

Identificación de proteínas en *Candidatus Liberibacter asiaticus* para desarrollar un método de detección inmunoenzimático

Cynthia Guadalupe Rodríguez-Quibrera¹

Isidro Humberto Almeyda-León^{2§}

Felipe Roberto Flores de la Rosa¹

José Luis Hernández-Mendoza³

María Antonia Cruz-Hernández³

Alberto Mendoza-Herrera^{3†}

¹Campo Experimental Ixtacuaco-INIFAP. Carretera Martínez de la Torre-Tlapacoyan km 4.5, col. Rojo Gómez, Tlapacoyan, Veracruz. CP. 93600. Tel. 800 0882222, ext. 87601. (flores.felipe@inifap.gob.mx; rodriguez.cynthia@inifap.gob.mx). ²Campo Experimental General Terán-NIFAP. Carretera Montemorelos-China km 31, col. Ex Hacienda Las Anacuas, General Terán, Nuevo León, México. CP. 67400. Tel. 55 38718700, ext. 83615. ³Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional. Boulevard del Maestro s/n, esq. Elías Piña, col. Narciso Mendoza, Ciudad Reynosa, Tamaulipas, México. CP. 88710. Tel. 55 57296300, ext. 87714. (jhernandezm@ipn.mx; macruz@ipn.mx).

§Autor para correspondencia: almeyda.isidro@inifap.gob.mx.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue identificar en el genoma de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs), proteínas de membrana externa con potencial para el desarrollo y optimización de un método de detección inmunoenzimático. El estudio se realizó durante 2019 y se utilizó el servidor web Predict Protein, así como las bases de datos HhPred/HhSearch y Pfam. Se detectaron 52 proteínas de membrana externa en el genoma completo de CLAs, de las cuales, 11 no habían sido caracterizadas previamente. Los análisis predictivos realizados en la proteína B8Y674 generaron ocho posibles epítomos y cuatro de ellos evaluados experimentalmente en células B, mostraron porcentajes de identidad entre 80 a 90%. Se detectó a CLAs mediante PCR-punto final a partir del ADN extraído de limón mexicano con síntomas de Huanglongbing utilizando iniciadores diseñados sobre la secuencia del gen *Omp* que codifica para la proteína B8Y674 y se registró 95% de identidad entre las secuencias generadas y secuencias de CLAs previamente reportadas. Los resultados obtenidos nos permiten inferir que la proteína B8Y674 es un candidato potencial para ser utilizada en la detección inmunoenzimática de CLAs.

Palabras clave: diagnóstico, huanglongbing, serología.

Recibido: julio de 2022

Aceptado: noviembre de 2022

El Huanglongbing (HLB), o Dragón Amarillo de los Cítricos, es considerada la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial (Ding *et al.*, 2015). El agente etiológico es una α -proteobacteria gram negativa y actualmente se conocen tres especies que infectan cítricos: *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Candidatus Liberibacter africanus* (CLaf) y *Candidatus Liberibacter americanus* (CLam) (Achor *et al.*, 2020; Andrade *et al.*, 2020). En México, los daños más severos de esta enfermedad se presentan en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y limón persa (*Citrus latifolia*), mientras que en otras regiones de Asia y África y en países como Brasil, EE. UU y Cuba los daños se reportan principalmente en naranja dulce (*Citrus sinensis*) (McCollum *et al.*, 2016).

La confirmación oficial de la bacteria en las plantas se realiza por PCR-tiempo real, ya que es un método muy sensible y se le considera la herramienta más confiable para su detección. Sin embargo, este método resulta costoso; por lo tanto, se requiere una prueba rápida y confiable para corroborar su presencia en campo. Los métodos inmunoenzimáticos o inmunoensayos como la técnica de enzyme-linked-immuno sorbent assays (Elisa), están basados en la reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), son económicos, rápidos y específicos para detectar bajas concentraciones de Ag o Ac y pueden ser empleados por su sensibilidad para detectar fitopatógenos (Fundora *et al.*, 2013). Los resultados de su aplicación han permitido la elaboración de estrategias de manejo integrado de enfermedades, mejorando la calidad y sanidad de los cultivos, así como su competitividad y rentabilidad (Zherdev *et al.*, 2018).

Se tienen reportes de la presencia de proteínas que pueden ser inmunogénicas y se encuentran localizadas en la membrana externa de los patógenos (Bastianel *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2013). También son identificadas como antigénicos determinantes o sitios discretos que son reconocidos por los linfocitos B o T a través de sus propios receptores específicos (Carrizo *et al.*, 2009). Estas proteínas pueden usarse para la generación de anticuerpos en animales de sangre caliente, por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue identificar proteínas localizadas en la membrana externa de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, con capacidad antigénica que sirvan de base para el desarrollo de un método inmunoenzimático eficiente y de bajo costo para la detección de esta bacteria en cítricos.

Para el análisis bioinformático de proteínas de membrana externa se utilizó el genoma completo de CLas cepa GX-1 (Acceso Genbank PRJNA158395), reportada por Lin *et al.* (2013), en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) posteriormente fue analizada en las base de datos del UniprotKB (<http://www.uniprot.org>) y se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las proteínas de membrana externa codificadas en el genoma de CLas.

La predicción de la función de las proteínas de membrana externa se realizó utilizando el servidor web Predict Protein (www.predictprotein.org/) y el programa Blast2go (Run Blast, Mapping, Annotation, Inter ProScan) (Conesa *et al.*, 2005). Se realizó un alineamiento Muscle de las proteínas seleccionadas basado en codones y se generó un dendograma para determinar su similitud mediante Neighbor Joining, utilizando el software MEGA X. Para la predicción de epítomos se seleccionó a la proteína B8Y674 en virtud de que es repetitiva en el genoma de CLas y se utilizó la base de datos immune epitope and analysis resource (Iedb) (<http://tools.immuneepitope.org/tols/bcell/iedb-input>), mediante el método Escala de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar (Eakt).

Se realizó la detección de CLas mediante PCR-punto final a partir del ADN genómico extraído de hojas de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) con síntomas de HLB. La extracción del ADN se realizó por el método del CTAB optimizado por Rodríguez *et al.* (2010) y en las reacciones de PCR se utilizaron los iniciadores diseñados sobre la secuencia del gen *Omp* que codifica para la proteína B8Y674 (Rodríguez *et al.*, 2018). Los fragmentos amplificados (dos por cada par de primer utilizado), fueron purificados, clonados y secuenciados para su análisis en línea mediante la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en el apartado de Blast.

Se identificaron 53 proteínas de membrana externa (datos no mostrados) y con base en su homología, motivos y dominios, se seleccionaron 12 de estas proteínas (Cuadro 1), de las cuales solamente la C6XHX5 había sido caracterizada previamente como proteína de tolerancia a disolvente orgánico. Con el HhPred/HhSearch (Söding *et al.*, 2005), se obtuvieron predicciones funcionales con probabilidades que oscilaban entre los rangos de 62.5 a 99.2% y con E-valores aceptables ($3.3E^{-05}$, $1.4E^{-06}$, $2.5E^{-13}$, $2.8E^{-13}$, $3.5E^{-15}$), obteniéndose alineamientos con resultados significativos para 10 proteínas. En las proteínas C6XGP8 y C6XGU8, se registraron probabilidades de 93.8 y 62.5% así como E-valor de 0.0027 y 1.1 respectivamente por lo que se consideraron resultados no significativos o pocos confiables en sus predicciones (Cuadro 1).

Cuadro 1. Predicción de dominios funcionales en 12 proteínas de membrana externa de CLas mediante HhPred/HhSearch.

Núm.	Núm. de acceso al UniprotKB	Probabilidad (%)	E- valor	ID* Pfam
1	B8Y674	98.9	$2.5E^{-13}$	PF01103
2	B8Y671	98.9	$2.5E^{-13}$	PF01103
3	B2KNJ1	98.9	$2.8E^{-13}$	PF01103
4	J7H0I4	99.2	$3.5E^{-15}$	PF01103
5	B8Y672	98.9	$2.5E^{-13}$	PF01103
6	B8Y673	98.9	$2.5E^{-13}$	PF01103
7	B8Y675	98.9	$2.5E^{-13}$	PF01103
8	C6XGP8	93.8	0.0027	PF01389
9	C6XHX5	99.9	$4.1E^{-27}$	PF04453
10	C6XF21	97	$1.4E^{-06}$	PF04355
11	C6XGU8	62.5	1.1	PF01389
12	C6XFB8	96.2	$3.3E^{-05}$	PF01389

*= número de identificación o acceso de entrada a la base de datos Pfam.

Las anotaciones de los dominios funcionales indicaron predicciones de antígeno de superficie para las proteínas B8Y674, B8Y671, B2KNJ1, J7H0I4, B8Y672, B8Y673, B8Y675, C6XGP8, C6XGU8 y C6XFB8, sugiriendo que presentan capacidad antigénica, C6XHX5, tuvo predicción de tolerancia a disolventes orgánicos y C6XF21 mantenimiento de la integridad de la envoltura celular. El alineamiento múltiple de las proteínas codificadas por el gen *Omp* (B8Y671, B8Y672, B8Y673, B8Y674 y B8Y675) demostró una identidad entre ellas de 97% (Figura 1).

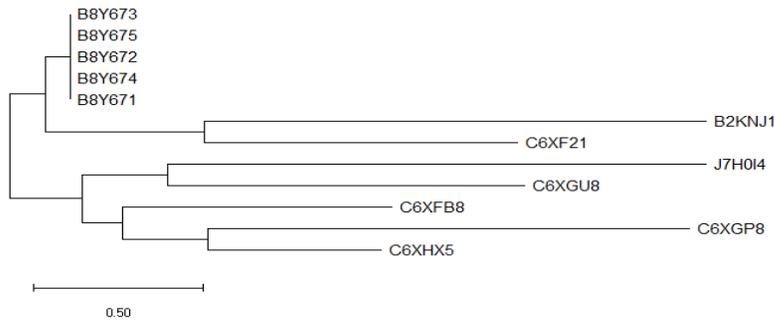


Figura 1. Dendrograma generado mediante el alineamiento de secuencias de proteínas de membrana externa de CLas.

La predicción de los epítomos para la proteína B8Y674 permitió obtener ocho epítomos B o T, con una especificidad de 91% (Cuadro 2). La base de datos IEDB determinó que los epítomos FSEVNISQLPANDVSDYVILRVSVKQLSAGSVGIA, RHAVQNYTLVSDPYFLGSPISAGFD, IPSIYTTLIEHG, y FSSHISISQSIINY, han sido evaluados experimentalmente con identidades de 90%, 80%, 80%, y 80% respectivamente (<http://www.iedb.org/>). Además, reveló que el tipo de célula implicada en la mayoría de los casos fue la célula B. Algunas de las funciones de gran importancia de las células B, es la fabricación de anticuerpos contra antígenos y eventualmente transformarse en células de memoria B después de ser activadas por la interacción con un antígeno (Mauri y Bosma, 2012).

Cuadro 2. Predicción de epítomos en la proteína B8Y674 mediante el método escala de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar.

Núm.	Posición	Epítomo	Longitud
1	11	DSVIRRE	7
2	44	FSEVNISQLPANDVSDYVILRVSVKQLSAGSVGIA	35
3	104	RARLAAG	7
4	113	RHAVQNYTLVSDPYFLGSPISAGFD	26
5	155	SAAVRMIVPITE	12
6	173	KYDLRFLQYGAI	12
7	190	IPSIYTTLIEHG	12
8	203	FSSHISISQSIINY	14

Se amplificaron fragmentos de 1 121 pb y 904 pb respectivamente del gen *Omp* de CLas que codifica para la proteína B8Y674 a partir del ADN extraído de hojas de limón mexicano con síntomas de HLB utilizando los iniciadores reportados por Rodríguez *et al.* (2018). Las cuatro secuencias obtenidas a partir de los fragmentos amplificados presentaron 98% de identidad con secuencias de CLas previamente reportadas en el GenBank (CP019958.1, CP004005.1, KC473159.1, KC473156.1, JQ928886.1, JQ928883.1, JQ928882.1, JN049494.1).

Es importante señalar que las secuencias utilizadas hasta la fecha para la detección mediante ELISA han sido aisladas de cítricos dulces (Lu *et al.*, 2013) o de psíidos portadores de la bacteria (Yuan *et al.*, 2016), a diferencia de las secuencias de nuestro estudio que fueron aisladas de limón

mexicano, encontrando cinco variaciones de nucleótidos, corroborando lo mencionado por Tomimura *et al.* (2009), quienes reportaron que el gen que codifica para la proteína de membrana externa posee variaciones de nucleótidos que permite diferenciarlas entre ellas. Chen *et al.* (2010) señalaron que en el locus OMP la variación se limita a unos pocos SNPs validando los resultados de esta investigación.

Estos datos resaltan el potencial de los hallazgos obtenidos en este estudio con la identificación de antígenos de superficie, a partir de los cuales se puedan obtener anticuerpos específicos que eviten reacciones cruzadas con bacterias diferentes a CLas, en un método inmunoenzimático para la detección temprana del agente causal de la enfermedad HLB de los cítricos.

Conclusiones

Con base en la predicción de los dominios funcionales se identificaron a las proteínas B8Y674, B8Y671, B2KNJ1, J7H0I4, B8Y672, B8Y673, B8Y675, y C6XFB8 como proteínas con capacidad antigénica. La identificación de cuatro epítomos, así como la detección de CLas mediante PCR-punto final utilizando los iniciadores diseñados sobre la secuencia del gen *Omp* que codifica para la proteína B8Y674, permite inferir que esta es un candidato potencial para la producción de anticuerpos e implementación de un método inmunoenzimático para la detección de CLas.

Literatura citada

- Achor, D. S.; Welker, S.; Ben-Mahmoud, S.; Wang, C.; Folimonova, S. Y.; Dutt, M.; Gowda, S. and Levy, A. 2020. Dynamics of *Candidatus Liberibacter asiaticus* movement and sieve pore plugging in citrus sink cells. *Plant Physiol.* 182(2):882-891. Doi: 10.1104/pp.19.01391.
- Andrade, M. O.; Pang, Z.; Achor, D. S.; Wang, H.; Yao, T.; Singer, B. H. and Wang, N. 2020. The flagella of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” and its movement in planta. *Molecular plant pathology.* 21(1):109-123. Doi: 10.1111/mpp.12884.
- Bastianel, C.; Garnier-Semancik, M.; Renaudin, J.; Bové, J. M. and Eveillard, S. 2005. Diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*,” based on the *omp* gene sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(11):6473-6478. Doi: 10.1128/AEM.71.11.6473-6478.2005.
- Carrizo, A.; Brihuega, B.; Etchechoury, I.; Arese, A.; Romero, S.; Gioffré, A., Romano, M. F. and Caimi, K. 2009. Identification of immunoreactive antigens of *Leptospira interrogans*. *Rev. Argentina de Microbiol.* 41(3):129-133.
- Chen, J.; Deng, X.; Sun, X.; Jones, D.; Irey, M. and Civerolo, E. 2010. Guangdong and Florida populations of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ distinguished by a genomic locus with short tandem repeats. *Phytopathology.* 100(6):567-572. Doi: 10.1094/PHYTO-100-6-0567.
- Conesa, A.; Gotz, S.; García-Gómez, J. M.; Terol, J.; Talón, M. and Robles, M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics.* 21(18):3674-3676.
- Ding, F.; Duan, Y.; Paul, C.; Brlansky, R. H. and Hartung, J. S. 2015. Localization and Distribution of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in citrus and periwinkle by direct tissue blot immuno assay with an anti ompa polyclonal antibody. *Plos One.* 10(5):e0123939-10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0123939>.

- Fundora, H. H.; Puig, P. Y.; Chiroles, R. S.; Rodríguez, B. A. M.; Gallardo, D. J. y Milián, S. Y. 2013. Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. *Rev. Cubana de Hig. Epidemiol.* 51(1):84-96.
- Lin, H.; Han, C. S.; Liu, B.; Lou, B.; Bai, X.; Deng, C.; Civerolo, E. L. and Gupta, G. 2013. Complete genome sequence of a chinese strain of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”. *Genome Announcements.* 1(2):e00184-13. Doi: 10.1128/genomeA.00184-13.
- Lu, L.; Cheng, B.; Yao, J.; Peng, A.; Du, D.; Fan, G.; Hu, X.; Zhang, L. and Chen, G. 2013. A new diagnostic system for detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infection in citrus. *Plant Dis.* 97(10):1295-1300. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-12-1086-RE>.
- Mauri, C. and Bosma, A. 2012. Immune regulatory function of b cells. *Annual Review of Immunol.* 30:221-242. Doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934.
- McCollum, G.; Hilf, M.; Irey, M.; Luo, W. and Gottwald, T. 2016. Susceptibility of sixteen citrus genotypes to ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’. *Plant Dis.* 100(6):1080-1086. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0940-RE>.
- Rodríguez, Q. C. G.; Alanís, M. E. I.; Velázquez, M. J. J. y Almeyda, L. I. H. 2010. Optimización de la técnica de extracción del DNA de plantas de cítricos para el diagnóstico del HLB. En 1^{er} simposio nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el huanglongbing en México. Monterrey, Nuevo León. 22-29 pp.
- Rodríguez, Q. C. G.; Almeyda, L. I. H.; Alvarez, O. M. G.; Hernández, G. C. y Mendoza, H. A. 2018. Detección de *Candidatus liberibacter asiaticus* mediante PCR-punto final, utilizando iniciadores diseñados a partir de los genes *omp* y *clibasia.02425*. In: memoria del XXXI Simposio de avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo Rural, Transferencia de Tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos Naturales y Cambio Climático. Veracruz. 1644-1655 pp.
- Söding, J.; Biegert, A. and Lupas, A. N. 2005. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 33(2):244-248. Doi: 10.1093/nar/gki408.
- Tomimura, K.; Miyata, S.; Furuya, N.; Kubota, K.; Okuda, M.; Subandiyah, S.; Hung, T.; Su, H. J. and Iwanami, T. 2009. Evaluation of genetic diversity among ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates collected in southeast Asia. *Phytopathology.* 99(9):1062-1069. Doi: 10.1094/PHYTO-99-9-1062.
- Yuan, Q.; Jordan, R.; Brlansky, R. H.; Minenkova, O. and Hartung, J. 2016. Development of single chain variable fragment (scFv) antibodies against surface proteins of ‘*Ca. Liberibacter asiaticus*’. *J. Microbiol. Methods.* 122:1-7. Doi: 10.1016/j.mimet.2015.12.015.
- Zherdev, A. V.; Vinogradova, S. V.; Byzova, N. A.; Porotikova, E. V.; Kamionskaya, A. M. and Dzantiev, B. B. 2018. Methods for the diagnosis of grapevine viral infections: a review. *Agriculture.* 8(12):1-19. Doi: 10.3390/agriculture8120195.