

SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DE MICROBIOMAS DE PLANTAS INFECTADAS POR FITOPLASMA/"HUANGLONGBING"

Microbiomas bacterianos en materiales de plantas e insectos infectados por especies de '*Candidatus Liberibacter*' y '*Ca. Phytoplasma*'

■ PROBLEMA ABORDADO

Verificación de las poblaciones bacterianas

Las plantas están habitadas por una gran diversidad de microorganismos, tanto beneficiosos como perjudiciales, como es el caso de los hongos, bacterias y virus. Estos microorganismos, el microbioma, interactúan estrechamente en redes que pueden ser, por ejemplo, antagónicas o simbióticas. Los '*Candidatus Phytoplasmas*' y las especies de '*Ca. Liberibacter*' forman parte de esta red y compiten con el resto del microbioma por los nutrientes y el espacio interactuando con otros microorganismos asociados a las plantas. Esta interacción podría desempeñar un papel importante en el éxito de las infecciones y en la capacidad de propagación de planta a planta mediante insectos vectores. Además, la variabilidad genética de estas bacterias, que a menudo pasa desapercibida por los métodos actuales, podría ser importante para la supervivencia del patógeno, el desarrollo de los síntomas y la transmisión por insectos vectores. Para la determinación del microbioma se utilizó un gran número de muestras procedentes de diversas ubicaciones geográficas, diversas especies de plantas e insectos e infectadas por las bacterias patógenas confirmadas mediante pruebas de PCR y PCR anidada.

Especies hospedadoras	País de origen	Socio	Número de muestras
Cítricos	Guadalupe	ASSO	15
Cítricos	Jamaica	CIB	5
Cítricos	México	COLPO	9
Cítricos	Cuba	IIFT	24
Cítricos	Sudáfrica	PTHSL	8
Insectos	México	COLPO	46
Insectos	Cuba	IIFT	30
Cocotero	Jamaica	CIB	19
Cocotero	México	CICY	14
Cocotero	México	COLPO	12
Cocotero	Ghana	CSIR	49
Cocotero	Cuba	IIFT	6
Vid	Chile	UCHIL	14
Vid	Italia	UNIBO	84

- Tabla. Lista de las muestras utilizadas en el estudio del microbioma proporcionadas por Youri Uneau (ASSO, Guadalupe), Wayne Myrie (CIB, Jamaica), Carlos Fredy Ortiz (COLPO, México), Ndede Yankey (CSIR, Ghana), Carlos Oropeza (CICY, México), Maritza Luis-Pantoja y Camilo Paredes-Tomás (IIFT, Cuba), Gert Pietersen (PTHSL, Sudáfrica), Gerhard Pietersen (SU, Sudáfrica), Nicola Fiore (UCHIL, Chile).

■ PRÁCTICA/INNOVACIÓN PROPUESTA POR TROPICSAFE

Establecimiento de métodos para la caracterización del microbioma

Para la caracterización de 'Ca. Phytoplasma' y 'Ca. Liberibacter', la elaboración de perfiles por secuenciación de ADN podría ser un enfoque eficaz. El desarrollo y la aplicación de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han revolucionado los métodos de la ecología microbiana al permitir la elaboración de perfiles comunitarios de alta resolución. Ya existen métodos y cebadores para el análisis de las bacterias y se han utilizado profusamente. Cuando es posible, se prefiere el uso de cebadores específicos, que amplifican las secuencias bacterianas de ADN 16Sr evitando la amplificación de las secuencias de ADN de los orgánulos vegetales. Por estas razones, se probó inicialmente un conjunto de cebadores (799F y 1193R) diseñados para el análisis de las comunidades bacterianas asociadas a las plantas (Hu *et al.*, 2018). Sin embargo, el ADN de fitoplasma no coincide completamente con este par de cebadores y, por lo tanto, se optimizaron las secuencias de los cebadores.

■ ¿CÓMO SE ESTÁ IMPLEMENTANDO?

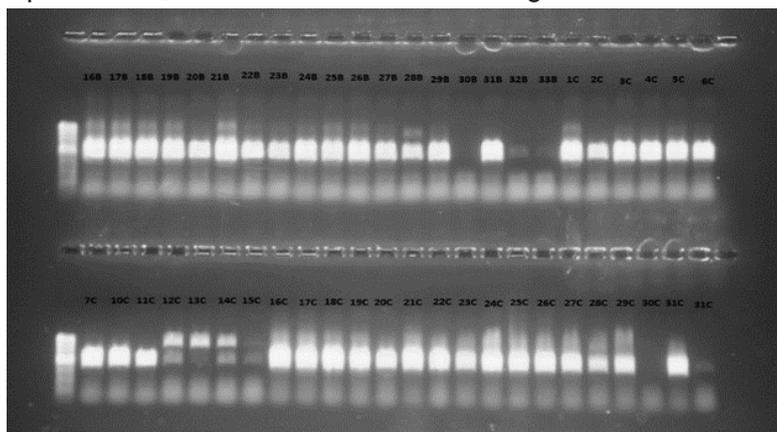
Procedimientos de amplificación y secuenciación

Las variantes de los cebadores 799F y 1193R se optimizaron basándose en las alineaciones de nucleótidos de 'Ca. Phytoplasma' y 'Ca. Liberibacter'. Estos cebadores optimizados contienen nucleótidos degenerados para acomodar su variación de secuencia en comparación con otras bacterias. Los nucleótidos que se muestran en rojo son específicos para la muestra, mientras que los nucleótidos en negro son específicos para el procedimiento de secuenciación. Los nucleótidos degenerados están subrayados.

BacF1-799/1193 TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG AACMGGATTAGATACCCKG

BacR1-799/1193 GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG ACGTNRTCCYCACCTTCC

Estos cebadores se probaron utilizando el ADN de una serie de 'Ca. Phytoplasma' y 'Ca. Liberibacter' infectadas utilizando un protocolo de amplificación de PCR optimizado (94°C durante 5 minutos, seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, y un paso final de elongación a 72°C durante 10 minutos). Esto dio lugar a bandas de ADN claras y del tamaño esperado. Tras la optimización, las muestras procedentes principalmente de Italia, Ghana, Cuba y Sudáfrica, pero también de otros países que habían sido recogidas por los socios del proyecto, se caracterizaron mediante secuenciación Illumina y las lecturas de secuenciación se analizaron computacional y estadísticamente. En total, se analizaron aproximadamente 400 muestras procedentes de la vid, la palma y los cítricos, junto con muestras de plantas hospedadoras alternativas y de insectos vectores.



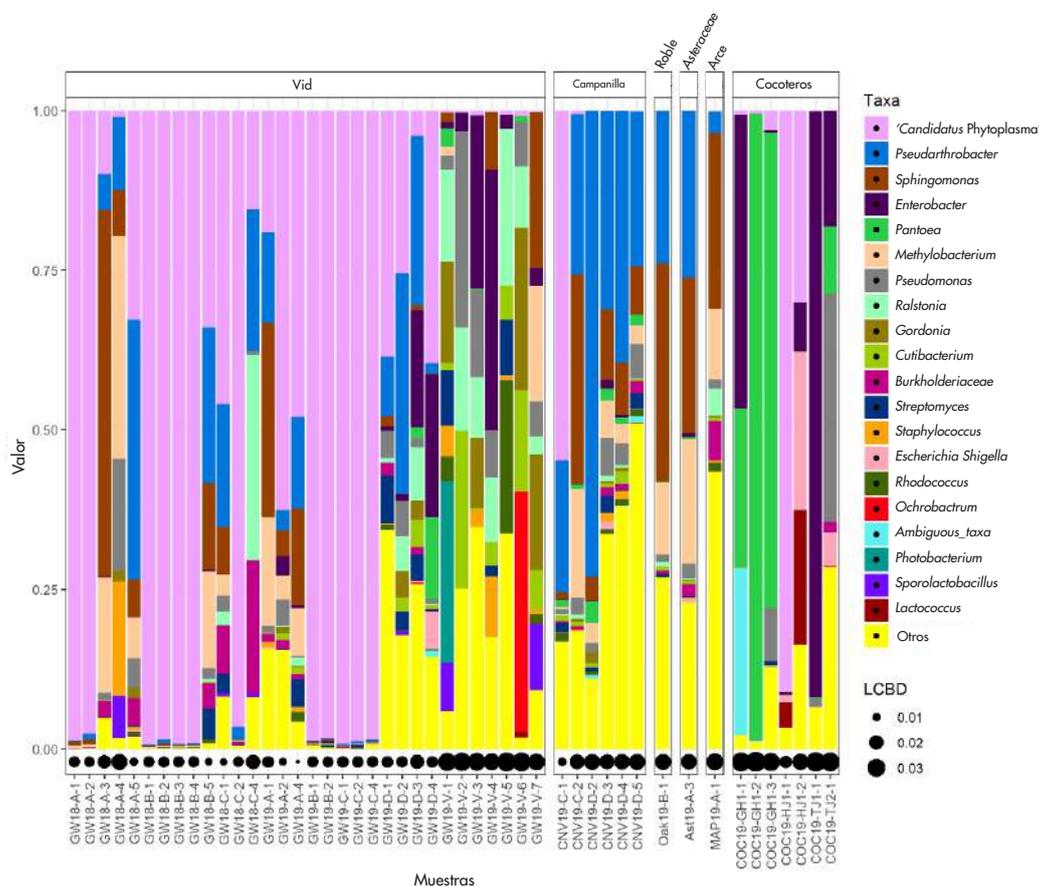
• Ejemplo de amplificación utilizando los cebadores degenerados optimizados 799/1193 en un conjunto de muestras de ADN de diferentes plantas huésped (vid y palma). La banda de interés es la banda fuerte de aproximadamente 500 nt. A la izquierda de cada panel se muestra un marcador molecular.

■ ¿CÓMO ESTÁ FUNCIONANDO?

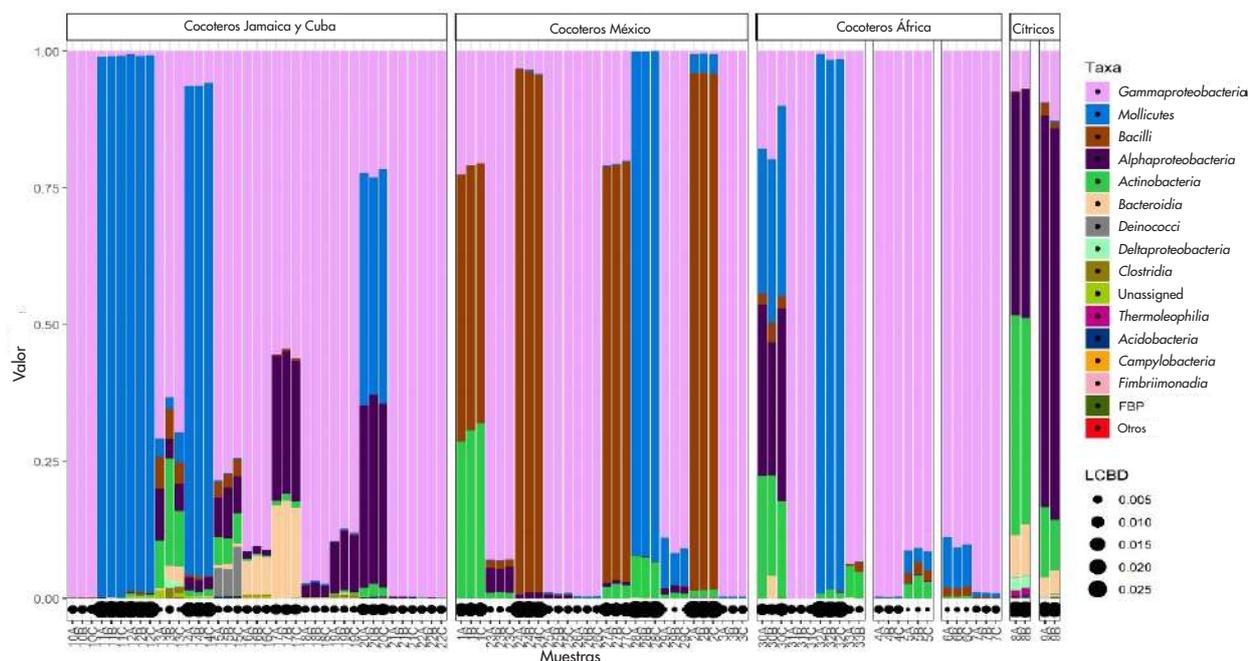
Resultados de la diferenciación bacteriana

El método optimizado para la caracterización de las poblaciones procariotas microbianas en plantas infectadas con 'Ca. Phytoplasma' y 'Ca. Liberibacter' amplificó con éxito el ADN procariota objetivo, sin que se observase una amplificación notable del ADN de los orgánulos de la planta tras la asignación taxonómica de las lecturas de la secuencia. Esto muestra, como se muestra en la siguiente imagen, que la proporción de lecturas de 'Ca. Phytoplasma' (barras rosas) del microbioma total en las muestras individuales es muy variable. Las barras verticales apiladas muestran la distribución de los taxones microbianos dentro de cada muestra en un ejemplo de comparación entre muestras de palmeras, vides y una serie de huéspedes alternativos.

En general, las muestras de vid tenían una proporción mucho mayor de lecturas de 'Ca. Phytoplasma' en comparación con otros procariotas, y en varios casos, el fitoplasma ocupaba casi el 100% de las lecturas de la secuencia. Dentro de las lecturas de fitoplasma, también se observó una variación de la secuencia. En las muestras de palma, se identificaron 71 variantes de secuencia diferentes, y de éstas, 5 variantes de secuencia en varias muestras. En las muestras de vid, se detectaron 82 variantes de secuencia diferentes, y 5 de ellas se identificaron en varias muestras y con números de lectura notables en al menos más de una muestra. Por lo tanto, estas variantes de secuencia se consideran válidas.



- Barras verticales apiladas que muestran la abundancia relativa de los taxones, presentes en cada muestra, a nivel de filo de la vid, campanilla, roble, Asteraceae, arce y cocotero. Las lecturas de 'Ca. Phytoplasma' se muestran en rosa. La contribución local a la diversidad beta (LCBD) es un índice comparativo de singularidad con valores grandes que indican las muestras que tienen composiciones de especies muy diferentes en comparación con las demás. Los valores de LCBD se representan como burbujas bajo los gráficos de barras apiladas para indicar las muestras que difieren notablemente en su composición.



- Barras verticales apiladas que muestran la abundancia relativa de los taxones más abundantes, presentes en cada muestra. En las muestras de cítricos (últimas cuatro columnas), el HLB está dentro de las *Alphaproteobacteria*, mientras que los fitoplasmas están en los *Mollicutes*. La contribución local a la diversidad beta (LCBD) es un índice comparativo de singularidad con valores grandes que indican las muestras que tienen composiciones de especies fuertemente diferentes en comparación con las otras. Los valores de LCBD se representan como burbujas bajo los gráficos de barras apiladas para indicar las muestras que difieren notablemente en su composición.

PALABRAS CLAVE

Microbioma, amplificación, bacterias, endófitos

MÁS INFORMACIÓN

Bodenhansen N., Horton M.W., Bergelson J. 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8(2), e56329.

Hartmann M., Frey B., Mayer J., Mader P., Widmer F. 2015. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *The ISME Journal* 9(5), 1177-1194.

Hu L., Robert C.A.M., Cadot S., Zhang X., Ye M., Li B., Manzo D., Chervet N., Steinger T., van der Heijden M.G.A., Schlaeppi K., Erb M. 2018. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. *Nature Communications* 9, 2738.

Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41(1), e1.

CRÉDITOS

Mogens Nicolaisen Instituto de Agroecología, Entomología y Patología Vegetal, Universidad de Aarhus, Dinamarca mn@agro.au.dk
Nicoletta Contaldo Alma Mater Studiorum – Universidad de Bolonia, Departamento de Ciencias Agrícolas y Alimentarias, Bolonia, Italia nicoletta.contaldo2@unibo.it
Francesco Pacini Alma Mater Studiorum – Universidad de Bolonia, Departamento de Ciencias Agrícolas y Alimentarias, Bolonia, Italia francesco.pacini2@unibo.it
Giulia Feduzi Alma Mater Studiorum – Universidad de Bolonia, Departamento de Ciencias Agrícolas y Alimentarias, Bolonia, Italia giulia.feduzi2@unibo.it
Assunta Bertaccini Alma Mater Studiorum – Universidad de Bolonia, Departamento de Ciencias Agrícolas y Alimentarias, Bolonia, Italia assunta.bertaccini@unibo.it

Diciembre, 2021



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.