

PERFILAMIENTO METABÓLICO PARA LA DETECCIÓN DE HLB EN CÍTRICOS

José I. Reyes De Corcuera¹
Juan Manuel Cevallos-Cevallos

RESUMEN

Huanglongbing (HLB) es considerada por muchos como la enfermedad más destructiva en cítricos a nivel mundial. Su agente causal, *Candidatus Liberibacter*, es una bacteria no cultivable. Por lo tanto, métodos de detección son un problema. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es el único método aprobado para el diagnóstico de HLB. Sin embargo, PCR no es muy laborioso, costoso, y no permite análisis en el campo. Es posible desarrollar ensayos rápidos, sensores o biosensores portátiles y económicos para detectar cambios en concentraciones de metabolitos específicos del HLB. Sin embargo, aún no se identifican dichos metabolitos. Hojas de naranjos 'valencia' sanas, infectadas con HLB, y con deficiencia de zinc fueron muestreadas de diciembre de 2007 a abril de 2008 y analizadas por técnicas metabolómicas basadas en HPLC, GC, y electroforesis de capilar para encontrar metabolitos marcadores del HLB. Resultados muestran que naringenina, cuercitina, hesperidina y L-prolina son aparentemente los metabolitos más indicados para detectar HLB

PALABRAS CLAVE

Huanglongbing, metabolómica, GC-MS, HPLC,MS, electroforesis de capilar.

ABSTRACT

Huanglongbing is (HLB) considered by many the most destructive citrus disease worldwide. Its causal agent, *Candidatus Liberibacter*, is a fastidious bacteria. Therefore, it is difficult to detect it. Polymerase chain reaction (PCR) is the only approved method of diagnosis of HLB. However, PCR is expensive, time-consuming and cannot be done in the field. It is possible to develop rapid assays, sensors and biosensors for HLB-specific metabolite biomarkers. However, such metabolites have not been identified yet. Healthy and HLB-infected and zinc-deficient 'Valencia' orange leaves were sampled from December 2007 to April 2008 and analyzed by metabolomic techniques based on HPLC, GC and capillary electrophoresis. Naringenin, quercetin, hesperidin and L-proline appear to be the best indicators of HLB.

¹ Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, FL
Correspondencia: José I. Reyes De Corcuera: jireyes@ufl.edu

INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing cítrico (HLB) es quizás la enfermedad más dañina de los cítricos. Actualmente esta enfermedad afecta considerablemente la producción en Florida y Brasil y amenaza la industria mexicana. El HLB es transmitido principalmente por dos especies de insectos que sirven como vector para la bacteria *Candidatus Liberobacter* (Chungkin y otros, 2006). Detección Temprana y eliminación de árboles enfermos son vitales para controlar su esparcimiento. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es el único método aprobado para la detección del HLB; sin embargo tiene algunas desventajas. Hung y otros, (2004) mostraron evidencia de 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 (Kawabe y Onuki, 2003). No obstante, estos métodos requieren mucho tiempo (12 h), son costosos, y no permiten el análisis en campo. Alternativas al PCR se están investigando. Schneider (1968) sugirió que el almidón se acumula anormalmente en las hojas infectadas. Felman y Hanks (1969) encontraron que el gentosil glucósido se encontraba en mayor abundancia en plantas con HLB. Kawano y otros, (2006) desarrollaron un kit para diagnóstico de HLB basado en la reacción del yodo con el almidón presente en las muestras infectadas. Taba y otros, (2006) demostraron que el método del almidón concuerda el 75% de las veces con PCR en hojas y el 95% en otras partes de los árboles. La investigación actual se centra en la cuantificación del almidón en árboles con HLB usando los métodos espectrofotométricos (Taba, 2006). Este acercamiento nuevo puede ayudar a distinguir la acumulación de almidón debido a HLB en comparación con otros factores (Taylor y otros, 1996). Sin embargo, existe preocupación por este método, debido a que el almidón puede acumularse en las hojas de los árboles por factores como deficiencia de cinc, o el anillamiento (Li y otros, 2003). Otra herramienta potencial para la detección de HLB se puede desarrollar basada en la metabolómica. La metabolómica se puede definir como el estudio de los metabolitos pequeños presentes en un sistema. El perfil de metabolitos se puede considerar como una huella dactilar para el HLB. Kell y otros, (2005) sugirieron estas técnicas para una mejor comprensión de los metabolitos de la planta durante enfermedades. Además Glauser y otros, (2008) utilizaron con éxito cromatografía líquida de alta presión (HPLC) junto con resonancia magnética nuclear (NMR) para identificar biomarcadores de tensión en la planta. Si bien la mayor parte de la investigación en detección del HLB se ha enfocado en el uso de técnicas de biología molecular, los cambios en el perfil de metabolitos ocurridos durante la infección de HLB se pueden cuantificar para determinar los compuestos principales que se están creando o consumiendo durante la respuesta fisiológica del árbol o metabolismo bacteriano. La identificación de estos compuestos dominantes puede servir como línea base para el desarrollo de una técnica rápida de diagnóstico.

El objetivo de este artículo es resumir la investigación en metabolómica realizada en nuestro laboratorio en los últimos 24 meses. Parte de la investigación ya ha sido publicada, parte se acaba de mandar publicar y parte es completamente nueva. Esta investigación se basa en el uso de múltiples técnicas: HPLC-MS, GC-MS, y electroforesis de capilar (CE) encontrar marcadores de HLB que sirvan como base para el desarrollo de métodos de diagnóstico rápido y barato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Tetraborato de sodio decahidratado, 1-butanol, etanolamida, acetato de sodio, fosfato de sodio, hexano, dodecil sulfato de sodio, naringenina, narirutina, hesperidina, tangeritina, sinefrina, cuercitina, ácido gentísico, ácido ferrúlico, metanol, cloroformo, acetonitrilo, ácido acético, hidrocloreuro de metoxamina (20mg/mL) en piridina (MOX) y *N*-metil-*N*-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA) fueron comprados a Fisher Scientific, Inc. (Miami, OK). Agua desionizada y ultrafiltrada ($\Omega > 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) se utilizó para la preparación de todas las soluciones acuosas.

Equipo

Extracciones y reacciones de derivatización de metabolitos fueron realizadas en un baño termostataado modelo Isotemp 3016S (Fisher Scientific, Miami OK). Se utilizaron los siguientes instrumentos analíticos:

- Sistema CE con detector de arreglo de fotodiodos modelo P/ACE MDQ con programa de adquisición y análisis de datos Karat 32 versión 5.0 (Beckman Coulter, Fullerton, CA.)
- Sistema de HPLC-MS modelo LCQ Advantage Ion Trap con ionización de electrospray y programa de adquisición y análisis de datos Xcalibur veresión 2.0 (Thermo Scientific, Waltham, MA)
- GC modelo HP 5890 acoplado a un MS modelo HP 5971 con programa de adquisición de datos ChemStation B.02.02 y biblioteca de compuestos Wiley 138K (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). La columna usada fue DB5MS de 60 m x 0.25 mm (J & W Scientific, Folsom, CA). Los datos de GC-MS se alinearon usando el programa MetAlign. El análisis de componentes principales y el análisis de varianza se realizaron usando MATLAB 8.0 (The MathWorks, Natick, MA). Diferencias significativas se reportaron a un nivel de confianza del 95%

Métodos

Muestreo en campo

Hojas de naranjo 'Valencia' de aproximadamente 10 años, saludables (negativas por PCR) o infectadas de HLB (positivas por PCR) fueron recolectadas de una huerta en Plant City, FL. Sólo tres árboles infectados se retuvieron de diciembre de 2007 a abril de 2008. Por lo menos tres hojas con distintos niveles (del 0 para hojas sanas hasta 4 para hojas con clorosis muy pronunciada) de síntomas fueron recolectadas de cada árbol, cada mes.

Muestreo de árboles inoculados en invernadero

Plantas jóvenes (2 meses de edad) de las variedades 'Madam Venus', 'Toronja Duncan', 'Carrizo', y 'Trifoliata', fueron inoculadas por injerto con HLB. Se utilizaron 3 plantas control y 6 plantas inoculadas por cada variedad. Cada 2 semanas se muestrearon 2 hojas por planta: 1 hoja vieja y 1 nueva (nuevos brotes). Estas muestras se analizaron por GC-MS únicamente.

Todas las muestras se almacenaron congeladas a -80 °C en bolsas dobles de plástico hasta su análisis.

CE

Las condiciones óptimas de extracción, separación y detección de metabolitos de hojas de naranjo por CE fueron estudiadas por Cevallos y otros (2009) y se describe a continuación. Cada hoja fue pesada inmediatamente y molida en nitrógeno líquido. Después se agregó una mezcla de metanol, agua y cloroformo 8:1:1 hasta alcanzar una proporción de tejido molido de 4% m/v y se sonicó por 30 min en un baño de hielo, seguido por extracción a 0 °C por 12 h. Como electrolito de fondo se utilizó una solución de 15% de acetonitrilo, 0.8% de hexano, 15% dodecil sulfato de sodio y 20% 1-butanol en solución de borato de sodio 10 mM a pH 9.3. La separación se llevó a cabo a 20 kV y 25 °C. Antes de la separación, el capilar fue acondicionado por 10 min en ácido clorhídrico 0.1 M, 5 min en hidróxido de sodio 1 M y 20 min en el electrolito de fondo con enjuagues de 2 min con agua entre cada solución. Se registró el espectro UV-Visible de 190 a 600 nm para cada pico del electroferograma y se comparó con los espectros de estándares puros. La movilidad de cada pico se calculó usando como referencia sinefrina y ácido ferrúlico.

HPLC-MS

Cada hoja fue pesada inmediatamente y molida en nitrógeno líquido. Después se agregó el peso equivalente de cloroformo y se llevó a una extracción a 0 °C

por una hora. Al término de ésta, se agregó metanol al 80% con cloroformo para obtener una proporción final de 5:1 metanol-cloroformo. Extracción en esta solución se llevó a cabo a 0 °C por 12 h. Después las muestras se filtraron con un filtro de nylon de 0.45 µm y se inyectó al HPLC con una columna de fase estacionaria tipo C-18. La fase móvil consistió en una mezcla de soluciones: 80% ácido acético al 0.05% en agua y 20% de acetonitrilo al 0.05% en agua. Se mantuvo esta concentración durante los primeros 12 min seguidos de un gradiente aplicado por 47 min hasta llegar a una concentración final del 90% de solución de acetonitrilo y 10% de solución de ácido acético. Esta última concentración se mantuvo por 11 min. El MS se operó en el intervalo de 80 a 1000 m/z.

GC-MS

La extracción de metabolitos para análisis por GC-MS fue idéntica a la utilizada para CE. Se transfirieron 180 µL de extracto a un vial y se secó bajo flujo de nitrógeno. Se agregaron 30 µL de MOX al extracto seco y se dejó reaccionar por 17 h a temperatura ambiente. Sililación de la muestra se realizó agregando 80 µL de MSTFA y dejando reaccionar por 2 h. Se inyectaron alícuotas de 0.3 µL de muestra derivatizada al GC-MS. El inyector se mantuvo a 280 °C y el horno a 70 °C por un min. La temperatura se incrementó a 8 °C min⁻¹ hasta alcanzar una temperatura final de 315 °C y se mantuvo esta última por 5 min. Hidrógeno y nitrógeno ultrapuros se utilizaron como gases de transporte y purga respectivamente. El MS utilizó en modo de impacto de electrón con polaridad positiva y se registró la corriente total de iones. La interfase entre el GC y el MS se controló a 318 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CE

Un total de 36 muestras infectadas y 18 saludables fueron analizadas por PCR. Se detectaron 24 picos en los electroferogramas de los cuales se identificaron ácido ferrúlico, ácido gentísico, ácido oxálico, hesperidina, naringerina, nariturina, cuercitina, sinefina y tangeritina. El resto fueron reportados como "desconocido". De estos compuestos, seis (hesperidina, naringenina, cuercitina y tres desconocidos) aparecieron en concentraciones significativamente ($p < 0.05$) mayores en muestras infectadas a las saludables. Estos marcadores potenciales de HLB se muestran en la Figura 1. Hesperidina, naringenina, cuercitina y el compuesto no identificado 1 mostraron la mayor abundancia aparente expresada en términos de área bajo pico. Por lo tanto, es probable que su detección en campo sea más fácil. Sin embargo, el mayor cambio relativo de concentración lo presentó el compuesto no identificado 3, y es por lo tanto el compuesto más específico de HLB seguido por el compuesto desconocido 1. En el inserto de la

Figura 1 se marcan los picos y los tiempos de retención de estos compuestos. La identificación de los compuestos desconocidos no fue posible con nuestro equipo ya que nuestra base de datos de espectros es pequeña. El acoplamiento de un espectrómetro de masas es necesario para mayor caracterización de estos metabolitos. Nuestro equipo (Cevallos y otros 2009) publicó el primer estudio de CE en extractos de hojas de naranjo donde se detallan estos resultados y discuten los procedimientos de optimización de condiciones experimentales. Otros estudios de CE en naranja se han realizado exclusivamente en el fruto o jugo por lo que no es posible comparar nuestros resultados con otros.

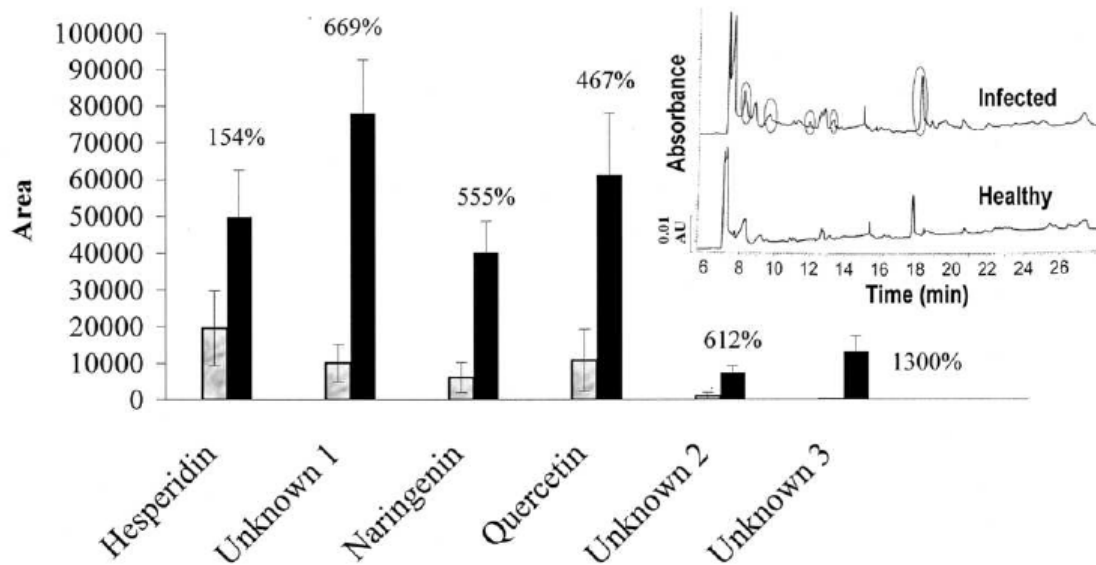


Figura 1. Posibles marcadores de HLB detectados por electroforesis de capilar.

HPLC-MS

Cerca de 900 compuestos se detectaron por HPLC-MS como se muestra en la Figura 2. Se detectaron tres zonas en las que las áreas bajo la curva de los cromatogramas variaron monótonamente con el nivel de infección. En la zona 1 que va de 5 a 14 min de elución y en la zona 2 que va de 20 a 30 min, el área bajo la curva aumentó. La Figura 3 muestra la relación entre el nivel arbitrario de síntomas y el área bajo la curva para las zonas 1 y 2. En contraste, en la zona 3 que va de 50 a 70 min el área bajo la curva disminuyó. Algunos los compuestos en la zona 3 corresponden a clorofila y derivados cuya concentración evidentemente disminuye con la clorosis producida por el HLB. Sin embargo, la inmensa mayoría de los compuestos no ha sido identificada ya que las bases de datos comerciales compilan metabolitos principalmente de origen animal. Manthey (2008) realizó experimentos similares pero con un procedimiento de extracción diferente en el que secó hojas al vacío y extrajo los metabolitos

exclusivamente con metanol. Manthey (2008) encontró por HPLC-MS diferencias grandes en las concentraciones de limonin glucósido, de un compuesto con ion protonado de m/z 188 amu y de heptametoxiflavona. También obtuvo resultados similares a los que nosotros reportamos por CE para hesperidina con concentración media 1.4 veces mayor en hojas de naranjo 'Valencia' infectadas con HLB. Más aún, Manthey reportó un grupo de hidroxicinamatos con concentraciones medias cerca del doble en muestras con HLB pero no pudo tampoco reportar exactamente qué compuestos eran. Esto confirma que la necesidad de establecer una base de datos de metabolitos de cítricos es patente y se están realizando esfuerzos de colaboración con el Servicio de Investigación en Agricultura del USDA, Laboratorio de Cítricos y Productos Subtropicales y el Departamento de Cítricos de Florida para conseguir los fondos necesarios para esta labor extensiva.

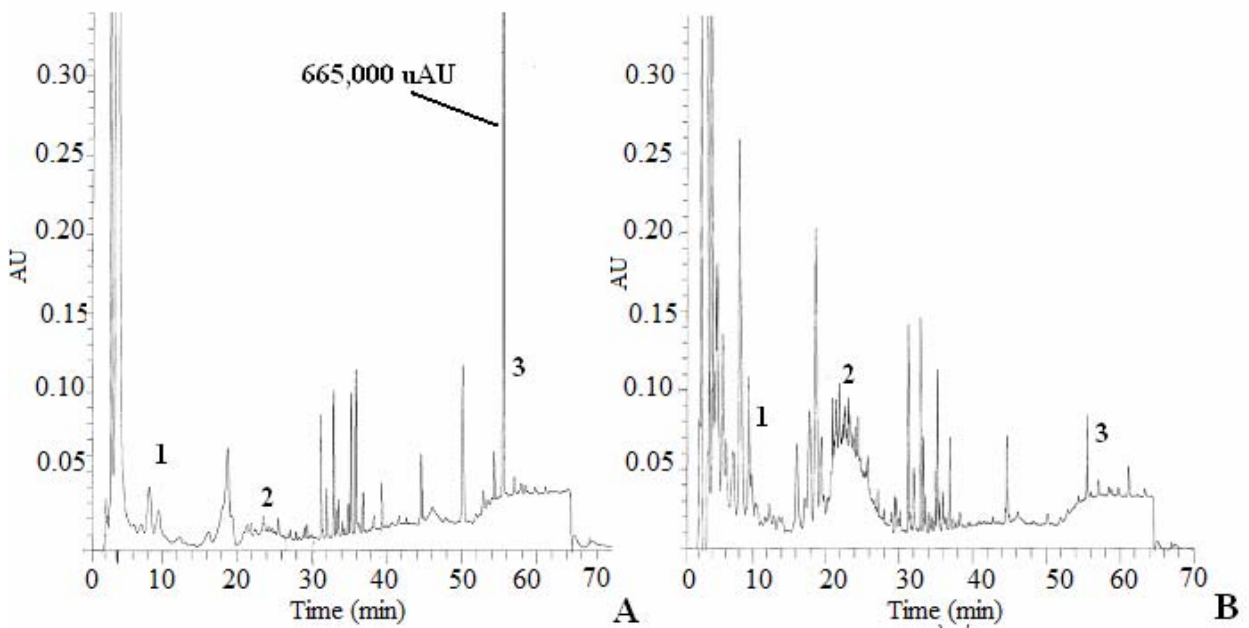


Figura 2. Cromatogramas típicos de HPLC de (A) hojas sanas y (B) infectadas con síntomas en IE 2. Números 1, 2 y 3 en el cromatograma representan las áreas de interés donde cambios significantes ($p < 0.05$) han ocurrido

GC-MS

Comparación de hojas sanas y hojas infectadas con HLB

Se detectaron 48 compuestos abundantes por GC-MS en todas las hojas analizadas. L-prolina, myo-inositol y un compuesto desconocido estaban en mayor concentración en hojas con HLB comparado con hojas sanas como se ilustra en la Figura 4. Sin embargo, la concentración de myo-inositol no fue

significativamente diferente en hojas con deficiencia de cinc. La acumulación de prolina se ha reportado en enfermedades bacterianas de otras plantas como papa. (Abu-Nada et al., 2007) y se debe probablemente a la inhibición de la síntesis de proteínas.

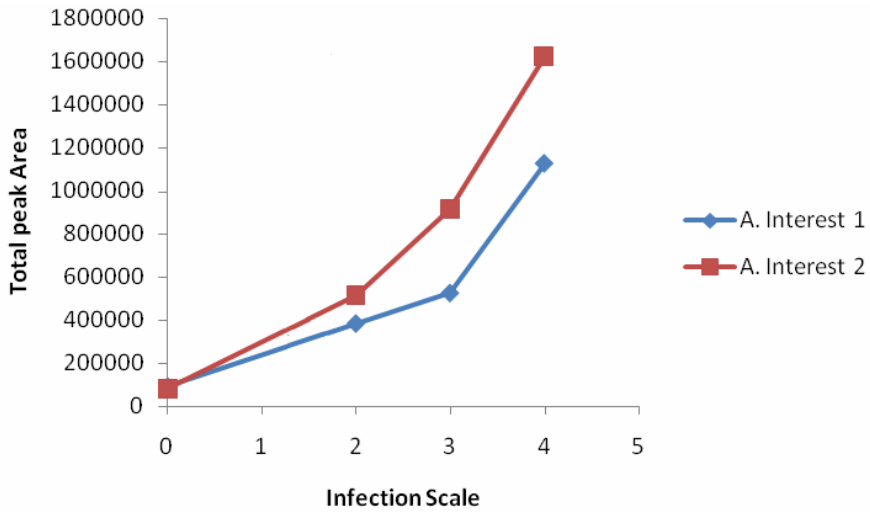


Figura 3. Cambios en las áreas correspondientes a metabolitos de las zonas 1 y 2 con respecto a la intensidad de síntomas.

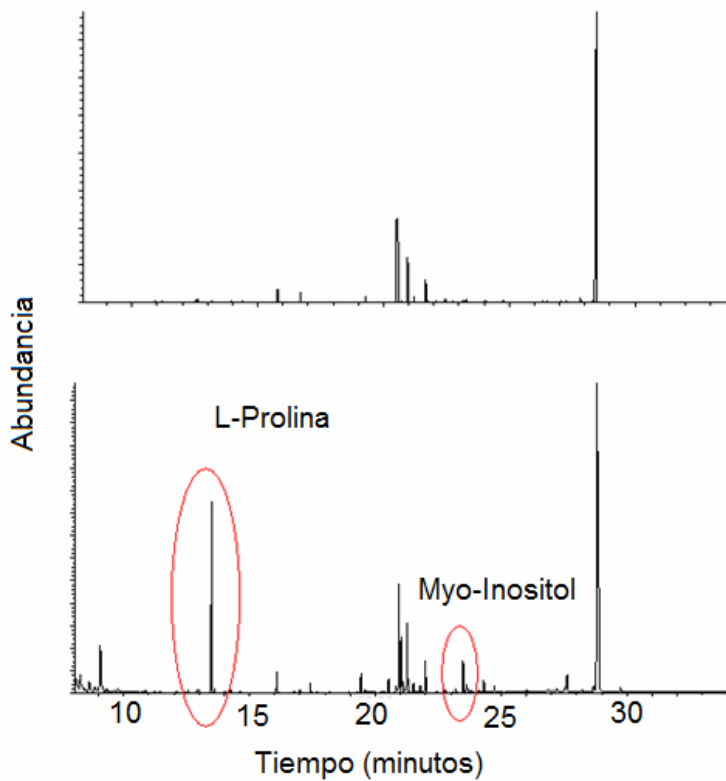


Figura 4. Cromatograma con posibles marcadores de HLB detectados por GC-MS.

Cambio de perfil de metabolitos después de inocular con HLB

Durante las primeras 10 semanas post-inoculación no se detectaron síntomas ni cambios significativos en los perfiles de metabolitos en ninguna de las cuatro variedades estudiadas. Sin embargo, en la semana 14, para la variedad 'Madam Venus', el análisis de componentes principales de los análisis de GC-MS reveló un agrupamiento muy claro de las plantas infectadas por una parte y por la otra las plantas sanas. No se pudo diferenciar entre hojas jóvenes y hojas viejas como se muestra en la Figura 5. Esto indica que el cambio en metabolitos ocurre en toda la planta y apoya la hipótesis de que la detección temprana de HLB a través del muestreo de hojas y su análisis de metabolitos es viable. Sin embargo, esta observación debe confirmarse en árboles grandes y en otras variedades.

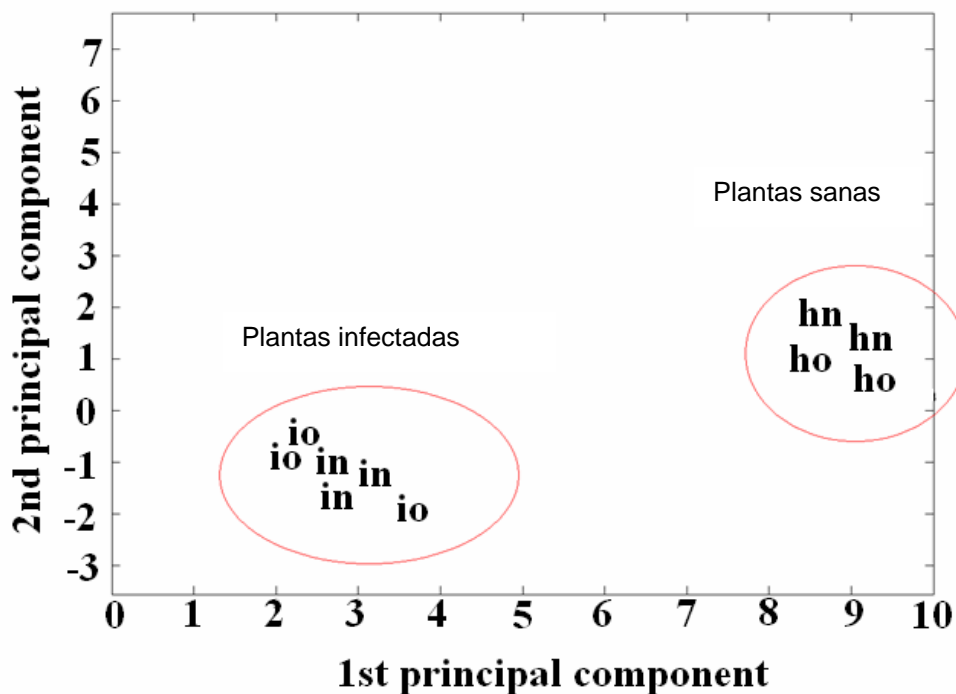


Figura 5. Análisis de componentes principales de hojas jóvenes (sufijo “n”) y viejas (sufijo “o”) de plantas infectadas (i) o saludables (h).

El análisis de varianza de las áreas bajo la curva para este cítrico indica diferencias significativas en las concentraciones de sucrosa, myo-inositol, glucosa o glucol, fructosa o fructol, ribosa o ribol, L-prolina y tres compuestos desconocidos. La abundancia y tiempos de retención de los compuestos detectados se muestra en la Figura 6. Si bien las plantas inoculadas con HLB mostraron ligeros síntomas de la enfermedad, los análisis de PCR fueron negativos en esa semana. Las otras tres variedades de cítricos aún no muestran

cambios en perfiles de metabolitos ni son positivos por PCR. Este estudio está en proceso actualmente.

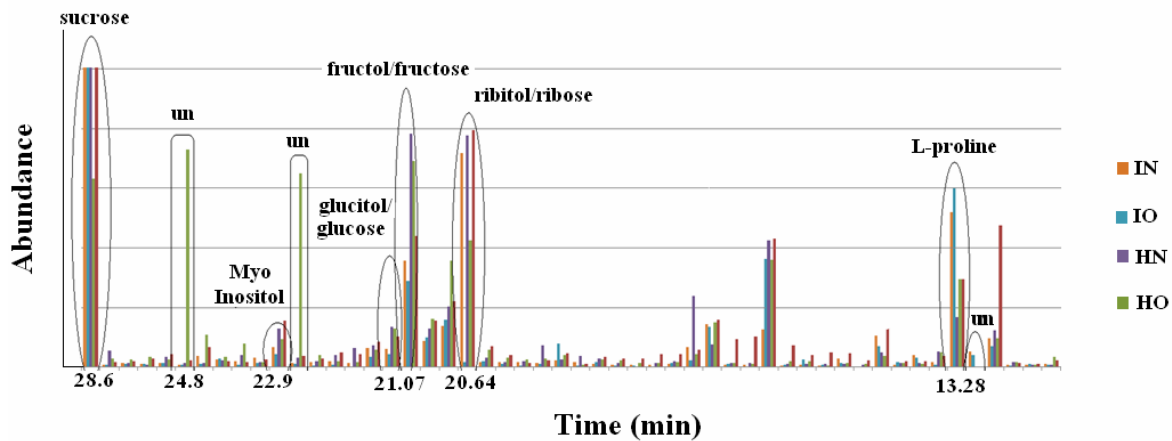


Figura 6. Perfil de metabolitos presentes en la semana 14 post-inoculación en 'Madam Venus' en hojas nuevas y viejas de plantas saludables (HN y HO respectivamente) así como de hojas nuevas y viejas de plantas con HLB (IN y IO respectivamente).

CONCLUSIONES

Se detectaron diversos metabolitos como posibles candidatos a biomarcadores para la detección del HLB en hojas claramente sintomáticas usando tres métodos analíticos complementarios. L-prolina, hesperidna, cuercitina y naringenina se identificaron en concentraciones más abundantes en plantas con HLB y son ahora el foco de un estudio de largo plazo para confirmar su validez como biomarcadores de HLB. Nuestros datos sugieren que el perfilamiento metabólico es capaz de identificar diferencias entre plantas saludables y plantas infectadas antes que análisis por PCR. Esta observación preliminar debe confirmarse para distintas variedades de cítricos durante las próximas tres temporadas.

LITERATURA CITADA

Abu-Nada Y, Kushalappa A, Marshall W, Al-Mughrabi K, and Murphy A. 2007. Temporal dynamics of pathogenesis-related metabolites and their plausible pathways of induction in potato leaves following inoculation with *Phytophthora infestans*. Euro. J. Plant Pathol. 118:375-91.

- Bove J. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathol.* 88(1):31.
- Chung, K. and R. Brlansky. 2006. Citrus diseases exotic to Florida: Huanglongbing (Citrus Huanglongbing). *IFAS Bul.* PP 210.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Etxeberria, E., Rouseff, R. and Reyes-De-Corcuera, J. I. (2008) Metabolite profiling of healthy and huanglongbing-infected citrus leaves. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 121, 85-89.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Rouseff, R. and Reyes-De-Corcuera, J. I. (2009) Untargeted metabolite analysis of healthy and Huanglongbing-infected orange leaves by CE-DAD. *Electrophoresis*, 30, 1240-1247.
- Ding, F., G. Yi., and G. Wang. 2004. Research on the PCR and nested-PCR detection of citrus Huanglongbing pathogen. *Acta. Hort. Sin.* 31(6):803-806.
- Felman, A.W. y Hanks, R.W. 1969. The occurrence of a gentisic glucoside in the bark and albedo of virus-infected citrus trees. *Phytopathology* 59:603-606.
- Glauser, G., D. Guillarme, E. Grata, J. Boccard, A. Thiocone, P. Carrupt, J. Veuthey, S. Rudaz, and J. Wolfender. 2008. Optimized liquid chromatography–mass spectrometry approach for the isolation of minor stress biomarkers in plant extracts and their identification by capillary nuclear magnetic resonance. *J. Chromat.* 1180 (1):90-98.
- Hung, C., M. Chen, H. Hsu, and H. Su. 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 Pathol.* 53:96-102.

Kawabe, K and M. Onuki. 2003. Quantification of citrus-citrus Huanglongbing disease pathogens using competitive PCR. JIRCAS Research Highlights 64- 65.

Kawano, S., T. Tetsuya, O. Atsushi, M. Numazawa, and K. Yasuda. 2006. The simple and rapid diagnosis of citrus huanglongbing (Citrus Huanglongbing) by Scratch method. Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, Makabe 820, Itoman, Okinawa, 901-0336.

Kell, D., M. Brown, H. Davey, W. Dunn, I. Spasic, and S. Oliver. 2005. Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message. Nat. Rev. Microbiol. | AOP, published online 10 June 2005. p 9.

Li, C., D. Weiss, and E. Goldschmidt. 2003. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate-bearing citrus trees. Ann. Bot. 92:137-143.

Manthey, J.A. 2008. Differenced in secondary metabolites in leaves from orange (*Citrus sinensis* L.) trees affected with greening disease (Huanglongbing) (HLB). Proc. Fla. State. Hort. Soc. 121:285-288.

Satoshi F., S. Tetsuji, and S. Hiroaki. 2006. Detection of citrus Huanglongbing disease (*Candidatus* *Liberobacter asiaticum*) by loop-mediated isothermal amplification. Res. Bul. Plant Protect. Serv. Jap. (42):86-87.

Schneider, H. 1968. Anatomy of citrus Huanglongbing-diseased sweet orange shoots. Phytopathology 58:1155-1160.

Taba S., K. Nasu, K. Takaesu, A. Ooshiro, and Z. Moromizato. 2006. Detection of citrus Huanglongbing using an iodo-starch reaction. Science bulletin - Faculty of Agriculture University of the Ryukyus (53):19-24.

Taylor L., G. Albrigo, y C. Chase. 1996. Purification of a Zn-binding phloem protein with sequence identity to chitin-binding proteins. Plant Physiol. 11:657-664.