

Detección molecular de la bacteria causante de HLB, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, en el vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)

Erick Mollinedo¹ y Margarita Palmieri²

¹Investigador Asistente, ²Laboratorio de Protección Vegetal, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala
margaritapalmieri@yahoo.com

RESUMEN: El agente causal de Huanglongbing (HLB) en Guatemala es la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, la cual es transmitida por el insecto *Diaphorina citri*. La enfermedad es muy difícil de diagnosticar, siendo las pruebas moleculares las más confiables en el caso de detección. Se realizaron modificaciones en cuanto a los protocolos y la receta de reactivos de amplificación para obtener un protocolo estandarizado para la detección de casos de HLB en su vector en Guatemala. Se evaluó el protocolo de extracción de ácidos nucleicos descrito por Beard & Scott (2013) y el de Hung y colaboradores (2004). Como método de amplificación, se comparó entre el par de cebadores HLB1999, propuesto por Hung *et al.* (1999) para amplificar una región de ADN genómico de 226 pb de la bacteria y el par de cebadores O1c-O12c de Teixeira *et al.* (2005) que amplifican un fragmento de 1160 pb del gen 16S de ARN ribosomal. La enfermedad HLB puede detectarse en el vector con un mayor porcentaje de certeza utilizando los cebadores HLB1999 ($p=0.0068 \times 10^{-6}$) con un intervalo de confianza del 95%. Se analizaron 250 insectos provenientes en diferente proporción, de 8 departamentos de Guatemala; 82 fueron confirmados como casos positivos de HLB. El mayor porcentaje de infección se detectó en Santa Rosa (54.17%), Escuintla (46.67%) y Alta Verapaz (45.61%). El método de detección de la bacteria en el vector a nivel molecular es confiable y de mediano costo, para ser implementado en las estrategias de vigilancia de la enfermedad HLB en Guatemala.

PALABRAS CLAVE: Huanglongbing, Cítricos, Reacción en cadena de la polimerasa, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Psílido.

Molecular detection of the bacteria that causes HLB disease, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, in the vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae)

ABSTRACT: The Huanglongbing (HLB) disease is caused by the bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Guatemala and is carried by the insect *Diaphorina citri*. The current disease is difficult to diagnose, molecular tests are the most reliable methods for the disease detection. Modifications were made regarding the protocols and amplification reagents to obtain a standardized protocol for the detection of HLB cases through the vector in Guatemala. Nucleic acid extraction protocols from Beard & Scott (2013) and Hung *et al.* (2004) were evaluated. As amplification method, primer pairs HLB1999 from Hung *et al.* (1999) which amplify a 226 bp genomic DNA sequence from the bacteria were compared to the O1c-O12c primer pair from Teixeira *et al.* (2005) which amplify a fragment of 1160 bp of the 16S ribosomal RNA gene sequence. The HLB disease can be diagnosed in the vector with more accuracy by the primer pair HLB1999 ($p=0.0068 \times 10^{-6}$) with 95% confidence interval. Two hundred and fifty insects from eight Guatemalan departments in different proportion were analyzed, where 82 were confirmed as positive cases of HLB. The highest percentage of infection was in the departments of Santa Rosa (54.17%), Escuintla (46.67%) and Alta Verapaz (45.61%). The molecular detection method of the bacteria is reliable and of medium cost, ready to be implemented in the surveillance of the HLB disease in Guatemala.

KEYWORDS: Huanglongbing, Citrics, Polymerase Chain Reaction, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Psyllid.

Introducción

El Huanglongbing cuyo acrónimo es HLB, es un nombre derivado del chino mandarín que significa “dragón amarillo”, pero debido a la apariencia de la planta enferma se le denominó también “Greening” o moteado foliar o enverdecimiento. Es una enfermedad que afecta a la mayoría de especies de cítricos. Ha causado alarma a nivel mundial alcanzando niveles de incidencia desde 26% (Brasil) hasta 100% (China). En México, a diferencia de los efectos que ha tenido el HLB en naranja dulce (*Citrus cinensis* L.) en Brasil y en Estados Unidos (Florida), el mayor efecto ha sido en limón, las pérdidas, por ejemplo, en Colima en limón mexicano han alcanzado el 62% y en limón persa en Yucatán del 17.3%. La incidencia de árboles sintomáticos entre 4 a 10 años en Colima México, ha alcanzado hasta el 90% (Mora-Aguilera G, 2014).

El HLB es una enfermedad causada por la bacteria Gram negativa, restringida al floema de la planta, que se encuentra en baja concentración y de distribución heterogénea, llamada *Candidatus Liberibacter spp.*, que se cree originaria de China. Actualmente se sabe que la enfermedad se presenta en al menos 40 países, distribuida en el continente africano, asiático, americano y en Oceanía. Es la enfermedad más peligrosa para los cítricos, además, se caracteriza por presentarse en lugares con climas cálidos (Timmer *et al.* 2002, Bové 2006).

Los síntomas característicos de esta enfermedad son principalmente el apareamiento de brotes amarillos y moteado amarillo difuso y asimétrico en las hojas y en ramas, caída excesiva de frutos y hojas y nervaduras prominentes y amarillas. Otros síntomas son el tamaño pequeño de los frutos, deformación, inversión del color de maduración, aumento del grosor de la cáscara y color anaranjado o marrón en la inserción del pedúnculo y la columna. Los frutos poseen un sabor anormalmente amargo, así como un alto contenido en ácidos y bajo contenido en sólidos solubles y las semillas se muestran pequeñas, oscuras y abortadas (Timmer *et al.* 2002, Bové 2006, da Graça 2008).

La enfermedad puede transmitirse por medio del uso de injertos infectados y por medio de dos especies de insectos del orden Hemiptera, los cuales actúan como vectores de la enfermedad (Timmer *et al.* 2002). *Trioxa erytrae* es el insecto que transmite la enfermedad en África y *Diaphorina citri* es el que la transmite en Asia y regiones de América (Halbert & Manjunath 2004). En cuanto a la ubicación de la bacteria en la planta, ésta se aloja únicamente en el floema, haciendo taponos que impiden la circulación de nutrientes y los síntomas se han reportado más fuertes en áreas secas y cálidas (Bové 2006).

La presencia de la enfermedad en Guatemala se detectó en el 2010, por lo cual se emitió una alerta fitosanitaria mediante el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). Los primeros casos se detectaron en Alta Verapaz, Petén e Izabal. En el año 2012 se confirmó la presencia de la enfermedad en plantaciones comerciales y comunitarias de Zacapa, más tarde su expansión a El Progreso y Chiquimula y en el 2014 se detectó por primera vez en Santa Rosa. Más de 5000 hectáreas a nivel nacional se encuentran bajo vigilancia y posible control, mientras que se ha iniciado la detección de la bacteria causante de la enfermedad en cortes de tejidos de las plantas mediante PCR de punto final en las instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. Un aspecto interesante es la perspectiva pública de la enfermedad, puesto que se tiene el concepto que es un virus y no una bacteria; a pesar que la enfermedad afecta a varias plantaciones, no se ha dado una gran divulgación de la situación nacional actual¹ (Tapia 2010, Villagrán 2014).

El HLB es una de las peores enfermedades de cítricos, puesto que actualmente no existe un método para controlarla o revertir los daños; la única manera de combatirla es evitar la dispersión. No existe una cura para dicha enfermedad, las únicas estrategias han sido la eliminación sistematizada de plantas infectadas y el control del vector mediante plaguicidas. El diagnóstico mediante observación de síntomas se hace difícil, puesto que tiene un período de latencia entre 6 y 12 meses en el cual las plantas infectadas no muestran síntomas. En ocasiones, la detección por técnicas moleculares puede ser difícil, puesto que las hojas sin síntomas aparentes pueden tener muy baja concentración de la bacteria y una distribución heterogénea dentro de la planta (Bové 2006).

Los métodos de detección de la enfermedad incluyen la microscopía electrónica, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) y la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Halbert & Manjunath 2004, Bové 2006). En cuanto a detección molecular, Hung y colaboradores (1999) desarrollaron un par de cebadores para amplificar un fragmento conservado de 226 pares de bases de ADN genómico de la especie *C. Liberibacter asiaticus*. Teixeira y colaboradores (2005) por otro lado, desarrollaron un set de cebadores que puede discriminar entre las tres especies de *C. Liberibacter*. Dichos cebadores amplifican un fragmento del gen 16S ARN ribosomal, el cual consiste en 1160 pares de bases para las especies *C. Liberibacter asiaticus*, *C. Liberibacter americanus* y *C. Liberibacter africanus*. Técnicas más recientes incluyen la amplificación mediante PCR en tiempo real, demostrando mayor sensibilidad que un PCR convencional (Li *et al.* 2007).

¹ Prensa Libre (Redacción). 2010. Confirman virus de HLB en Guatemala. Periódico Prensa Libre. http://www.prensalibre.com/economia/ Confirman-virus-HLB-Guatemala_0_240575984.html

² El Periódico (Redacción). 2012. Amenaza plantaciones de limón. Economía, Diario El Periódico. <http://www.elperiodico.com.gt/es/ 20120409/economia/210498/?action=zifihvbg>

La evaluación de la presencia de *C. Liberibacter asiaticus* también se ha reportado que se puede hacer con el vector, (*Diaphorina citri*) y mediante pruebas preliminares en el Laboratorio de Protección Vegetal, se pudo determinar que la detección de la presencia de esta bacteria en el vector por ser sistémica fue mucho más efectiva que en la planta. Además, los resultados de estos análisis pueden utilizarse para predicciones de futuros sitios de infección y determinar períodos de riesgo de infección en el año.

El objetivo del presente estudio fue establecer un protocolo de detección para la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el vector psílido *Diaphorina citri* mediante PCR de punto final basándose en la comparación entre dos pares de cebadores que amplifican secuencias diferentes de la bacteria.

Materiales y métodos

Colecta e identificación de muestras. El estudio se realizó en el año 2014 con psíidos de cítricos, *Diaphorina citri*, colectados durante los años 2013 y 2014 en los departamentos de Alta Verapaz, Escuintla, Santa Rosa, Izabal, Jutiapa, San Marcos, Suchitepéquez y Zacapa. Las muestras fueron colectadas por personas individuales, productores de empresas citrícolas y entidades asociadas al monitoreo de HLB en Guatemala. Los insectos fueron almacenados en viales con etanol al 80% y en un cuarto de almacenamiento a 4°C. La identificación de los insectos se realizó mediante observación de características morfológicas bajo un estereoscopio: Inclinación de tórax y abdomen de 40 a 45° respecto a posicionamiento de las patas sobre una superficie, patrón de maculación y pigmentación café en alas, cabeza aplanada levemente dorsoventralmente y procesos genales en forma cónica (Figura 1).

Optimización de extracción de ADN

Se trabajó con muestras provenientes de Alta Verapaz. Cada proceso se realizó con un solo insecto completo y antes de iniciar con el protocolo de extracción, los insectos se dejaron secar sobre una servilleta de papel para remover el exceso de etanol. Se trabajó en base a dos protocolos de extracción (Beard & Scott, 2013) y (Hung y colaboradores, 2004) de los cuales se realizaron optimizaciones.

Protocolo de extracción (Beard & Scott 2013) con modificaciones: Se maceró el insecto en tubo de 1.5ml en 100 μ l de tampón CTAB 2X (2% CTAB, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl), se incubó por 2 horas a 65°C. Se agregaron 100 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó de 2 a 5 minutos y centrifugó 15 min. a 6000 g. El sobrenadante fue removido y se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml en 80 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión e incubó a -20°C por 2 horas. Se centrifugó por 15 min. a 12,000 rpm, se descartó el



Figura 1. Proceso genal cónico en cabeza de psílido del cítrico, *Diaphorina citri* (García-Pérez et al. 2013)

sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol 70% y centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se secó el precipitado a temperatura ambiente (25°C) y se suspendió en 50 μ l de tampón EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5).

Protocolo de extracción (Hung et al. 2004) con modificaciones: Se lavó el insecto mediante agitación en tubo de 1.5 ml agregando 500 μ l de tampón de extracción (Tris-Base 0.1M; EDTA 0.1M; NaCl 0.25M, pH 8.0) o agua destilada, se descartó el líquido. Se agregaron 270 μ l de tampón de extracción y maceró usando un pistilo estéril. Se agregaron 30 μ l de sarkosyl 10% y 3 μ l de proteinasa K (20 mg/ml), se mezcló con pipeta y se incubó a 55°C por una hora. Se agregaron 200 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y centrifugó por 10 min. a 12,000 rpm. El sobrenadante se removió y se colocó en un tubo nuevo, se agregaron 500 μ l de etanol al 95%, se mezcló por inversión. Finalmente se introdujo en la centrifugadora por 15 minutos a 12,000 rpm, se descartó el líquido, se puso a secar el precipitado a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μ l de tampón TE.

El producto de la extracción fue cuantificado mediante un espectrofotómetro UV. Se realizaron diluciones de cada muestra en proporción 1:99 de ADN/Agua destilada, utilizando agua destilada como control cada 3 muestras. Para determinar la concentración de ADN se utilizó la fórmula: $(\text{ng}/\mu\text{l}) = (A_{260} - A_{320}) * 50 * 100$, "A" indica la absorbancia a la longitud de onda indicada, "50" el factor de conversión y "100" es el factor de dilución. Adicionalmente se determinó la pureza del ADN extraído mediante el cociente entre las absorbancias 260 y 280 (A_{260}/A_{280}). Se comparó la pureza y concentración entre ambos métodos de extracción tomando el promedio y desviación estándar entre los resultados de ambos protocolos.

Optimización de la reacción de amplificación. Se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. La mezcla de amplificación inicial en un volumen de 25 μ l consistió en agua tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC), tampón de amplificación MgCl₂ 1X, MgCl₂ 4 mM, dNTPs 0.2 mM, cebador forward 0.2 μ M, cebador reverso 0.2 μ M, 0.75 U de Taq polimerasa y 1 μ l de ADN en una dilución entre 50 y 100 ng/ μ l, según producto de extracción de Beard y Scott. Los cebadores utilizados para su comparación fueron los de Hung y colaboradores (HLB1999) F: 5'-CACCGAAGATATGGACAACA-3' y R: 5'-GAGGTTCTGTGGTTTTCTG-3' y los cebadores de Teixeira y colaboradores F: 5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3' y R: 5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'.

Las condiciones de amplificación iniciales utilizadas en el termociclador T-100 BioRad® fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 3 min para desnaturalización; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min y un ciclo de 72°C por 10 min para la extensión final. Se utilizó un PCR de gradiente para determinar la temperatura de hibridación (T_m) óptima para los cebadores HLB 1999, consistiendo en un intervalo de 16°C del cual la temperatura central fue 57°C, que es la T_m teórica para estos cebadores.

Los productos de amplificación fueron observados en gel de 2% de agarosa en el caso de los productos de los cebadores Hung *et al.* (1999) y al 1% para los productos de los cebadores de Teixeira *et al.* (2005) según el tamaño de cada producto amplificado. Para su visualización se utilizó gel Red en proporción de 1:3. El voltaje inicial de corrida fue de 85V en la cámara de electroforesis Sigma Aldrich modelo SHU6, usando tampón TAE 1X y se hicieron optimizaciones tanto en tiempo, voltaje de corrida y porcentaje de agarosa; los geles fueron observados y fotografiados en un transiluminador UV, marca UVP modelo M-20.

Detección de casos y comparación de cebadores

Luego de la estandarización del procedimiento de extracción y amplificación de ácidos nucleicos, se realizó el análisis de la presencia de la bacteria en psíldos provenientes de los 8 departamentos descritos. Dado que el número de individuos colectados por departamento fue variable, el resultado se transformó a porcentaje de casos positivos según el número de individuos por departamento.

Purificación y secuenciación de ADN

Se purificaron 10 muestras utilizando el kit y protocolo descrito de Novagen Cat. No. 70976-3AT, adaptando el volumen de cada reactivo para contar con un total de 50 μ l de cada producto.

Se enviaron 20 μ l de cada producto a Macrogen en Korea, laboratorio de secuenciación, para ser secuenciados. Con los resultados de cada muestra se llegó a una secuencia consenso mediante el programa Sequencher 5.1™ y se realizó un BLAST® para confirmar la identidad de la misma.

Resultados y discusión

Optimización del protocolo de extracción. Se determinó que el producto de extracción mediante el método de Beard & Scott posea mayor pureza en promedio, comparado con el protocolo de Hung y colaboradores con adición de proteínasa K. El método de Hung y colaboradores sin proteína K presentó la más alta desviación estándar, por lo que se decidió modificarlo mediante la adición de proteínasa K para reducir las proteínas que contaminaran. A pesar de que la desviación estándar disminuyó, siempre fue aproximadamente ocho veces más alta que la que presentó el método de Beard & Scott. La concentración promedio de ADN en ng/ μ l fue mayor en el método de Hung *et al.* pero la desviación estándar fue menor nuevamente para el caso del protocolo de Beard y Scott, como se muestra en el Cuadro 1.

Los costos también son importante tomarlos en cuenta y en el caso de Hung y colaboradores, la adición de proteínasa K no produjo mejores resultados. El costo aproximado de un vial de 1 ml es de US\$ 80.00³. A pesar de las modificaciones, ambos métodos presentaron un nivel alto de impurezas, posiblemente proteínas y ARN, por lo cual es necesario implementar algún método de purificación adicional. Esto podría contribuir a la observación de mejores bandas de amplificación al visualizarse en gel de electroforesis y no obtener barrido de contaminantes al final de los geles.

Optimización del protocolo de amplificación. Los reactivos que variaron en concentración al momento de realizar la estandarización fueron los dNTPs, cloruro de magnesio (MgCl₂), y los cebadores. Se observó que al variar la concentración de dNTPs, se obtuvo un resultado similar para las cuatro concentraciones descritas (Figura 2). En base a la visualización de los productos de amplificación en el gel de electroforesis, se llegó a la concentración

Cuadro 1. Promedio y desviación estándar (entre paréntesis) de la pureza y concentración de ADN obtenida mediante dos protocolos de extracción.

Protocolo	Pureza (A260/A280)	Concentración ng/ μ L
Hung <i>et al.</i> (2004) + Prot.K	2.06 (0.66)	476.17 (333.20)
Beard & Scott (2013)	1.91 (0.26)	118.25 (42.6)

³ Según los costos de New England Biolabs

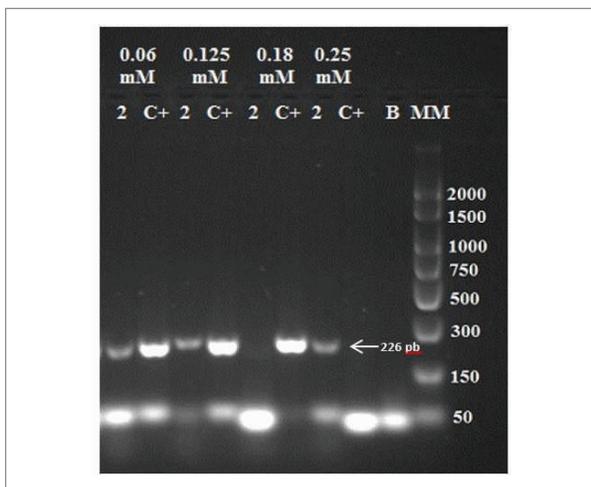


Figura 2. Gel de productos de la muestra P062-2 (2) y control positivo (C+) con distintas concentraciones de dNTPs (0.06 mM, 0.125 mM, 0.18 mM y 0.25 mM).

Cuadro 2. Concentración de reactivos para la mezcla de amplificación para un volumen de master mix de 20 μ l y 1 μ l de ADN.

Reactivo	Concentración de stock	Concentración 1 reacción
H ₂ O DEPC		Ajustar volumen a 21 μ l
Tampón	10X	1.25X
MgCl ₂	25 mM	1.8 mM
dNTPs	2.5 mM	0.125 mM
HLB 1999 F	8.25 μ M	0.20 μ M
HLB 1999 R	8.25 μ M	0.20 μ M
Taq. Pol	5U/ μ L	1U
ADN		5-100 ng/ μ L
Volumen total		21 μl

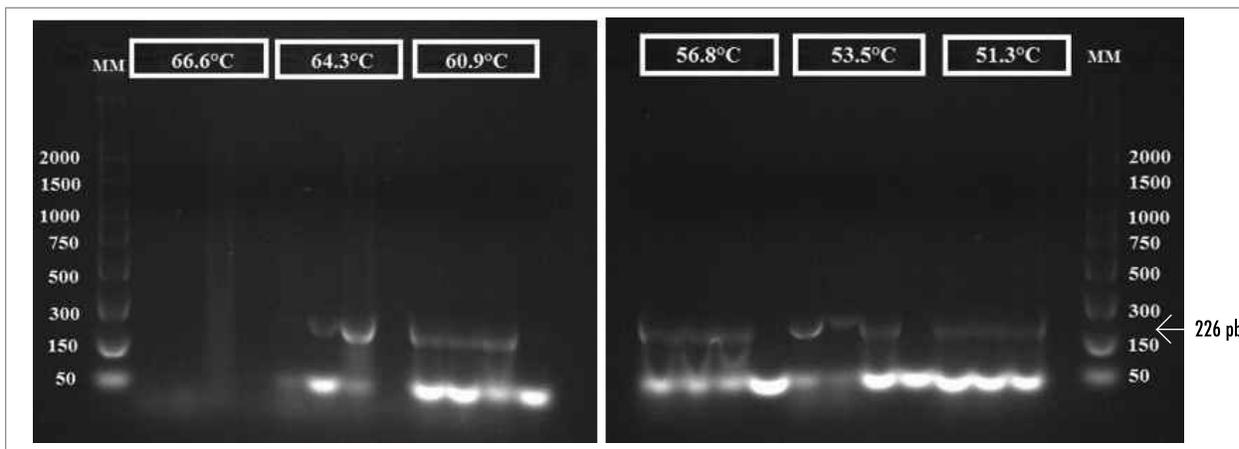


Figura 3. Gel de productos de la muestra P061-11, P061-13 y control positivo mediante gradiente de la Temperatura de hibridación (Tm) para los cebadores HLB 1999

final de reactivos para la mezcla de amplificación (Cuadro 2), para un volumen de 21 μ l.

De todos los reactivos utilizados para la mezcla de amplificación, se realizaron pruebas de variación de concentraciones generalmente de manera independiente. En cuanto a la comparación de diferentes concentraciones de dNTPs, el frente de corrida observado en el gel puede que esté más relacionado a la calidad de extracción de ADN, sin embargo, se observó un menor frente de corrida a la concentración de 0.125 mM. El protocolo descrito se consideró el más apropiado por dos razones; primero, la reducción de la concentración de reactivos, y por ende, el volumen, y segundo, a la menor cantidad de frente de corrida posible obteniendo un producto adecuado para visualizar mediante electroforesis.

Aunque el ADN a agregar por reacción fue de la extracción pura, de igual forma puede trabajarse con dicha muestra en

dilución con agua ultrapura (1:2); este aspecto puede variar puesto que la concentración de la bacteria en cada insecto es variable, y no puede estimarse mediante cuantificación ya que la cuantificación considera ADN total extraído. La mayoría de alícuotas utilizadas como controles positivos en las reacciones provienen de extracciones de tejido vegetal con presencia de la bacteria. Esto debido a que el ADN extraído del psílido es más susceptible a degradación, a pesar de mantenerlo almacenado a temperaturas de hasta -20°C, dichas alícuotas no eran viables para uso luego de 4 semanas.

En base al PCR de gradiente se determinó que la temperatura de hibridación (Tm) para la reacción es de 60°C, lo cual difiere del Tm teórico para los cebadores HLB1999 (56 ° C y 57 ° C) (Figura 3). Adicional al cambio de Tm, se añadieron 2 ciclos más de amplificación (Cuadro 3). Dicho programa fue utilizado de igual manera para los cebadores Olc y Ol2c, obteniendo

Cuadro 3. Programa final de reacción para los cebadores HLB 1999 y Olc-OI2c

Paso	Temperatura, °C	Tiempo, min	
1	94	3	
2	94	1	
3	60	1	32X
4	72	2	
5	72	10	
6	4	detener	

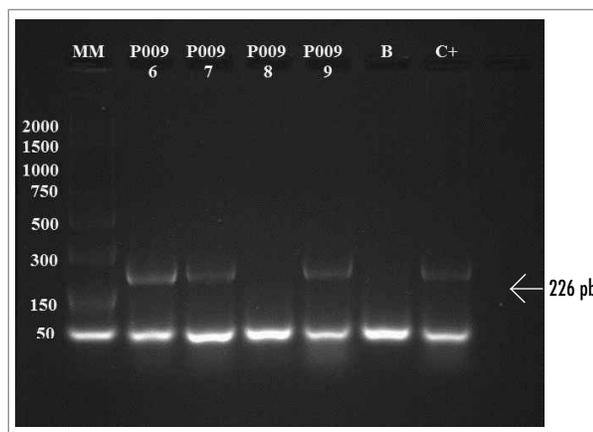


Figura 4. Gel de productos de amplificación de muestras de Alta Verapaz mediante las condiciones estandarizadas de electroforesis.

Cuadro 4. Comparación entre dos pares de cebadores mediante la prueba estadística chi-cuadrado.

Cebadores	Positivos	Negativos	Total
HLB 1999	55	43	98
Olc-OI2c	16	82	98

Resultados prueba chi cuadrado

$$p = 0.00068 \times 10^{-6}$$

Intervalo = 95 %

Grados de libertad = 1

productos aceptables, por lo cual puede ser estandarizado para ambos pares de cebadores.

Según fuentes como Erlandson y Theilmann 2009, el T_m debe variar entre 52-58°C o entre 54 y 62°C, por lo cual, aunque se hayan obtenido bandas estables de producto amplificado a 51.3°C, dicha T_m queda descartada. En el caso de las amplificaciones a 53°C y 56°C, la desigualdad y curvatura de

las bandas probablemente se deba a baja estabilidad para los cebadores a esta temperatura. Una posible desventaja de este programa es la duración (2 horas, 45 minutos aproximadamente), por lo que la obtención de resultados lleva más tiempo de lo esperado.

Una de las razones para la poca detección de productos del protocolo de Texeira, es que el ADN obtenido de las extracciones se encuentra fragmentado. Los cebadores de Texeira y colaboradores amplifican un fragmento de 1160 pares de bases y puesto que en las muestras de ADN se observa fragmentación, es poco probable obtener un producto de tan alto tamaño, contrario a los cebadores HLB 1999 que amplifican un fragmento de 226 pares de bases. Hace falta evaluar si existe alguna razón adicional por la cual la especificidad de los cebadores Olc-OI2c podría ser baja para el ADN de insecto.

Las condiciones óptimas para la visualización de productos mediante electroforesis, incluye el porcentaje de agarosa al 2%, utilizando 0.75 μ l de GelRed™ como tinción (Figura 4). Las condiciones de electroforesis finales son de 75V por 50 minutos de corrida, utilizando tampón TAE 1X de 4°C a 10°C de temperatura. Esta temperatura del tampón de corrida fue necesaria para evitar la distorsión de las bandas ya que se corrieron los gels a un voltaje relativamente alto para que el tiempo de corrida fuera menor. Un alto voltaje tiende a subir la temperatura del tampón de corrida y del gel, alterando el equilibrio que debería proporcionar el tampón. Podría recomendarse utilizar un voltaje más bajo pero la corrida duraría más tiempo o utilizar otro tampón como el TBE (Tris-Borato-EDTA) el cual puede dar mayor capacidad amortiguadora a temperatura ambiente.

Purificación y secuenciación. A pesar de haber purificado 10 muestras, únicamente se pudo confirmar la identidad para cuatro muestras, hizo falta obtener datos más representativos. La poca especificidad al llegar a una secuencia consenso en las otras muestras enviadas a secuenciación puede indicar alta contaminación con ADN del vector, por lo cual, a pesar de haber realizado un paso previo de purificación, no fue suficiente para eliminar todas las impurezas.

Casos de HLB en Guatemala y comparación entre cebadores. Se analizaron 98 muestras tanto con el par de cebadores HLB1999 como Olc-OI2c; de las 98 muestras, 55 fueron positivas según el par HLB1999 mientras que 16 fueron casos positivos de HLB según el par Olc-OI2c. De acuerdo a la prueba chi-cuadrado, existe diferencia significativa entre los resultados de ambos pares de cebadores (Cuadro 4). Los cebadores HLB1999 son más sensibles para la detección de HLB en el vector *Diaphorina citri*. En cuanto a departamentos con mayor incidencia de HLB en el vector, Santa Rosa es el que presentó el porcentaje más alto (54.17%), seguido por Escuintla (46.67%) y Alta Verapaz (45%) (Figura 5).

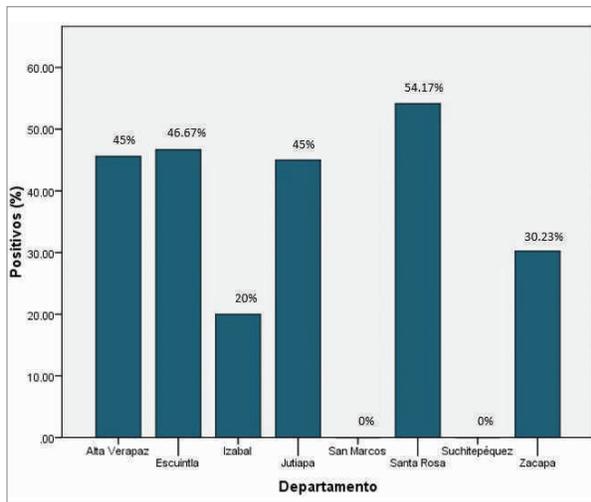


Figura 5. Casos de HLB detectados mediante PCR de punto final en *Diaphorina citri* provenientes de cultivos de cítricos de Guatemala.

Es de mencionar que existe pseudorreplicación en cuanto al análisis presentado en esta sección, puesto que no se contó con el mismo número de individuos en todos los departamentos y el esfuerzo de muestreo no fue el mismo en todos los casos. Es por esto que los casos positivos fueron transformados a porcentaje, obteniendo un método mejor de comparación.

Existen varias razones que pueden explicar por qué no hubo presencia de la bacteria *C. Liberibacter asiaticus* en los departamentos de San Marcos y Suchitepéquez (Figura 5). El número de insectos analizados para estos departamentos fue bajo y en el caso de las muestras provenientes de Suchitepéquez, no se sabe si provienen de una misma plantación. La bacteria puede que se encuentre en concentraciones muy bajas en cada insecto, por lo cual no pudo ser detectada o la tasa de infección era muy baja por lo que no se detectó ningún caso. A finales del 2014 se reportaron los primeros casos de HLB en el caso de Santa Rosa, por lo cual los resultados presentados en esta investigación conforman evidencia sólida de la expansión de dicha enfermedad a este departamento y a Escuintla. En el caso de San Marcos, se trata del departamento geográficamente más alejado de todos los analizados, y puede que la enfermedad aún no se encontrara presente en dicho lugar.

Conclusiones

Se estableció un protocolo de detección molecular de la bacteria causante de la enfermedad Huanglongbing en cítricos, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, en el vector *Diaphorina citri*.

El protocolo de extracción de ADN optimizado de Beard & Scott es el más recomendado por la calidad e integridad de ADN

que se obtiene mediante dicho método y la amplificación de ADN de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

Los cebadores HLB 1999 son más sensibles que los cebadores O1c-O12c en cuanto a la detección de la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri*, puesto que se detectaron más casos con ese par de cebadores ($p = 0.0068 \times 10^{-6} < 0.05$), tomando en cuenta las optimizaciones en cuanto a mezcla de reacción, programa de amplificación y condiciones de electroforesis.

Se detectaron en total 82 casos positivos de HLB para 8 departamentos analizados, correspondiendo el mayor porcentaje de casos positivos en Santa Rosa (54.17%), Escuintla (46.67%), Alta Verapaz (45.61%) y Jutiapa (45%).

Agradecimientos

Al personal del laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala por su apoyo durante las pruebas y por prestar el equipo, reactivos e instalaciones durante la fase experimental. A los licenciados Elena Dardón, Jeffrey Reina y Jonathan Morales por su asesoría durante el proceso de optimización en el laboratorio. También a personas individuales y personal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación por proporcionar las muestras de varios departamentos de Guatemala.

Bibliografía

- Beard, S.S., Scott, I.W. (2013) A rapid method for the detection and quantification of the vector-borne bacterium "*Candidatus Liberibacter solanacearum*" in the tomato potato psyllid, *Bactericera cockerelli* Entomologia Experimentalis et Applicata 147:196-200.
- Bové, J.M. (2006) Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus Journal of Plant Pathology 88 (1): 7-37.
- Da Graça, J.V. (2008) Biology, history and world status of Huanglongbing Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos, Sonora, México. 7 pp.
- Erlanson, M.A., Theilmann, D.A. (2009) PCR and virus-specific primer development In: *Insect Pathogens, Molecular Approaches and Techniques* Stock, S., Vandenberg, J. Glazer, I., Boemare, N. (Eds) CAB International, United Kingdom.
- García-Pérez, F., Ortega-Arenas, L. López-Arroyo, J. González-Hernández, A., Lomeli-Flores, J., Romero-Nápoles, J. (2013) Morphometry of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) on six Rutaceae from Veracruz, México Florida Entomologist 96(2): 529-537.
- Halbert, S.E., Manjunath, K.L. (2004) Asian citrus psyllids (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida Florida Entomologist 87(3): 330-353.
- Hung, T.H., Wu, M.L., Su, H.J. (1999) Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction Journal of Phytopathology 147:599-604.

- Hung, T.H., Hung, S.C., Chen, C.N., Hsu, M.H., Su, H.J. (2004) Detection by PCR of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: Application to the study of vector-pathogen relationships *Plant Pathology* 53(1): 96-102.
- Li, W., Hartung, J. Levy, L. (2007) Evaluation of DNA amplification methods for improved detection of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing *Plant Disease* 91:51-58.
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J.L., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Domínguez-Monge, D., González-Gómez, R. (2014) Situación Actual y Perspectivas del Manejo del HLB de los Cítricos Revisita Mexicana de Fitopatología 32: 108-119.
- Tapia, G. (2010) Situación actual, regulación y estrategias para el control del Huanglongbing (HLB) en la región del OIRSA Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). 5 pp.
- Teixeira, D.C., Danet, J.L., Eveillard, S., Martins, E.C., de Jesus Junior, M.W.C., Yamamoto, P.T., Lopes, S.A., Bassanezi, R.B., Ayres, A.J., Saillard, C., Bove, J.M. (2005) Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil : PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease *Molecular and Cellular Probes* 19:173-179.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H. (2002) *Compendium of Citrus diseases* Second edition. The American Phytopathological Society, Saint Paul USA 95 pp.
- Villagrán, G. (2014) Cítricos están en alerta fitosanitaria *Diario de Centroamérica [Guatemala]*. 13/10/2014.