

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

Álvaro MEDIALDEA MOZOS

SEK International School Atlántico. SEK Education Group. Poio, España.

\* alvaro.medialdea@alumno.sek.es

Recibido: 03-October-2023

Aceptado: 28-Noviembre-2023

Publicado on-line: 29-Diciembre-2023

Cita:

Medialdea Mozos A. 2023 Lucha biológica entre *Penicillium digitatum* y *Candidatus liberibacter*, para erradicar la fitopatología HBL en cítricos, transmitida por el vector *Trioza erytreae*. Mol 23: 8.

## Abstract

The bacterial disease known as Huanglongbing (HBL) is considered the most relevant and dangerous disease of the citrus in the world. Being very destructive with citrus and causing serious losses in their cultivation. The bacterium *Candidatus liberibacter* causes this pathology HBL that causes the blockage in the circulation of nutrients through the vascular system of the plant, and this causes anatomical changes such as mottling and yellowing in the coloration of the leaves and the appearance of galls sometimes. Currently it is common to find all citrus fruits with these symptoms. The vector of these bacteria is the insect *Trioza erytreae* also known as Psila (Figura 1), which feeds on the sap of citrus fruits, transmitting the disease. This is a study which presents a biological fight between the fungus *Penicillium digitatum* (typical of citrus, although it attacks only the fruit, unlike the HBL that attacks the leaves) and the bacterium *Candidatus liberibacter*.

## Resumen

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 erytreae*, también conocido como *Psila* (Figura 1), 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*.

## Introducción

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.



Figura 1. Insecto adulto de *Trioza erytrae*.

<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/organismos-nocivos/tryoza-erytrae/Trioza.aspx>

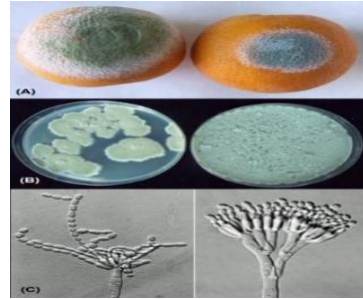


Figura 2. *Penicillium digitatum*

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124115521000028>

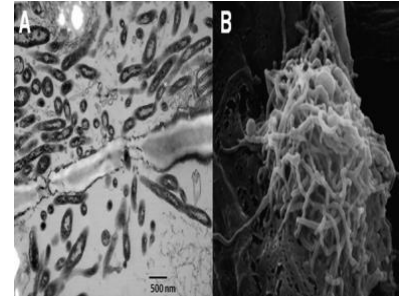


Figura 3. Crecimiento de la bacteria *Candidatus liberibacter*

<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/candidatus-liberibacter>

## Variables

**Dependiente:** crecimiento de la bacteria *Candidatus liberibacter* (Figura 3) medido en Unidades Formadoras de Colonias (UFCs).

**Independiente:** Crecimiento de *Penicillium digitatum* (Figura 2) 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*.

## Marco teórico

Desde el principio de la investigación se han tenido en cuenta estudios previos para poder conocer y contrastar ideas ya tratadas. Este proceso de indagación se completa en el momento en que se entiende lo que es la lucha biológica entre dos especies. Hay estudios previos acerca de la patología y de ambas especies por separado, pero es cierto que hoy en día, la HBL, es de gran importancia para la economía circular de la agricultura ya que produce pérdidas en las cosechas. Se conoce que actualmente existen

varias líneas de investigación persiguiendo el mismo objetivo, la cura de la patología. La brecha de conocimiento existente en nuestra comprensión de la patogenia que conduce a HLB ha bloqueado el desarrollo de tratamientos y métodos para mitigar la influencia del patógeno. (Slisz et al. 2012)

Se tiene en cuenta que ambas especies causan patologías en los cítricos (la bacteria en el sistema vascular llegando a las hojas, y el hongo en los frutos). Se presenta la posible erradicación del patógeno mediante el hongo con propiedades antibióticas del género *Penicillium* especie *digitatum*. Este se aplicaría en los árboles debilitado mediante bicarbonato de sodio y diluido en agua destilada y después del invierno (con el fin de evitar posibles infecciones en los frutos y contando con la ventaja de que el hongo solo infecta a los frutos y no al resto de la planta) cuando ya no hay frutos mediante endoterapia.

La técnica de inyección de sustancias en árboles es considerada antigua, ya que se remonta a la época helenística, misma que se ha venido practicando a partir de mediados del siglo XX con fines terapéuticos, enfocándose directamente sobre la lucha contra fitopatologías, mediante la circulación de ingredientes activos a través de los haces vasculares de la planta (Estévez et al. 2011).

Por lo tanto, el objetivo principal es encontrar una cura ecológica y sostenible para el medio ambiente, dentro del tema de la economía circular, e intentar erradicar la HBL mediante la lucha biológica entre el hongo y la bacteria. Para el estudio del comportamiento de ambas especies se llevó a cabo una simulación en laboratorio para tener controladas todas las variables excepto las que queríamos someter a estudio, sometiendo a las hojas enfermas por la bacteria al contacto con el hongo cultivado en medio sólido en placa de Petri, pudiendo observar la evolución del crecimiento de la bacteria mediante la visualización y conteo con el microscopio durante un período de tiempo establecido en base a la tasa de crecimiento de ambos organismos.

La acumulación de citrato puede ser producida por hongos, como se ha observado con *P. digitatum*, comprometiendo la defensa de los cítricos al acidificar el tejido del huésped a través de la producción de ácidos cítrico y glucónico. Esta acidificación puede ser importante para la patogenicidad y virulencia de '*Ca. Liberibacter*' (Macarasin et al. 2007).

La acidificación del medio puede ser una de las causas por las que la bacteria va decreciendo en unidades formadoras de colonias a medida que pasan los días. La bacteria y el hongo poseen diferentes características y una de ellas es el medio en el que prefieren vivir. El hongo, en este caso, produciendo más citrato se alimenta y genera también glucónico, lo que puede dar lugar a un medio hostil para la bacteria. No obstante, al final, se observa que la bacteria decrece por la acción del hongo al producir toxinas antibióticas y, a la vez, al contribuir a la acidificación del medio, pH al que la bacteria no está adaptada. En los árboles, esta acidificación es posible debido a la savia que viaja por el floema a todas las partes de la planta, pudiendo evitar la aparición de la HBL.

*Penicillium digitatum* es el principal patógeno que aparece tras la cosecha de frutos cítricos. Es un hongo ascomiceto necrotrófico, es decir, matan a las células, penetrando a través de las heridas preexistentes, infectando el fruto, alterando su calidad comercial, produciendo su podredumbre y causando graves pérdidas económicas a nivel mundial. (Garrigues 2015). Es por esta razón por la que se plantea en este estudio la posibilidad de aplicar el hongo después de que se hayan cosechado todos los frutos. Con esta acción evitaríamos la infección de estos y estaríamos tratando la enfermedad antes de que se pudiera dar incluso el proceso de polinización y dispersión de las semillas (prevención de la enfermedad).

Además, es importante tener presente que los microorganismos antagonistas se han utilizado como agentes de biocontrol previamente para diversas enfermedades postcosecha en fruta fresca. (Hernández-Lauzardo 2007)

## Materiales y métodos

### Materiales

En la tabla 1 aparecen detallados los materiales que se han utilizado para llevar a cabo la experimentación, así como las cantidades necesarias y las características más importantes de los mismos.

Tabla 1. Materiales empleados y sus características

<b>Materiales:</b>	<b>Características</b>	<b>Cantidad</b>
Microscopio óptico	Leica DMI3000 B	1
Aceite de inmersión	Labkem MOIL -T02-100	10 ml
Vaso de precipitados	250 ml	2
Agua destilada	PQS	337,5 ml
Placas Petri	8 cm diámetro	32
Cámara de Neubauer		1
Contador manual		1
Portaobjetos	26 x 76 mm	12
Cubreobjetos	20 x 20 mm	84
Espátula metálica		4
<i>Citrus x aurantium</i> fruto		2
<i>Citrus x limon</i> fruto		2
Hojas con la enfermedad HBL	Hojas de limonero	9
Bisturí		1
Bandeja de disección		2
Vidrio de reloj	10 cm de diámetro	4
Agar Dextrose Sabouraud	Labbox	20g
Pipetas cuentagotas		2
Termómetro		1
Goma elástica		7
Guantes		8
Asa de siembra		1
Agitador magnético		1
Mosca magnética		1
Matraz Erlenmeyer	500 ml	1
Balanza de precisión	Nahita blue (Incertidumbre de +/- 0,001 g)	1
Nevera (4°C)		1
Estufa (20°C)		1
Tubos de Eppendorf		75
Mecheros de alcohol		3
Papel de filtro		10
Metanol		100 ml

## Metodología

### *Preparación inicial del material muestreado*

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 (Figura 7) con la ayuda de un microscopio óptico para visualizar y detectar la presencia de organismos (Figura 6) 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 (Figura 7).

### *Cultivo del hongo *Penicillium digitatum**

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 (Figura 8). 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 (Figura 9). 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 (Figura 4) y darle la oportunidad de que entren en contacto con el hongo (Figura 10).

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 (Figura 11).

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 (Figura 12).

Con estas muestras podemos ver a través del microscopio óptico cómo es el hongo (Figura 14), y todos los organismos (Figura 5) 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 (Figura 15).

Además, en las tres últimas, decidimos buscar la bacteria (Figura 2. *Candidatus liberibacter*), al cabo de un rato, y con ayuda del aceite de inmersión y el microscopio óptico pudimos localizarlas (Figura 16) 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 (Figura 13) 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 (Figura 17) 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 (Figura 18).

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.

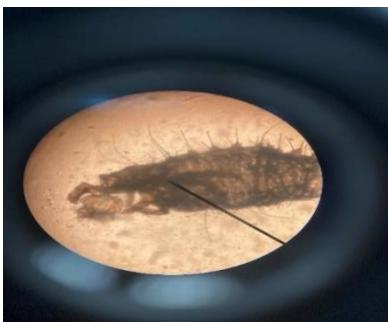


Figura 4. Organismos presentes en las hojas.  
Elaboración propia

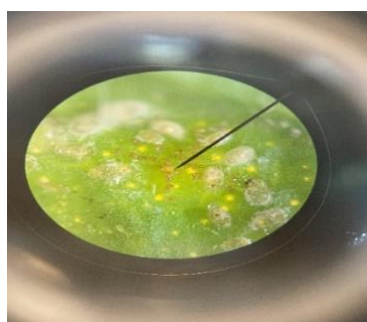


Figura 5. Organismos presentes en las hojas.  
Elaboración propia

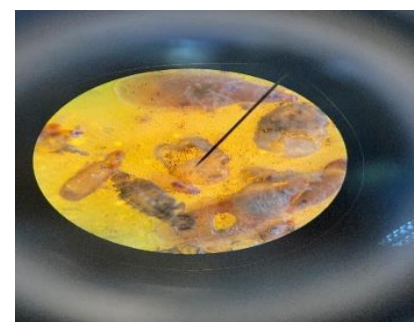


Figura 6. Organismos muertos en las hojas muestreadas. Elaboración propia.

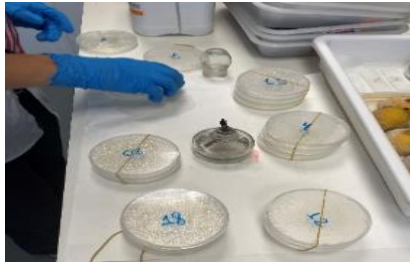


Figura 7. Muestras hojas y hongo cultivado en condiciones contraladas.



Figura 8. Agar Sabouraud y balanza de precisión empelada.



Figura 9. Preparación del medio con Agar Sabouraud



Figura 10. Placas Petri con el cultivo agrupadas de tres en tres.



Figura 11. Placas Petri en el calefactor.



Figura 12. Muestras organismos y hongo en los portaobjetos.

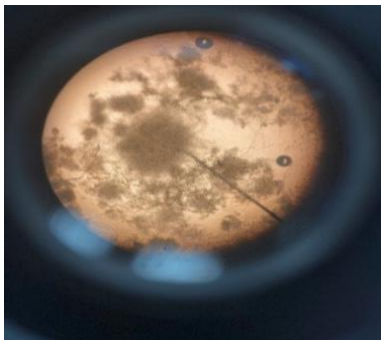


Figura 13. *Penicillium digitatum*.



Figura 14. *Penicillium digitatum* y organismos de las hojas.

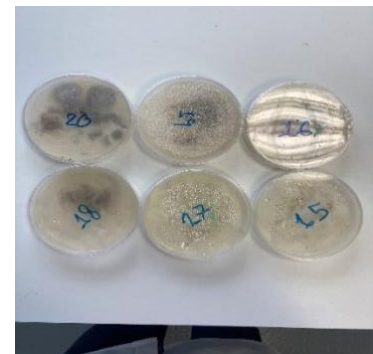


Figura 15. Placas Petri para realizar conteo Neubauer.

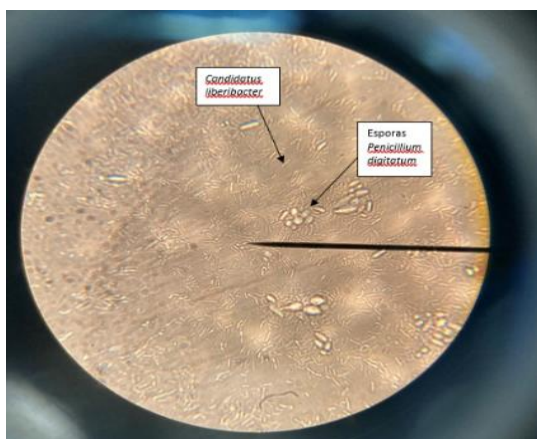


Figura 16. *Candidatus liberibacter* y esporas *Peicillium digitatum*.



Figura 17. Cultivo placa Petri *Penicillium digitatum* y hoja con la enfermedad.

## Resultados

En la visualización a través del microscopio óptico, se encontró una gran cantidad de organismos que estaban cohabitando en las hojas como pulgones (Figuras 5, 6 y 7).

Los datos obtenidos del recuento de las UFCs de *Candidatus liberibacter* pueden observarse en la tabla 2, así como la evolución (Figura 19) de las mismas.

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 (Figura 20)

Como se puede observar en la Figura 20 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.

Tabla 2. Datos obtenidos del recuento de las UFCs de *Candidatus liberibacter*

Día	UFCs contadas en cada placa Petri				
	P15	P17	P18	P19	P20
21/11/20 22	1585	1040	685	624	176
22/11/20 22	508	762	666	457	173
23/11/20 22	352	980	563	543	469
24/11/20 22	816	929	638	541	270
Media	$\frac{1585+508+352+816}{4}$ <b>815</b>	$\frac{1040+762+980+929}{4}$ <b>927</b>	$\frac{685+666+563+638}{4}$ <b>638</b>	$\frac{624+457+543+541}{4}$ <b>541</b>	$\frac{176+173+469+270}{4}$ <b>272</b>

## 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.

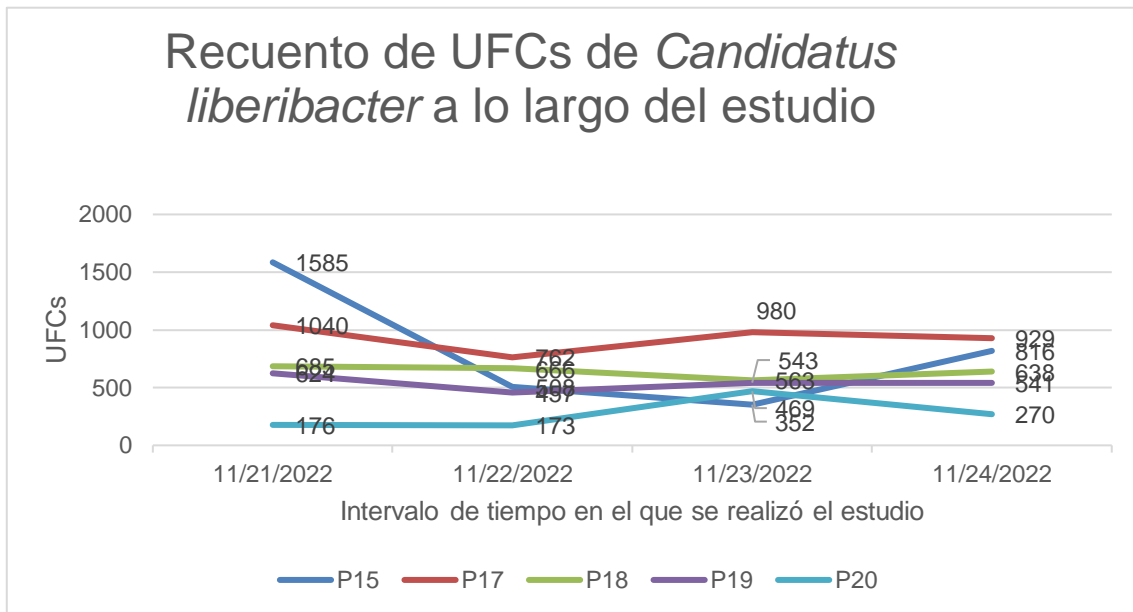


Figura 18. Seguimiento del desarrollo de las UFCs de *Candidatus liberibacter* en cada placa a lo largo del tiempo que duró el estudio.

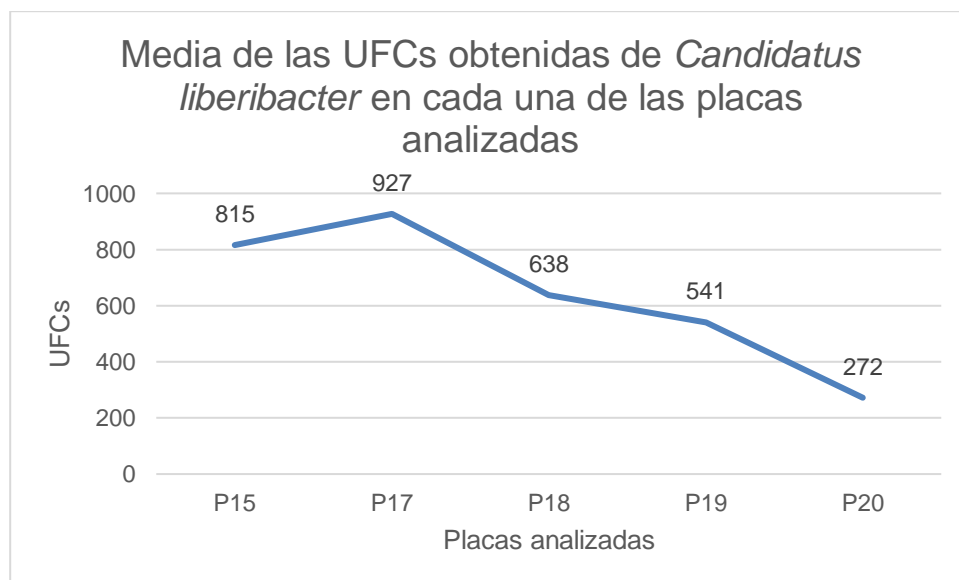


Figura 19. Media de las UFCs obtenidas de *Candidatus liberibacter* en cada una de las placas analizadas.

## Tutora de la investigación

María José Machicote García. Docente de ciencias en SEK International School Atlántico (Poio, España).

## Agradecimientos

Gracias a la profesora Mónica Azpilicueta por brindar esta oportunidad, por su disposición e interés a la hora de revisar este artículo y por su ayuda incondicional durante el proceso de investigación. También agradecer a la tutora María Machicote, por su acompañamiento en este proyecto, por motivar durante el proceso de experimentación y por despertar un interés que estaba ahí. La curiosidad y el proceso para llegar al objetivo de entender el porqué de los sucesos no es más que el principio de una casi segura íntima relación con la ciencia.

## Referencias

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory mycology (Ed. 4). John Wiley and Sons.
- 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. 2015. Caracterización funcional de genes del tipo APF en el hongo fitopatógeno de frutos cítricos *Penicillium digitatum*. Universidad Politécnica de Valencia, España
- 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, Droby S. 2007. *Penicillium digitatum* supresses 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 RJ, Shi H. 2022. Phytomelatonin as a central molecule in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany* 73 (17): 5874-5885.