



■ PROBLEMA ABORDADO

El riesgo de propagación de '*Candidatus Liberibacter africanus*'

Se sabe muy poco sobre las plantas huésped alternativas e insectos vectores del importante agente patógeno '*Candidatus Liberibacter africanus*', asociado con la enfermedad del "huanglongbing" que afecta a los cítricos. Esta falta de conocimiento es muy grave, ya que la importación de dichas plantas o una introducción accidental del insecto vector, podrían ser un medio de propagación del patógeno en partes del mundo todavía no infectadas, entre ellas Europa. Se han realizado estudios de muestras de potenciales plantas huésped alternativas, centrados principalmente en especies que se encuentran en el oeste de Sudáfrica, en los que se ha mostrado que los especímenes de árboles y arbustos de la familia Rutaceae, plantas autóctonas de Sudáfrica, están comúnmente infectadas por dichas bacterias, con una subespecie para cada género vegetal. Es importante verificar si existen plantas huésped alternativas a los cítricos en Sudáfrica para este patógeno y para ello se ha utilizado la morfología y la técnica del código de barras para confirmar su identidad. Se ha realizado el seguimiento de las especies de psílicos observadas en dichas plantas. También se aplicaron métodos taxonómicos y moleculares para la identificación de los psílicos.



- Arriba: síntomas del "huanglongbing". Abajo izquierda: el psílido *Trioza erytreae*, vector de '*Candidatus Liberibacter africanus*'. Abajo derecha: marcas de las ninfas de *T. erytreae* en hojas de *Vepris lanceolata*.



■ RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN MÁS RECIENTES

Plantas huésped alternativas de '*Candidatus Liberibacter africanus*' *sensu lato* en Sudáfrica

Se están realizando estudios para determinar si las especies autóctonas de Rutaceae (*Calodendrum capense*, *Clausena anisata*, *Oricia* spp., *Teclea* spp., *Vepris* spp. y *Zanthoxylum* spp.), sirven como reserva de patógenos peligrosos, como es el caso de '*Candidatus Liberibacter africanus*', asociado a la enfermedad del "huanglongbing". Se ha visto que cada género autóctono contenía una cepa única de '*Ca. L. africanus*' (Roberts *et al.*, 2015). Además, en estos primeros análisis se ha revelado que un porcentaje relativamente alto de las muestras recogidas para cada tipo de planta contaba con el patógeno, lo cual indica una presencia frecuente y extendida de esta bacteria en Sudáfrica.

Estos estudios se han ampliado para incluir el grupo de los fynbos dentro de la familia de las Rutáceas propia de Cabo Occidental, excluyendo los huéspedes de no rutáceas. Para este trabajo se utilizó el ensayo PCR de todo el género '*Candidatus Liberibacter*' (Roberts *et al.*, 2015). En cuanto a los insectos vectores, el psílido *Trioza erytrae* es conocido como un vector de '*Ca. L. africanus*', mientras que *Diaphorina citri* puede transmitir la bacteria experimentalmente. Todavía se desconocen si hay más insectos vectores de las diversas cepas '*Ca. L. africanus*' detectadas.



Vepris lanceolata



Calodendrum capense



Zanthoxylum capense



Teclea spp



Oricia bachmannii



Clausena anisata

- Huéspedes de la familia de las rutáceas para '*Candidatus Liberibacter africanus*' *sensu lato* identificadas en Sudáfrica.



■ ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TROPICSAFE

Identificación de plantas huésped alternativas para 'Ca. L. africanus'

Dentro del marco de TROPICSAFE se ha llevado a cabo un estudio y caracterización de los linajes de 'Candidatus Liberibacter', junto con sus potenciales insectos vectores en plantas huésped alternativas a los cítricos. Se han recogido muestras de maleza y plantas autóctonas en diferentes localidades de Cabo Occidental, Sudáfrica, durante varias estaciones en 2017 y 2018, principalmente en zonas próximas a huertos frutales y viñedos. El material foliar recogido ha sido almacenado a -80°C hasta poder realizar extracciones del ADN. Se han efectuado pruebas PCR cuantitativas para la detección de 'Candidatus Liberibacter'. También se han realizado PCR convencionales para las muestras cPCR positivas. Los amplicones obtenidos fueron sometidos a secuenciación. Además, se han aplicado códigos de barras para facilitar la identificación taxonómica de las plantas huésped alternativas.

Las mismas áreas han sido analizadas para determinar la presencia de potenciales insectos vectores (psílidos) antes de crear muestras para la detección de las bacterias. Los insectos han sido recogidos por succión (dispositivo DVAC) y almacenados en etanol absoluto para la posterior identificación y el análisis molecular. La identificación de insectos en bruto ha sido realizada mediante análisis de los caracteres morfológicos y los insectos más relevantes han sido sometidos a la extracción de ADN con el método TNES no destructivo aplicando tampón de extracción, lo que permite dejar los insectos intactos para su posterior identificación y depósito de las muestras en museos.



- Dispositivo de aspiración para retirar insectos de los fynbos en Sudáfrica.



■ DATOS CIENTÍFICOS Y PRIMEROS RESULTADOS

Identificación de plantas huésped alternativas para 'Ca. L. africanus' y sus subespecies

Se han realizado tres estudios de campo en septiembre de 2017, enero y agosto de 2018. Los dos primeros en las áreas Worcester/Robertson/Slanghoek del valle Breederiver (Cabo Occidental), el último en Vredendal/Lutzville, en la costa oeste del Cabo. Se emplearon doce áreas de recolección, de las cuales dos estaban situadas en la cercanía de huertos de cítricos. Se recogieron insectos de 1.001 muestras de plantas usando un dispositivo de aspiración (DVAC). También se recolectó material de las hojas y ramas de las plantas. Se extrajo el ADN de todas las muestras vegetales. Se recogieron entre 5 y 100 especímenes de cada una de las 42 especies vegetales (con un máximo de 20 especímenes de cada una por área). Estas plantas fueron identificadas según sus caracteres morfológicos y el gen *rbcL* de los especímenes representativos fue sometido a secuenciación. Se analizaron todas las muestras para la presencia de 'Candidatus Liberibacter' mediante cPCR. Las muestras con valores Ct por debajo de 30 (143) también fueron analizadas para la presencia de 'Candidatus Liberibacter' mediante PCR por los genes *rplJ* y *omp*. Setenta y ocho de las muestras con valores Ct por debajo de 30 procedían de una de las tres especies de *Atriplex* recogidas, catorce procedían de las especies de *Lycium*, quince de *Rapistrum rugosum*, mientras que el menor número de muestras procedía de otras especies. Ninguna de las muestras presentaba amplicones en PCR. No se observaron psílicos entre el gran número de otros insectos recogidos. Una de las muestras de *Atriplex*, cPCR positiva, fue sometida a secuenciación de próxima generación (NGS) y los resultados están siendo analizados.



- Arboledas de *Atriplex lindleyii*, especie vegetal con un elevado número de especímenes con bajos valores de Ct en 'Candidatus Liberibacter'. Detección por pruebas específicas cPCR.

PALABRAS CLAVE

'Candidatus Liberibacter africanus', "huanglongbing", plantas huésped alternativas, *Trioza erytrae*

MÁS INFORMACIÓN

Roberts R., Steenkamp E.T., Pietersen G. 2015. Three novel lineages of 'Candidatus Liberibacter africanus' associated with native *Rutaceae* hosts of *Trioza erytrae* in South Africa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 723–731.

CRÉDITOS

Gerhard Pietersen Universidad de Pretoria, Pretoria, Sudáfrica gerhard.pietersen@up.ac.za / gpietersen@sun.ac.za

Febrero, 2019



Este proyecto ha recibido financiación del programa de investigación e innovación de la Unión Europea H2020, bajo el acuerdo de concesión N° 727459

www.tropicsafe.eu

Esta ficha de innovación se ha producido como parte del proyecto TROPICSAFE. Aunque el autor ha trabajado con la mejor información disponible, ni el autor ni la UE serán en ningún caso responsables de cualquier pérdida, daño o perjuicio que se produzca directa o indirectamente en relación con el proyecto.