



Aplicación de transcriptómica y metabolómica para la detección de HLB.

Machado, Rodrigo ¹(machado.rodriigo@inta.gob.ar) ; Lourdes, Burdyn ¹ (burdyn.lourdes@inta.gob.ar); Moschen, Sebastián ² (moschen.sebastian@inta.gob.ar); Fernández, Paula Del Carmen ³(fernandez.pc@inta.gob.ar) ;

1. Estación Experimental Agropecuaria INTA Concordia. C.C. N°34, (3200) Concordia, Entre Ríos, Argentina.
2. Estación Experimental Agropecuaria INTA Famaillá, Ruta Provincial 301 - Km 32, T4132 Famaillá, Tucumán
3. Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO) UEDD INTA CONICET, Nicolás Repetto y de los Reseros s/n (1686) Hurlingham, Argentina

A nivel mundial, la enfermedad más devastadora de los cítricos es el *Huanglongbing* (HLB). Se estima que ha causado la muerte de más de 63 millones de árboles, principalmente en Asia, Sudáfrica y Brasil ^{1,2}. HLB es una enfermedad de rápida diseminación, detectada por primera vez en el hemisferio Occidental en 2004, en Brasil ³; y en agosto de 2005 se reportó el primer brote en Florida, Estados Unidos ⁴.

En la zona citrícola de la Provincia de Entre Ríos- Argentina, se registra por primera vez la enfermedad en diciembre de 2017 ⁵, a partir de ese momento, se han encontrado alrededor de 70 casos positivos, entre plantas afectadas e insectos vectores ⁶.

El HLB está asociado con tres especies de bacterias limitadas al floema que no se han logrado cultivar de forma pura (cultivo axénico)⁷: “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas), “*Candidatus Liberibacter americanus*” (CLam), y “*Candidatus Liberibacter africanus*” (CLaf) ^{8,9}. Estas bacterias se transmiten a través de la reproducción de plantas, plantines o yemas enfermas; o mediante los insectos vectores *Diaphorina citri*, y *Trioza eritreae* (en África), que se alimentan de plantas enfermas y luego vuelan hacia otras transmitiendo la enfermedad. Cabe señalar que en nuestro país el insecto *D. citri* se encuentra ampliamente distribuido en el área citrícola de las provincias de Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Salta y Jujuy, así como también en las provincias de Formosa, Chaco y Santa Fe ¹⁰.

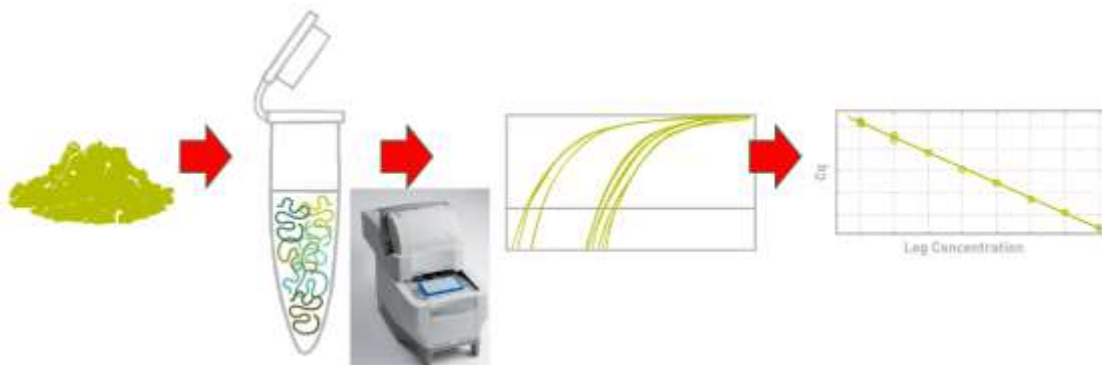
Las plantas más jóvenes infectadas con HLB expresan síntomas dentro de los 6 a 12 meses posteriores a la infección, lo que indica que los árboles jóvenes, cuyo crecimiento es rápido, tienen un período de incubación más corto. Es preciso destacar que observaciones de árboles mayores de 10 años indican un desarrollo de síntomas aún más lento ⁸.

A nivel mundial el diagnóstico de CLas, CLam y CLaf se realiza a través de la amplificación del fragmento ribosomal 16S mediante PCR cuantitativa (en inglés, *quantitative polymerase chain reaction*; *qPCR* o *Q-PCR*) o PCR en tiempo real (en inglés *real time*



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

PCR)¹¹. La qPCR es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Para la verificación final, estos ensayos son seguidos de PCR convencional y secuenciación de ADN¹².



El Laboratorio de Protección Vegetal y Biotecnología de la EEA Concordia inició los análisis en febrero de 2010 con el método de detección *real time* PCR con sonda Taqman, debido a la alta sensibilidad y especificidad de la reacción^{13,14}.

La tecnología *real time* PCR ofrece muchas ventajas sobre los ensayos de PCR convencionales, incluida la rapidez, la eficiencia, la eliminación de la contaminación por arrastre y la cuantificación¹¹. No obstante, a pesar de su sensibilidad, las *Candidatus liberibacters spp.* no se pueden detectar en hojas asintomáticas, ya que la distribución espacio-temporal del patógeno en los árboles es desigual¹⁵⁻¹⁹.

La detección de biomarcadores tempranos por herramientas “ómicas” es una alternativa muy interesante ya que reúne precisión y sensibilidad. Entre ellas podemos citar a la transcriptómica y la metabolómica, técnicas muy empleadas en las ciencias de las plantas²⁰ así como en el grupo de trabajo²¹⁻²³. Desde una estrategia de manejo integrado de la enfermedad, la detección temprana de la bacteria del HLB facilitaría la implementación de las prácticas de gestión requeridas de manera oportuna. Siendo estas técnicas de laboratorio las que confirmen las observaciones en campo²⁴

La transcriptómica podría permitirnos identificar genes candidatos a través de la secuenciación de ARN (ARN-seq) de plantas infectadas y no infectadas a distintos tiempos pos infección con el fin de contar la abundancia relativa de genes que puedan explicar el comportamiento diferencial en el progreso de la enfermedad, comparándolo con genes previamente identificados y/o reportados en la literatura, a través de un análisis de expresión diferencial.



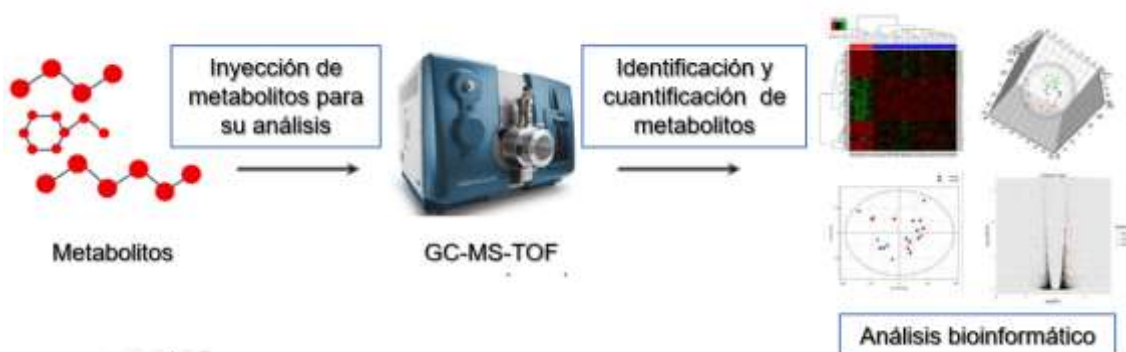
Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina



La metabolómica nos permitiría analizar el perfil metabólico de las mismas muestras utilizadas para transcriptómica. Para ello se realiza una extracción de metabolitos de los tejidos estudiados favoreciendo la extracción de compuestos lipofílicos y polares ²⁵.



Luego se inyectan alícuotas de derivados de estos compuestos en un sistema GC-MS-TOF y se procede a la identificación y cuantificación por espectrometría de masa y tiempo de retención mediante análisis comparativo con compuestos de referencia y colecciones de metabolitos disponibles. El análisis estadístico de agrupamiento de perfiles metabólicos se realiza a través del Análisis de Cluster Jerárquico (HCA) y Análisis de Componentes Principales (ACP).



Mediante la información recolectada y procesada por las herramientas ómicas desarrolladas, podríamos identificar biomarcadores asociados a la infección de plantas cítricas mediada por *Candidatus liberibacter* y comprender con mayor profundidad el proceso de infección a nivel de procesos biológicos involucrados y la interacción entre



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

posibles genes candidatos detectados y/o identificados. Para ello se explorarán distintas herramientas bioinformáticas a fin de integrar los datos provenientes de los análisis transcriptómicos y metabolómicos. Este perfil molecular detallado conduce invariablemente a un gran volumen de datos que sólo pueden ser interpretados adecuadamente con una rutina bioinformática sistematizada basado en un análisis estadístico robusto y significativo.

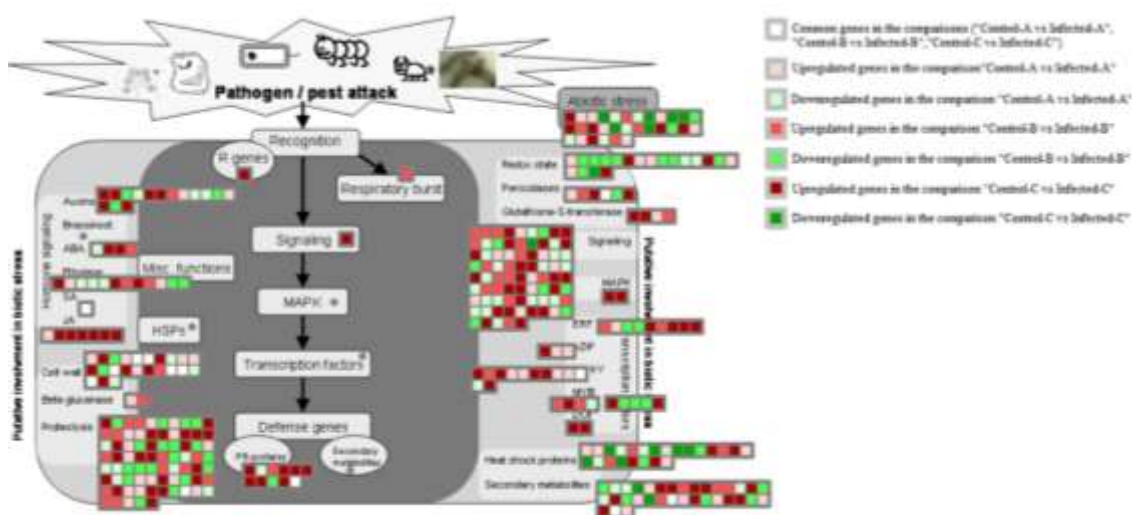


Imagen ilustrativa: Balan y col. 2018²⁶

El grupo de Protección Vegetal de la EEA INTA Concordia en cooperación con el Instituto de Biotecnología (IB) del CICVyA-CNIA, EEA INTA Bella Vista, EEA INTA Famaiyllá e EEA INTA Montecarlo se proponen como objetivo la aplicación de estas tecnologías emergentes, señaladas y desarrolladas anteriormente, para la identificación de genes candidatos y metabolitos asociados a la infección de diferentes genotipos de cítricos en zonas endémicas de HLB para ser utilizados como biomarcadores potenciales tempranos para detección de la enfermedad, así como la integración de los datos ómicos para abordar la enfermedad desde una perspectiva de biología de sistemas.

Bibliografía:

1. Robles-González MM, Joaquín Velázquez-Monreal J, Miguel ;, et al. Aceptado: 1 de febrero. *Rev Chapingo Ser Hortic.* 2013;19(1):15-31. doi:10.5154/r.rchsh.2012.01.005
2. Santivañez T, Mora G, Díaz G, López J, Vernal P. *Marco Estratégico Para La Gestión Regional Del Huanglongbing En América Latina y El Caribe.*; 2013. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2017000669>.



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

3. Teixeira DC, Ayres J, Kitajima EW, et al. First Report of a Huanglongbing-Like Disease of Citrus in Sao Paulo State, Brazil and Association of a New Liberibacter Species, “*Candidatus Liberibacter americanus*”, with the Disease. *Plant Dis.* 2005;89(1):107-107. doi:10.1094/pd-89-0107a
4. HALBERT, SE. The discovery of huanglongbing in Florida. *Proc Int citrus canker huanglongbing Res Work Orlando, H-3, 2005.* 2005.
5. HLB en Entre Ríos: piden reforzar el monitoreo de los lotes - INTA Informa. <https://intainforma.inta.gob.ar/hlb-en-entre-rios-piden-reforzar-el-monitoreo-de-los-lotes/>. Published December 29, 2017. Accessed April 23, 2020.
6. SENASA, Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. *HLB. Análisis Epidemiológico (Datos a Diciembre 2019). República Argentina.*; 2020. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/hlb_pais_dic2019.pdf. Accessed April 25, 2020.
7. Ha PT, He R, Killiny N, et al. Host-free biofilm culture of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” the bacterium associated with Huanglongbing. *Biofilm.* 2019;1(June):100005. doi:10.1016/j.biofilm.2019.100005
8. Gottwald TR. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing *. *Annu Rev Phytopathol.* 2010;48:119-139. doi:10.1146/annurev-phyto-073009-114418
9. Chin EL, Ramsey JS, Mishchuk DO, et al. Longitudinal Transcriptomic, Proteomic, and Metabolomic Analyses of Citrus sinensis (L.) Osbeck Graft-Inoculated with “*Candidatus Liberibacter asiaticus*.” *J Proteome Res.* 2020;19(2):719-732. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00616
10. Burdyn L, Bouvet JP, Hochmaier V. INTA EEA Concordia: Guía para identificar Huanglongbing (HLB) y su insecto vector. <https://inta.gob.ar/documentos/guia-para-identificar-huanglongbing-hlb-y-su-insecto-vector>.
11. Li W, Hartung JS, Levy L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods.* 2006:104-115.
12. National Academies of Sciences, Engineering and M. *A Review of the Citrus Greening Research and Development Efforts Supported by the Citrus Research and Development Foundation: Fighting a Ravaging Disease (2018).*; 2018. doi:10.17226/25026
13. Plata Tamayo MI. DIAGNÓSTICO DE HUANGLONGBING (HLB) EN LA EEA CONCORDIA DEL INTA:: FeCiER - Federación del Citrus de Entre Ríos. https://www.fecier.org.ar/noticias/3057_diagnostico-de-huanglongbing-hlb-en-la-eea-concordia-del-inta.html. Published March 28, 2016. Accessed April 25, 2020.
14. Joris G. Fecha actualización Fortalecimiento del Laboratorio de Biotecnología EEA Concordia. https://inta.gob.ar/sites/default/files/fortalecimiento_del_laboratorio_de_biotecnologia_inta_c concordia.pdf. Published April 3, 2018. Accessed April 25, 2020.
15. Bové JM. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology.* 2006:7-37.
16. Tatineni S, Sagaram S, Gowda S, et al. In Planta Distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” as Revealed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. 2008. doi:10.1094/PHYTO-98-5-0592
17. Li W, Levy L, Hartung JS. Quantitative Distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in Citrus Plants with Citrus Huanglongbing. *Phytopathology.* 2009;99(2):139-144. doi:10.1094/phyto-99-2-0139



Ministerio de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Argentina

18. Kunta M, da Gracxa J V., Malik NSA, Louzada ES, Sétamou M. Quantitative distribution of *Candidatus liberibacter asiaticus* in the aerial parts of the huanglongbing-infected citrus trees in Texas. *HortScience*. 2014;49(1):65-68. doi:10.21273/hortsci.49.1.65
19. Louzada ES, Vazquez OE, Braswell WE, Yanev G, Devanaboina M, Kunta M. Distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” Above and Below Ground in Texas Citrus. 2016. doi:10.1094/PHYTO-01-16-0004-R
20. Auer PL, Doerge RW. Statistical design and analysis of RNA sequencing data. *Genetics*. 2010:405-416.
21. Moschen S, Luoni SB, Paniago NB, et al. Identification of candidate genes associated with leaf senescence in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *PLoS One*. 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0104379
22. Moschen S, Bengoa Luoni S, Di Rienzo JA, et al. Integrating transcriptomic and metabolomic analysis to understand natural leaf senescence in sunflower. *Plant Biotechnol J*. 2016;14(2):719-734. doi:10.1111/pbi.12422
23. Moschen S, Di Rienzo JA, Higgins J, et al. Integration of transcriptomic and metabolic data reveals hub transcription factors involved in drought stress response in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Mol Biol*. 2017;94(4-5):549-564. doi:10.1007/s11103-017-0625-5
24. Smith AM, Heisler LE, Mellor J, et al. Quantitative phenotyping via deep barcode sequencing. *Genome Research*. 2009:1836-1842.
25. Roessner U, Dias Anthony D. Plant Tissue Extraction for Metabolomics. In: *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery*. Vol 1055. ; 2013:57-70. doi:10.1007/978-1-62703-577-4
26. Balan B, Ibáñez AM, Dandekar AM, Caruso T, Martinelli F. Identifying Host Molecular Features Strongly Linked With Responses to Huanglongbing Disease in Citrus Leaves. *Front Plant Sci*. 2018;9(February):1-13. doi:10.3389/fpls.2018.00277