

LUCHA BIOLÓGICA ENTRE *Penicillium digitatum* Y *Candidatus liberibacter*, PARA ERRADICAR LA FITOPATOLOGÍA HBL EN CÍTRICOS, TRANSMITIDA POR EL VECTOR *Trioza erytrae*

La enfermedad bacteriana conocida como Huanglongbing (HBL) es considerada la enfermedad más relevante y peligrosa de los cítricos en el mundo. Siendo muy destructiva con los cítricos y provocando graves pérdidas en el cultivo de estos. Esta patología es transmitida por la bacteria; *Candidatus liberibacter* que causa el bloqueo en la circulación de los nutrientes por el sistema vascular de la planta, y provoca cambios anatómicos como el moteado y amarillamiento en la coloración de las hojas y la aparición de agallas en algunos casos. Actualmente es habitual encontrar casi todos los cítricos con estos síntomas. El vector de estas bacterias es el insecto *Trioza erytrae*, también conocido como *Psila*, que se alimenta de la savia de los cítricos transmitiendo la enfermedad. En este estudio se presenta una lucha biológica entre el hongo *Penicillium digitatum*, el cual es típico de los cítricos, aunque ataca solo al fruto a diferencia de la HBL que ataca en las hojas y la bacteria *Candidatus liberibacter*.

El objetivo de este estudio consiste en encontrar algún tratamiento para una fitopatología muy común, la cual afecta a los *Citrus x limon* en Galicia y norte de España, provocándoles inicialmente, una especie de agallas y coloración amarillenta en el envés y en la lámina de las hojas, provocándoles la muerte en algunos de los árboles afectados. A través de la indagación realizada inicialmente se comprendieron las relaciones existentes entre los organismos estudiados en el proyecto y la aplicación práctica que tendría lugar *in situ* en árboles como el *Citrus x limon* afectados, ya que es bastante habitual encontrar individuos afectados por la fitología HBL. Sin embargo, se decidió realizar el estudio *ex situ* para poder tener controladas las condiciones de experimentación y poder analizar si hay una correlación positiva entre las variables analizadas.

Variables

Dependiente: crecimiento de la bacteria *Candidatus liberibacter* medido en Unidades Formadoras de Colonias (UFCs).

Independiente: Crecimiento de *Penicillium digitatum* desde su siembra en esporas hasta después de tres días, en el que se aplica la bacteria para empezar la lucha. Se considera el crecimiento de la bacteria como dependiente del hongo debido a la capacidad antibiótica que reside en el hongo.

Control: el horario para llevar a cabo el conteo, así como la temperatura de crecimiento de los cultivos en estufa.

Hipótesis

La presencia del hongo provocará un decrecimiento en las UFCs de *Candidatus liberibacter* cultivadas en placas de Petri con medios de cultivo controlados. Esta reacción se debe a la lucha biológica existente entre el hongo y la bacteria, causando que las colonias de la bacteria disminuyan provocado por las propiedades antibióticas de *Penicillium digitatum*.

Materiales y métodos

Para empezar, se cogen 12 hojas de árboles que presenten la enfermedad con *Citrus x limon* (vivienda propia y Colegio SEK-Atlántico). A continuación, enumeramos 12 placas Petri y colocamos sobre ellas las 12 muestras recolectadas. Seguidamente, raspamos las hojas encima de 3 portaobjetos con la ayuda de una espátula metálica y los tapamos con los cubreobjetos. Para el estudio es importante hacer una revisión de las hojas con la ayuda de un microscopio óptico para visualizar y detectar la presencia de organismos en las mismas. Más tarde, cultivamos el hongo, a base de unos *Citrus x limon* cortados por la mitad y dejándolos al aire 4 días en condiciones de humedad. Una vez crecido el hongo, esterilizamos la mesa en la que trabajaremos con el hongo y preparamos el medio de cultivo, para ello disolvemos 250ml de agua destilada con 20 g de Agar Sabouraud con la ayuda de un vidrio de reloj y una balanza de precisión. Posteriormente, la disolución se vierte en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se deposita sobre un agitador magnético caliente para que se mezcle y llegue a ebullición. Para finalizar la preparación, taponamos la entrada con un papel de filtro para que la mezcla no se contamine. Cuando veamos que empiezan a salir burbujas en la base del matraz apagamos el agitador y metemos la mezcla en la nevera. Enfriada la mezcla, y con ayuda de un termómetro, fijarse que la temperatura de la mezcla sea de 50°C, momento en el que se debe sacar de la nevera. Con el medio de cultivo elaborado, se procede al llenado de las placas y se espera hasta el día siguiente para que el medio de cultivo solidifique. Se agrupan las 20 placas Petri enumeradas, y se procede a la siembra de la siguiente forma: siembra de las 13 primeras placas con el hongo. Siembra de la placa 14 con el hongo y depositar una hoja con la enfermedad dentro de la placa. Por último, sembrar de la 15 hasta la 20 sembrar el hongo y rascar con una espátula desinfectada la superficie de una hoja con el fin de que caiga en el medio de cultivo los organismos y darle la oportunidad de que entren en contacto con el hongo.

Agrupar las placas de tres en tres con la ayuda de una goma elástica y meterlas en la estufa a 20°C y con las tapas hacia abajo para evitar la condensación de agua. No se pudo asegurar la existencia de solo los dos microorganismos en

cada placa, sin embargo, sí que se pudo identificar la bacteria y el hongo en todas las placas mediante su visualización en el microscopio y siguiendo indicaciones de claves dicotómicas, encontrando así las esporas del hongo y la bacteria con forma de bacilo en cada una de las placas. Mientras esperamos a que las muestras crezcan cogemos 9 portaobjetos y cubreobjetos, en los 3 primeras echamos el hongo, en los 3 siguientes raspamos las hojas y dejamos los múltiples organismos en ellas, y en los 3 últimos juntamos los dos. Con estas muestras podemos ver a través del microscopio óptico cómo es el hongo, y todos los organismos por separado. En las 3 últimas placas comprobamos que el hongo ataca a los organismos, lo cual nos indica que el hongo tiene un efecto sobre ellos. Además, en las tres últimas, decidimos buscar la bacteria (*Candidatus liberibacter*), al cabo de un rato, y con ayuda del aceite de inmersión y el microscopio óptico pudimos localizarlas junto con las esporas, por lo tanto, decidimos realizar un conteo con el método Neubauer, para así hacer un seguimiento de la evolución del crecimiento de ambos organismos y comprobar si en verdad el hongo disminuía la cantidad de bacterias.

Método de Neubauer

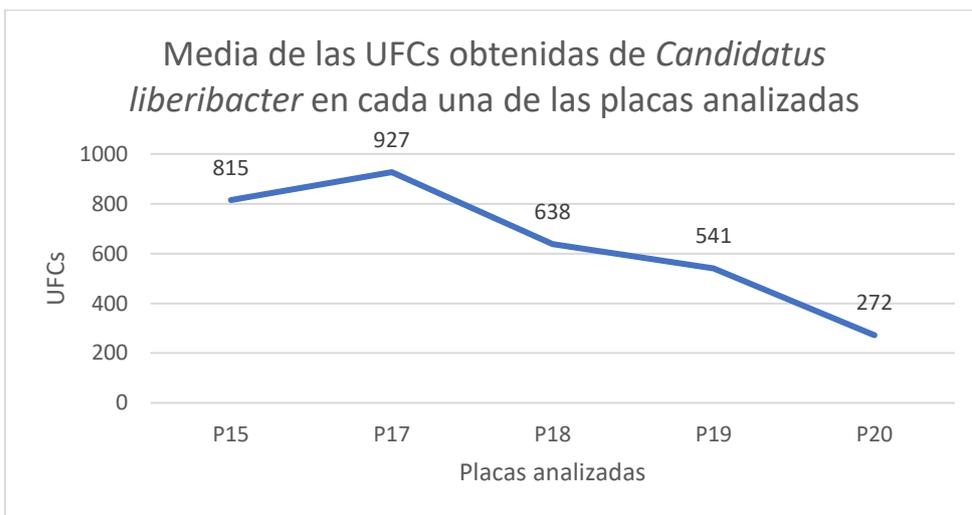
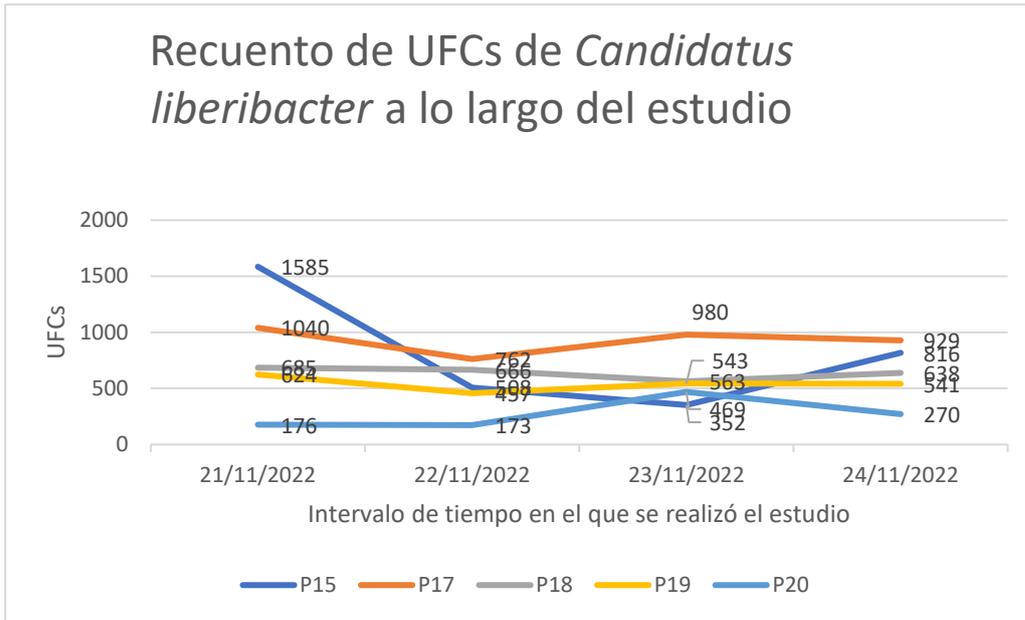
Se toma la placa 15, se pasa el asa de siembra por las zonas con hongo y bacteria y con un cuentagotas se llena hasta 0,5 ml con agua destilada en un tubo de Eppendorf. Se mete el asa de siembra dentro y se remueve, a continuación, se quita el asa de siembra y con otro cuentagotas se coge la muestra de la mezcla y se echa en la cámara de Neubauer y se tapa con un cubreobjetos. En este caso se contaron los 16 cuadrados de la esquina derecha de abajo, con el fin de lograr una mayor precisión de los datos. Por eso no se contaron las bacterias de los bordes, con ayuda del microscopio óptico y el contador manual, se contaron las cantidades de bacterias 3 veces en cada placa, cada día, y se realizó la media. Este mismo proceso se repitió con las placas 17, 18, 19, 20. El conteo se realizó durante cinco días consecutivos ya que este intervalo de tiempo era el ideal para ambas especies, acostumbradas al medio exterior y las condiciones ambientales propias del clima oceánico, llevando a cabo el recuento tres veces con el fin de tener repeticiones y obtener valores más representativos. La fórmula de Neubauer para el conteo consiste en dividir las bacterias contadas entre la superficie contada (cuadrados) en este caso 16 cuadrados, por la profundidad de la cámara, en este caso 0,1 mm, y por la dilución (1/20) (Gallego y Pérez 2020). Con la ayuda del programa informático Microsoft Excel, se llevó a cabo el estudio estadístico de los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento de Unidades Formadoras de Colonias contadas desde el 21 de noviembre hasta el 24 de noviembre de 2022, ambos días inclusive.

Resultados

En la visualización a través del microscopio óptico, se encontró una gran cantidad de organismos que estaban cohabitando en las hojas como pulgones. Los datos obtenidos del recuento de las UFCs de *Candidatus liberibacter* pueden observarse en la primera gráfica, así como la evolución de estas. Así mismo, para llegar a las conclusiones, que se exponen a continuación, también se ha tenido presente las medias de las UFCs de *Candidatus liberibacter* obtenidas. Como se puede observar en la segunda gráfica, en una línea decreciente, las colonias a pesar de aumentar el primer día (debido posiblemente a la cantidad de glucosa que contiene el Agar Sabouraud y que la bacteria está acostumbrada a crecer en el medio exterior y se le proporcionaron condiciones de temperatura, humedad y luz adecuadas para la misma), la cantidad de estas va disminuyendo con el paso de los días y en muy poco tiempo. La tasa de crecimiento de ambos organismos es relativamente rápida. Se podría deducir que la bajada en el número de UFCs se debe al establecimiento de una interacción de lucha biológica entre ambas especies, siendo el hongo un organismo patógeno para la bacteria mediante la segregación de sustancias antibióticas.

Conclusiones

En principio, a la vista de los resultados, se puede aceptar la hipótesis, ya que, ambas poblaciones de los organismos crecieron en un principio, pero en las zonas donde el *Penicillium digitatum* invadía, el *Candidatus liberibacter* no lo hacía, y a lo largo de los días se comprobó que el crecimiento de los organismos es inversamente proporcional, es decir, a mayor crecimiento del hongo menor crecimiento de la bacteria. Cuanto mayor es el espacio que ocupa el hongo en el medio de cultivo en las placas, menos cantidad de *Candidatus liberibacter* hay. Hubiera sido adecuado disponer de más tiempo para contrastar la investigación realizada con la bacteria por separado, ya que, a pesar de haberla comprado, no ha llegado a tiempo para poder realizar el experimento. También sería interesante realizar el mismo experimento, pero, en el medio natural, con el fin de comprobar si el efecto obtenido en condiciones de laboratorio es el mismo en el medio natural y ver la reacción de la enfermedad de los cítricos y el hongo. Por último, se ampliará el estudio con fuentes secundarias para ver las líneas de investigación que hay actualmente en relación con la erradicación de la enfermedad a nivel mundial y ver si estas investigaciones pudiesen ayudar a reducir la misma.



Referencias

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory mycology (Ed. 4). John Wiley and Sons. University of Georgia, Athens, GA, USA.
- Estévez A, Ferry M, Gómez S. 2011. Endoterapia en palmeras: estudio de la eficacia y persistencia de tiametoxam en tratamientos preventivos contra el picudo rojo. *Phytoma España* 226: 42-49.
- Garrigues Cubells SM & Director Jose F. Marcos López 2014. Caracterización funcional de genes del tipo APF en el hongo fitopatógeno de frutos cítricos *Penicillium digitatum*. Departamento de Ciencia de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda. Agustín Escardino-7, Paterna, 46980 Valencia.
- Hernández-Lauzardo AN, Bautista-Baños S, Velázquez-del Vall MG, Hernández-Rodríguez A. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 66-74.
- Macarasin D, Cohen L, Eick A, Rafael G, Belausov E, Wisniewski M, Drobny S. 2007. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. *Phytopathology* 97 (11): 1491-1500.
- Slisz AM, Breksa III AP, Mishchuk DO, McCollum G, Slupsky CM. 2012. Metabolomic analysis of citrus infection by 'Candidatus Liberibacter' reveals insight into pathogenicity. *Journal of Proteome Research*, 11(8): 4223-4230.
- Zeng, H., Bai, Y., Wei, Y., Reiter, R. J., & Shi, H. (2022). Phyto-melatonin as a central molecule in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany*, 73(17), 5874-5885.