, Cd. Obregón
peinado.luis@inifap.gob.mx

E. Figueroa, L. Godínez, F. Pérez (eds.) Ciencias de la Biología y Agronomía. Handbook T-I. -©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2015.

Abstract

Poor management of the spread of Huanglongbing (HLB) in citrus depends, among other factors, the timely detection of foci of infection of the disease. The large-scale analysis of plant tissue samples that could be positive for HLB is limited by the high cost associated with using the method of extraction of deoxyribonucleic acid (DNA) approved in Mexico, for the detection of HLB. In this research two protocols for DNA extraction plant tissue were compared, the modified CTAB extraction method 3% against the approved method for this purpose in Mexico (DNesay plant mini kit from Qiagen ®). Extraction and amplification of DNA *Candidatus Liberibacter asiaticus* was made from plant tissue of Persian lime (*Citrus latifolia Tanaka*) positive for the disease, from the states of Chiapas, Jalisco and Nayarit, Mexico. The results indicated that DNA extraction by CTAB method is of very good quality and high detection sensitivity similar to that registered by the trade protocol of the Qiagen ®, HLB finally, the cost per reaction for both method is very different since the cost of removing a sample using the official method are achieved by extracting six samples modified CTAB method 3%, favoring the analysis of a larger sample of plant tissue achieving lower cost help control the spread of HLB.

8 Introducción

Figura 8 Cítricos con la presencia de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, síntomas principales del HLB



Para México, la citricultura representa una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura nacional, la superficie establecida supera las 526 mil hectáreas, que producen un promedio anual de 6.7 millones de toneladas de fruta, con un valor estimado de 8,050 millones de pesos, lo que sitúa a nuestro país en el quinto lugar mundial en producción de cítricos. Sin embargo, actualmente la producción de cítricos en México se encuentra amenazada por la enfermedad del Huanglongbing (HLB) también conocida como “Dragón Amarillo de los Cítricos”, se le asocia con una alfa-proteobacteria escrupulosa limitada al floema que había sido nombrada provisionalmente *Candidatus* y que después se le cambió por “*Candidatus Liberibacter spp*”, se encuentra presente en Brasil (Sao Paulo), Estados Unidos de Norteamérica (Florida) y Cuba (Alemán *et al.*, 2007; Halbert *et al.*, 2012). El HLB causa desorden en el floema y daña severamente la traslocación de lo asimilado por la planta hospedera, al igual, es gram negativa, persistente y además no es propagativa ya que se reproduce dentro del insecto pero no es capaz de transmitirse a otras generaciones; ya cuando está en él se multiplica en la hemolinfa y dentro de las células de las glándulas salivales de los psílidos que al picar a la planta para alimentarse le transmite al patógeno, el cual su período de incubación es de alrededor de 6 meses (Tatineni *et al.*, 2008; Manjunath *et al.*, 2008).

El HLB es considerada la enfermedad más destructiva de los cítricos, ya que ha causado la muerte de más de 50 millones de plantas en Asia, 3 millones en Indonesia y 10 millones en África, lo que ha traído consigo un daño muy severo a la industrias cítricas de esas regiones del mundo (Robles *et al.*, 2013). El riesgo para los cítricos de México se incrementa debido a que desde el año 2002 se detectó la presencia del vector de la bacteria, el psílido asiático (*Diaphorina citri*). Actualmente, dicho vector está presente en todas las regiones cítricas del país, excepto en Baja California y Norte de Sonora (Ortega *et al.*, 2013).

El psillido asiático de los cítricos, *Diaphorina citri* Kuwayama, representa actualmente la plaga número uno a nivel mundial, ya que este psillido está ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales de Asia y es una plaga de reciente ingreso a nuestro país, siendo reportado por primera vez por el Dr. D. B. Thomas del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, en el año 2002 en el estado de Campeche (Manjunath *et al.*, 2008; Halbert *et al.*, 2012; Robles *et al.*, 2013). El daño directo es causado por ninfas y adultos al extraer grandes cantidades de savia en las hojas y pecíolos, lo cual debilita y “mal forma” las plantas. Sin embargo, este no es el daño principal, ya que además de los daños directos que este insecto causa al follaje de los árboles de cítricos, su sola presencia representa un grave riesgo para la producción de cítricos en cualquier país, ya que es el vector de la bacteria *Candidatus Liberibacter spp.*, causante del HLB, una enfermedad muy devastadora, incluso en mayor grado que el virus de la Tristeza de los Cítricos (Alemán *et al.*, 2007; Manjunath *et al.*, 2008; Halbert *et al.*, 2012; Robles *et al.*, 2013).

Lo anterior, ha puesto en gran alerta a la citricultura nacional donde ya existe un Plan de trabajo Nacional y Regional por parte del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), ha implementado el programa prioritario de prevención de introducción de plagas cuarentenarias de los cítricos, mediante el cual se realizarán acciones preventivas contra el HLB y cancro de los cítricos, de control contra la leprosis y de investigación sobre el virus tristeza de los cítricos. Dentro del rubro investigación uno de los puntos clave para establecer estrategias de control es el conocimiento de la dispersión del vector y la determinación de focos de infestación, con el fin de dirigir acciones efectivas de control en los ámbitos regionales, para disminuir la presencia del insecto y en caso de que la enfermedad se haga presente sea más lenta la dispersión de la enfermedad y más fácil la medidas correctivas en la zona, por lo que el monitoreo del vector es básico en una zona cítrica (Ortega *et al.*, 2013).

Hasta hace poco tiempo la detección del agente causal de la enfermedad resultaba extremadamente difícil, sin embargo recientemente esto se ha logrado mediante pruebas de ELISA, ADN y microscopía electrónica (Alemán *et al.*, 2007). Una de las actividades fundamentales es la exploración para la detección de síntomas de HLB, mediante la cual se determinará la presencia o ausencia de esta enfermedad en los 23 Estados cítricos del país mediante técnicas moleculares, como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) es el único método aprobado para la detección del HLB; sin embargo tiene algunas desventajas, ya que la detección del HLB por PCR es muy difícil debido a la baja concentración de la bacteria y a la heterogeneidad de su distribución en el árbol. Muchos esfuerzos están siendo dirigidos a mejorar los resultados obtenidos por PCR como la optimización del método de extracción (Deepak *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). El diagnóstico de muestras de tejidos vegetales y de psíllidos se realiza a través de la técnica de PCR (reacción de la cadena de la polimerasa) convencional o en tiempo real, ambos métodos emplean “primers” específicos que amplifican las secuencias de genes ADNr 16s y “primers” basados en genes proteínicos, previa extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) total provenientes de tejido foliar y el psillido asiático de los cítricos (Li *et al.*, 2006; Tatineni *et al.*, 2008).

El CTAB (por sus siglas en inglés del Cetil Trimetil Bromuro de Amoni) de Murray y Thomson (1980) es una metodología utilizada para la extracción del ADN total de tejido vegetal (Figura 8) o animal, para la posterior detección de material genético de algún patógeno mediante técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional o en tiempo real (Li *et al.*, 2006; Deepak *et al.*, 2007). La bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* puede ser detectada con la metodología del CTAB modificado aquí propuesto, ya que dicha tecnología puede ser utilizada por los laboratorios certificados por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) para llevar a cabo diagnósticos fitosanitarios como un alternativa al kit comercial de extracción de la marca Qiagen® (método oficial), la principal limitante del método oficial es el alto costo por reacción en la extracción de ADN, lo que limita el número de muestras a procesar y por lo tanto, la detección de la enfermedad a tiempo; ya que puede ser un factor decisivo en una rápida dispersión de la enfermedad hacia zonas de baja incidencia o libres de HLB. Por todo lo anterior en el presente trabajo se permite contar con una alternativa económicamente viable para los productores en el costo por reacción para la extracción de ADN total y posterior detección de HLB mediante PCR en tiempo real.

8.1 Materiales y métodos

El kit de extracción (DNeasy plant mini) de Qiagen® se utilizó con 0.2 gramos de tejido en un tubo Eppendorf 1.5 ml estéril con 800 µl de solución AP1, se tritura en un TissueLyser II marca Quiagen® con balines estériles a 29 frecuencias por cinco minutos. Los tubos con las muestras de tejido homogeneizados fueron incubados por diez minutos a 65° C y se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 segundos. Se adicionaron 260 µl de ap2 de precipitación y se agitó vigorosamente para incubarse 5 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 10, 000 rpm por 10 minutos. La fase acuosa de cada muestra se depositó en la columna QIAShredder mini spin (color lila) y se centrifugó 2 minutos a 13, 000 rpm. En un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril se agregó el sobrenadante y 700 µl del buffer AP3 para después centrifugarse a 10, 000 rpm durante 10 segundos. Se transfirió 700 µl del sobrenadante a la columna mini spin DNeasy (blanca) y se centrifugó a 8, 000 rpm durante un minuto, luego se desechó el precipitado para añadir 500 µl de buffer AW y se centrifugó a 8, 000 rpm por un minuto, se realizó un segundo lavado en la columna con 300 µl de buffer AW y centrifugó a 13,000 rpm durante 2 minutos. En tubo de 1.5 ml Eppendorf estéril se colocó la columna y se añadió 100 µl de buffer AE (precalentado a 65° C), se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó un minuto a 8,000 rpm para así obtener el ADN disuelto.

El método CTAB (Rodríguez *et al.*, 2011) fue modificado al 3%, el cual, consiste en macerar 0.3 gramos de tejido en 200 µl de buffer CTAB 3 % (1.4 M de NaCl; 20 mM de EDTA y 1 mM de tris HCl; pH 8.0; 0.2 % Mercaptoetanol y polivinylpyrrolidona al 2%). Es importante mencionar que el CTAB se disuelve a 60° C y el mercaptoetanol se adiciona antes de realizar la extracción. Después, se agregan 600 µl de buffer CTAB y se agita por inmersión varias veces, se incubó 40-80 minutos a 60° C. Luego, se adicionan 600 µl de cloroformo; alcohol isoamílico (24: 1) a una temperatura de -20°C a cada muestra, se agita vigorosamente, se centrifuga 10 minutos a 13000 rpm y con un micropipeta se extrae la fase acuosa superior para colocarla en un tubo Eppendorf estéril rotulado. Después, se adicionan 10-15 µl de RNA'sa a 1 µg /µl y se incubó de 20 a 40 minutos a 37°C, se adiciona isopropanol al 100% a una temperatura de -20°C (un volumen igual al tomado de la fase superior recuperada), se agita por inversión de 6 a 7 veces, se centrifuga inmediatamente por 8 minutos a 13000 rpm, el sobrenadante se decanta y se agrega 1 ml de etanol al 70 % a -20°C para agitar por inversión varias veces.

Posteriormente, se centrifuga 4 minutos a 13000 rpm, se decanta el sobrenadante y se deja secar perfectamente el precipitado invirtiendo el tubo sobre papel secante (alrededor de 30 minutos). Se adicionan 30 a 50 μ l de agua biodestilada y estéril hasta disolver.

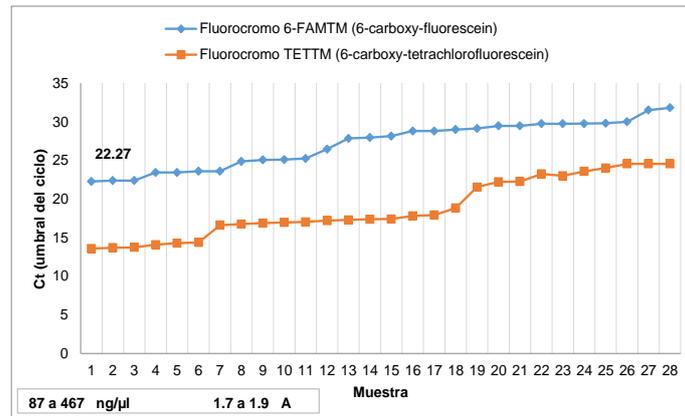
La concentración y pureza del RNA total se determinó en un NanoDrop 8000 (Thermo Scientific), colocando 1 μ l de cada extracción en cada una de celdas del espectrofotómetro y determinando la absorbancia a 260 nm y 280 nm, para determinar la concentración de RNA mediante la fórmula: Concentración de RNA = (factor dilución) (40) (lectura a 260 nm). El ADN extraído de las muestras vegetales se amplificó mediante el método de PCR en tiempo real, el cual, se preparó una mezcla de microtubos Eppendorf para PCR con el control positivo y negativo, y cada una de las 28 muestras, en una cámara de flujo laminar Marca ESCO® para evita contaminación. La mezcla fue resultado de una reacción al agregar 2 μ l de ADN, 4.7 μ l de agua MQ (SIGA®), 2.5 μ l de Buffer 10x de reacción, 0.6 μ l de DNTP'S (10 mM), 3 μ l del primer HLB, 3 μ l del primer Cox, 3 μ l de Sonda Hlbr (1 μ M), 3 μ l de MgCl₂, (50 mM). Para el control negativo se adicionó 2 μ l de ADN negativo a HLB. Para homogenizar cada una de las 28 muestras, los microtubos con las muestras se centrifugaron en una micro centrifugadora marca LABNET® a 6, 000 rpm, durante 20 segundos. Las muestras se colocaron en un termociclador marca BioRad® que trabajo de acuerdo a Li *et al*, (2006). La amplificación estándar fue de 95° C durante 20 segundos, seguido por 40 ciclos a dos temperaturas; el primer ciclo de 95°C por 1 segundo con los óptimos desconectados y 58°C por 4 segundos con los óptimos conectados. Los datos fueron analizados utilizando el software Cyclex® Versión 2.0D.

8.2 Resultados

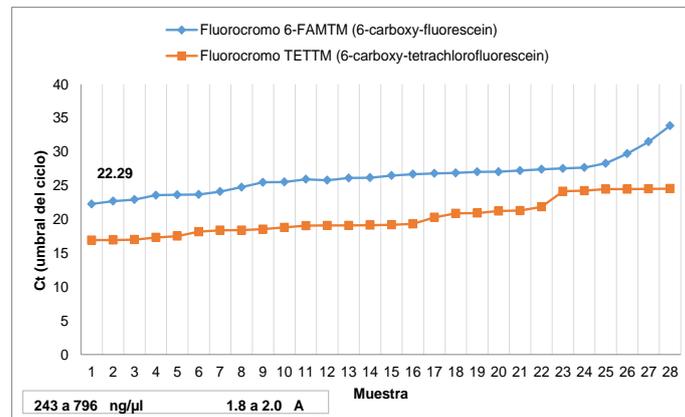
Figura 8.1 Muestra foliar de limón persa para extracción de ADN



La extracción y amplificación del ADN de *Candidatus Liberibacter asiaticus* se realizó a partir de tejido vegetal de limón persa (*citrus latifolia Tanaka*) positivo a la enfermedad, procedentes de los estados de Chiapas, Jalisco y Nayarit, México. A las muestras de 28 ejemplares se les extrajo el ADN total mediante el método de extracción CTAB modificado al 3% y con el kit de extracción de Qiagen®. Los resultados indican que la pureza y calidad del ADN extraído tienen un rango de pureza entre el 1.8 a 2 de absorbancia en la relación 260/280nm, con concentraciones de ADN entre 243 a 1213 ng/ μ l por el método de extracción CTAB modificado; mientras que el Kit de extracción Qiagen® osciló en un rango de 1.7 a 1.9 de absorbancia y sus concentraciones de ADN entre 58 a 467 ng/ μ l. Al igual, el valor del umbral de ciclo (los ciclos de PCR mínimos requeridos para la detección del HLB) ó Ct fue de 22.27 para el método de extracción de Qiagen® y 22.29 para el método CTAB modificado ambos con el fluorocromo 6-FAMTM (6-carboxy-fluorescein) y TETTM (6-carboxy-tetrachlorofluorescein) como control positivo.

Gráfico 8 Detección de HLB mediante el método de extracción de Qiagen ®

Fuente: Elaboración propia con datos del PCR en tiempo real

Gráfico 8.1 Detección de HLB mediante el método de extracción de CTAB

Fuente: Elaboración propia con datos del PCR en tiempo real

8.3 Conclusiones

El método CTAB modificado es más factible económicamente hablando, debido a, que su costo promedio es de \$14.30 pesos mexicanos por muestra procesada; mientras que con el Kit de extracción Qiagen® arrojó un costo promedio de \$85.00 pesos mexicanos por muestra analizada, esto es debido que por cada muestra procesada con el método de Qiagen® se logran procesar seis muestras más con método de CTAB modificado al 3% con el mismo costo.

El método de CTAB modificado, presenta una mayor eficacia en la extracción de ADN, ya que el método de CTAB tienen un rango de pureza entre el 1.8 a 2 con una concentración de 243 a 1213 ng/μl, mientras con el kit de Qiagen® fue una pureza de 1.7 a 1.9 y una concentración de ADN de 58 a 467 ng/μl. Por lo tanto, permite procesar un mayor número de muestras y en su caso, tener mayor probabilidad de detectar la enfermedad a tiempo. Sin embargo, a pesar de que el tiempo de extracción del ADN con el método CTAB modificado es mayor en promedio de 1 a 2 horas que el de Qiagen®, dicho tiempo no es crítico para la obtención de resultados. Finalmente, los dos métodos de extracción respondieron bien a la detección de HLB en tiempo real, presentado una sensibilidad o Ct muy similar para ambos.

8.4 Referencias

- Alemán, J., Baños, H., & Ravelo, J., (2007), “*Diaphorina citri* y la enfermedad huanglongbing: una combinación destructiva para la producción cítrica”, *Revista de Protección Vegetal*, Número 3 (vol. 22). pp. 154-165
- Deepak, A., Kottapalli, R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, S., Iwahashi, H., & Agrawal, K., (2007), “Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes”, *Current genomics* Número 8 (vol. 4). pp. 234
- Halbert, E., Manjunath, K., Ramadugu, C., & Lee, F., (2012). “Incidence of Huanglongbing-Associated 'Candidatus *Liberibacter Asiaticus*' in *Diaphorina Citri* (Hemiptera: Psyllidae) Collected from Plants for Sale in Florida”. *Florida Entomologist*. Número 3 (vol. 95). pp. 617-624
- Li, W., Hartung, S., & Levy, L., (2006), “Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing”, *J.Microbiol. Methods*, Número 66 (vol. 1). pp. 104 – 105
- Li, W., Li, D., Twieg, E., Hartung, S., & Levy, L., (2008), “Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR”, *Plant Disease*, Número 6 (vol. 92), pp. 854-861
- Manjunath, L., Halbert, E., Ramadugu, C., Webb, S., & Lee, F., (2008), “Detection of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of Citrus huanglongbing in Florida”, *Phytopathology*, Número 4 (vol. 98), pp. 387-396
- Ortega Arenas, D., Villegas Monter, A., Ramírez Reyes, J., & Mendoza García, E., (2013), “Abundancia estacional de *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) en plantaciones de cítricos en Cazonas, Veracruz, México”, *Acta zoológica mexicana*, Numero 2 (vol. 29). pp. 317-333
- Robles, M., Velázquez, J., Manzanilla M., Orozco M., Medina V., López J., & Flores R., (2013), “Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México”, *Revista Chapingo Serie horticultura*, Número 1 (vol. 19), pp. 15-31
- Tatineni, S., Sagaram, S., Gowda, S., Robertson, J., Dawson, O., Iwanami, T., & Wang, N., (2008), “In planta distribution of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR”, *Phytopathology*, Número 5 (vol. 98), pp. 592-599