Filogenia de la enzima ATP/ADP translocasa de *Candidatus* Liberibacter spp., agentes causales del HLB

Felipe Roberto Flores-de la Rosa*, Cynthia Guadalupe Rodríguez-Quibrera, Ricardo Santillán-Mendoza. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Ixtacuaco. Km 4.5 carretera Federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan. Tlapacoyan, Veracruz. CP. 93650. *Autor para correspondencia: flores.felipe@inifap.gob.mx

Recibido: 01 de Septiembre, 2020. Aceptado: 06 de Noviembre, 2020.

Flores-de la Rosa FR, Rodríguez-Quibrera CG and Santillán-Mendoza R. 2021. Phylogeny of ATP/ADP translocase gene from *Candidatus* Liberibacter spp., causal agents of HLB. Mexican Journal of Phytopathology 39(1).

DOI: https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2009-1

Primera publicación en línea: 11 de Diciembre, 2020. First publication on line: December 11, 2020.

Resumen. Las bacterias causantes del huanglongbing (HLB), *Candidatus* Liberibacter spp., son bacterias obligadas al floema de los cítricos y a diferentes sistemas del insecto vector, *Diaphorina citri*, por lo tanto, el enfoque genómico ha sido útil para estudiar sus mecanismos de patogenicidad. Dicho enfoque ha permitido identificar una copia homóloga del gen codificante de la enzima ATP/ADP translocasa, la cual tiene la capacidad de importar ATP y nucleótidos desde el hospedante, causando un parasitismo de energía considerable.

Abstract. The bacteria that cause citrus huanglongbing (HLB), *Candidatus* Liberibacter spp., are obligate bacteria to the citrus phloem and to different systems of the vector insect, *Diaphorina citri*, therefore, the genomic approach has been useful to study its pathogenicity mechanisms. This approach has allowed the identification of a homologous copy of the gene coding for the enzyme ATP / ADP translocase, which has the ability to import ATP and nucleotides from the host, causing considerable energy parasitism. This enzyme has been related to the endoparasitic activity of animal and human pathogens more than to phytopathogens. The present work analyzed the evolutionary relationship between the amino acid sequence of ATP / ADP translocase between different species of *Ca.* Liberibacter and groups such as *Ricketssia* sp. and *Chlamydia* sp. Phylogenetic analyzes show that the variation in the sequence of the gene coding for the enzyme is delimited in clades corresponding to the species of *Ca.* Liberibacter, suggesting that the variation
Esta enzima se ha relacionado con la actividad endoparasitica de patógenos animales y humanos más que con fitopatógenos. El presente trabajo analizó la relación evolutiva entre la secuencia de aminoácidos de la ATP/ADP translocasa entre diferentes especies de Ca. Liberibacter y grupos como Rickektssia sp. y Chlamydia sp. Análisis filogenéticos muestran que la variación en la secuencia del gen codificante de la enzima está delimitada en clados correspondientes a las especies de Ca. Liberibacter, sugiriendo que la variación en la enzima responde a un proceso coevolutivo con los hospederos. Asimismo, la filogenia muestra que el ancestro común más cercano a Ca. Liberibacter podría ser un endosimbionte no patogénico del género Ca. Midichloria. Análisis de conservación de la secuencia de aminoácidos muestran que existen varias posiciones en la secuencia que podrían estar relacionadas con la variación especifica de esta enzima dentro de Ca. Liberibacter. Este trabajo presenta la hipótesis de que el origen evolutivo de la capacidad de parasitismo energético del género Ca. Liberibacter, causantes del HLB, es un endosimbionte no patogénico.

**Key words:** coevolution, energy parasitism, citrus greening

Huanglongbing (HLB) is currently considered the most important disease that affects citrus production worldwide, since it causes trees to die a few years after infection, and because, up to now, there are no effective and economically viable methods for controlling it nor resistant varieties accessible to citrus producers. The disease is associated with infection produced by bacteria of the genus *Candidatus* Liberibacter (*Ca. L.*), so, it has been observed that HLB is caused by *Ca. L. africanus* in South Africa (Roberts and Pietersen, 2017), by *Ca. L. americanus* in Brazil (Wulff et al., 2014), and more extensively by *Ca. L. asiaticus*, for example, in the United States of America (Manjunath et al., 2008) and Mexico (Flores-Sánchez et al., 2015). These bacteria are obligate pathogens in citrus phloem and endosymbionts in different systems of their vector, *Diaphorina citri* (Pelz-Stelinski and Killiny, 2016; Killiny et al., 2018), and for this reason obtaining axenic crops is very complex and hinders pathological studies (Ha et al., 2019; Merfa et al., 2019). In order to understand the molecular mechanisms that favor the development of HLB, the genome of several
(Roberts y Pietersen, 2017), por Ca. L. americanus en Brasil (Wulff et al., 2014) y más extensamente por Ca. L. asiaticus, por ejemplo en Estados Unidos de América (Manjunath et al., 2008) y México (Flores-Sánchez et al., 2015). Estas bacterias son patógenos obligados en el floema de los cítricos y endosimbiontes en diferentes sistemas de su vector, *Diaphorina citri* (Pelz-Stelinski y Killiny, 2016; Killiny et al., 2018), por lo cual la obtención de cultivos axénicos es muy compleja y dificulta los estudios de patología (Ha et al., 2019; Merfa et al., 2019). En aras de comprender los mecanismos moleculares que permiten el desarrollo del HLB, se ha secuenciado el genoma de varias especies de Ca. Liberibacter spp. (Duan et al., 2009; Lin et al., 2013; Fagen et al., 2014; Zheng et al., 2014, 2015; Cai et al., 2018). Esto ha permitido descubrir genes con alto potencial de patogenicidad en la interacción con la planta. Por ejemplo, Vahling et al. (2010) detectaron la presencia de un gen codificante para una enzima ATP/ADP translocasa funcional y con alta afinidad al ATP y ADP, lo cual resulta importante ya que se ha documentado que una de las respuestas de las plantas a la infección por HLB es la acumulación excesiva de ATP (Pitino et al., 2017). Esta enzima ha sido ampliamente relacionada con endosimbiontes intracelulares obligados, la cual tiene la capacidad de obtener ATP desde la célula del hospedante e importarlo dentro de su propia célula. Este mecanismo se conoce como parasitismo energético (Schmitz-Esser et al., 2004). Lo anterior resulta especialmente de interés debido a que previamente no se conocía este tipo de habilidades parasitarias en fitopatógenos, sino únicamente en patógenos humanos y de animales (Trentmann et al., 2007). La historia evolutiva de esta característica patogénica sugiere que el origen de este gen proviene de un endosimbionte ancestro al actual grupo de Rickettsiales que, tentativamente, se mueve de forma horizontal entre otros grupos de patógenos obligados (Emelyanov, 2007).

Ca. Liberibacter spp. species has been sequenced (Duan et al., 2009; Lin et al., 2013; Fagen et al., 2014; Zheng et al., 2014, 2015; Cai et al., 2018). This has led to the discovery of genes with high pathogenic potential in the interaction with plants. For example, Vahling et al. (2010) detected the presence of an encoding gene for an ATP/ADP functional translocase enzyme and with great affinity to ATP and ADP, which is important because it has been documented that one of the plant responses to HLB infection is the excessive accumulation of ATP (Pitino et al., 2017). This enzyme has been widely related to obligate intracellular endosymbionts, for it has the capacity of obtaining ATP from the host’s cell and import it into its own cell. This mechanism is known as energetic parasitism (Schmitz-Esser et al., 2004). This is especially interesting because this type of parasitic abilities was not previously known in plant pathogens but only in human and animal pathogens (Trentmann et al., 2007). The evolutionary history of this pathogenic trait suggests that the gene originates from an endosymbiont ancestor of the current Rickettsiales group which, tentatively, moves horizontally among other groups of obligate pathogens (Emelyanov, 2007).

The objective of this study was to analyze the evolutionary relationships among ATP/ADP translocase genes of different human and animal pathogens and endosymbionts, as well as those found in the genus Ca. Liberibacter, including the pathogens that cause HLB in citrus. For this, using the amino acids sequence reported by Vahling et al. (2010) as a base, a BLASTp analysis was conducted to identify the protein sequences with the greatest similarity, according to an e-value <0.001 and 90% identity in the Genbank database, belonging to Ca. Liberibacter and groups such as *Ricketssia* spp. and *Chlamydia* spp.

Once the amino acid sequences were obtained, a multiple alignment was done using the ClustalW
El presente trabajo tiene como objetivo analizar las relaciones evolutivas entre genes ATP/ADP translocasa de diferentes patógenos y endosimbiontes humanos y animales y los encontrados en el género Ca. Liberibacter, incluyendo los patógenos causantes del HLB de los cítricos. Para esto, utilizando como base la secuencia de aminoácidos reportada por Vahling et al. (2010), se realizó un análisis BLASTp para identificar las secuencias proteicas con mayor similitud de acuerdo a un e-value <0.001 y un porcentaje de identidad >90% en la base de datos del Genbank pertenecientes a Ca. Liberibacter y a grupos como Rickettssia spp. y Chlamydia spp.

Una vez obtenidas las secuencias de aminoácidos se realizó un alineamiento múltiple utilizando el algoritmo ClustalW (gap open=15; gap extend=3) mediante el software Bioedit (Hall, 1999). Posteriormente, una búsqueda del árbol filogenético óptimo mediante el criterio de la Máxima Parsimonia, para lo cual se utilizó el software T.N.T. (Goloboff et al., 2008), para esto se utilizó una búsqueda mediante algoritmos compuestos (ratchet + sectorial search + drift) y se construyó un árbol consenso estricto. Se realizó un remuestreo mediante bootstrap (1000 iteraciones) utilizando las opciones ofrecidas por el software. En seguida, se elaboró un análisis de conservación entre las secuencias de aminoácidos de la enzima en estudio. Para esto, el alineamiento fue analizado para determinar la conservación por sitios específicos mediante el software Jalview (Waterhouse et al., 2009), adicionalmente se realizó un análisis de entropía posicional mediante la función:

\[ H_o = -\sum f(b;l) \ln f(b;l) \]

Dónde \(f(b;l)\) es la frecuencia con que cada aminoácido aparece en cada columna, siendo mínima cuando la posición está totalmente conservada y

A total of 39 sequences of the ATP/ADP translocase enzyme were used to root the phylogenetic tree, and the sequence of the ATP/ADP translocase enzyme of Arabidopsis thaliana plastids (Genbank CAA89201) was added as an external group. The phylogenetic analysis made it possible to recover eight equally parsimonious trees (L=2502) with which a strict consensus tree was built (Figure 1). The results of the analysis show that all the Ca. Liberibacter spp. sequences are clustered in a single clade (highlighted in blue); this clade matches with the enzyme coming from the Candidatus Midichloria mitochondrii endosymbiont, which is associated with ticks.
máxima cuando todos los aminoácidos están igualmente representados. El análisis fue realizado en el software Bioedit.

Se utilizaron en total 39 secuencias de la enzima ATP/ADP translocasa, como grupo externo para enraizar el árbol filogenético, se incorporó la secuencia de la enzima ATP/ADP translocasa de plastidios de Arabidopsis thaliana (Genbank CAA89201). El análisis filogenético permitió recuperar ocho árboles igualmente parsimoniosos (L=2502), con los cuales se construyó un árbol de consenso estricto (Figura 1). Los resultados del análisis muestran que todas las secuencias provenientes de Ca. Liberibacter spp. se aglomeran en un solo clado (remarcado en azul), este clado es grupo hermana con la enzima proveniente del endosimbionte Candidatus Midichloria mitochondrii, asociado a las garrapatas causantes de diversas enfermedades alrededor del mundo, la cual tiene una característica interesante al ser una bacteria patógena intramitochondrial (Sassera et al., 2006).

Es destacable que, dentro del clado antes mencionado, se ubican subclados bien definidos y con soporte bootstrap alto de acuerdo a cada especie del género. El ancestro hipotético basal del clado se comparte entre Candidatus Midichloria mitochondrii y Ca. Liberibacter aeuropeus, esto resulta de interés ya que ambos organismos son considerados endosimbiontes no patógenos en garrapatas causantes de diversas enfermedades alrededor del mundo, la cual tiene una característica interesante al ser una bacteria patógena intramitochondrial (Sassera et al., 2006).

It is worth noting that within the previously mentioned clade there are well defined subclades with a high bootstrap support according to each species of the genus. The hypothetical basal ancestor of the clade is shared between Candidatus Midichloria mitochondrii and Ca. Liberibacter aeuropeus, which is interesting because both organisms are considered to be non-pathogenic endosymbionts in ticks (Najm et al., 2012) and pear trees (Raddadi et al., 2011; Camerota et al., 2012), respectively. Ca. Liberibacter americanus and Ca. Liberibacter africanaus clades are well defined too; they are pathogenic agents causing HLB in Brazil (do Carmo Teixeira et al., 2005; Teixeira et al., 2008) and Africa (Lin et al., 2006). Likewise, based on the presence of Ca. L. solanacearum and Ca. L. asiaticus as well-defined and supported subclades, it is possible to propose two hypotheses: a) the pathogenic capacity of some Ca. Liberibacter species may have developed in a non-pathogenic endophytic ancestor, given that Ca. L. aeuropeus is very basal within the Ca. Liberibacter clade, and b) the clades that are well defined by species suggest that their pathogenicity coevolved with the hosts.

The sequences of the Ca. Liberibacter clade show a high level of conservation in some regions, and the reason associated with ATP transportation is intact in all of them (data not shown). However, some regions are highly variable, following a pattern depending on the species to which the sequence of the enzyme belongs, which could produce a change in the structural dynamics and the protein function (Liu and Bahar, 2012). Figure 2A shows the sites with the highest level of conservation and those that have the highest variability according
Ca. Liberibacter pudo haber sido desarrollada en un ancestro endófito no patógeno, esto debido a que Ca. L. aeurapaeus es muy basal dentro del clado de los Ca. Liberibacter y b) los subclados bien definidos por especie sugieren una coevolución de la patogenicidad con los hospederos.

Las secuencias del clado Ca. Liberibacter muestran un alto grado de conservación en algunas regiones, y el motivo relacionado con el transporte to the alignment frequency. The entropy analysis (Figure 2B) shows that several positions of the ATP/ADP translocase enzyme sequence have an entropic level that suggests high variability in other possible sequences, and for this reason, if new species are found in Ca. Liberibacter with non-reported hosts, the sequence variation could be specific to each host. A thorough study of the function and evolution of this gene will provide a
Figura 2. A) Fragmento del alineamiento de secuencias de aminoácidos de la enzima ATP/ADP translocasa. Se muestra la variabilidad aminoacídica en cada especie de Ca. Liberibacter con respecto a la secuencia de Ca. Midichloria mi-tocondrii. B) Entropía de las posiciones de cada aminoácido en la secuencia de la enzima ATP/ADP translocasa de Ca. Liberibacter. Eje X= Posición de aminoácido, eje Y= Entropía de cada posición.

Figure 2. Figure 2. A) Fragment of the alignment of amino acid sequences of the ATP/ADP translocase enzyme. Amino acidic variability of each Ca. Liberibacter species compared to the sequence of Ca. Midichloria mitochondrii. B) Entropy of the positions of each amino acid in the sequence of the Ca. Liberibacter ATP/ADP translocase enzyme. Axis X= Position of the amino acid, axis Y= Entropy of each position.
de ATP se encuentra intacto en todas ellas (datos no mostrados). Sin embargo, algunas regiones son altamente variables, siguiendo un patrón de acuerdo a la especie a que pertenece la secuencia de la enzima, lo cual podría generar una cambio en la dinámica estructural y en la función de la proteína (Liu y Bahar, 2012). En la Figura 2A se muestran los sitios con mayor nivel de conservación y los que presentan una mayor variabilidad de acuerdo a la frecuencia en el alineamiento. El análisis de entropía (Figura 2B) demuestra que varias posiciones de la secuencia de la enzima ATP/ADP translocasa contiene un nivel entópico que sugiere una alta variabilidad en otras posibles secuencias, por tanto, de encontrarse nuevas especies dentro de Ca. Liberibacter con hospederos no reportados, la variación en las secuencias podría ser específicas a cada hospedero. Ahondar en el estudio de la función y la evolución de este gen permitirá comprender mejor los mecanismos por los cuales se genera el daño en la planta durante el desarrollo del HLB y coadyuvar al desarrollo de posibles estrategias de control de la enfermedad. Los resultados presentados en este estudio sugieren que la capacidad de parasitar ATP que tiene Ca. Liberibacter spp. es una característica compartida con endosimbiontes y endopatógenos; sin embargo, la secuencia de la enzima responsable por este parasitismo varía de acuerdo a cada especie dentro del género lo que sugiere eventos de coevolución del parasitismo con el hospedante.

LITERATURA CITADA

Cai W, Yan Z, Rascoe J and Stulberg MJ. 2018. Draft Whole-Genome Sequence of “ Candidatus Liberibacter asiaticus” Strain TX1712 from Citrus in Texas. Genome Announcements 6(25):1–2. https://doi.org/10.1128/genomea.00554-18.
Camerota C, Raddadi N, Pizzinat A, Gonella E, Crotti E, Tedeschi R, Mozes-Daube N, Ember I, Acz Z, Kolber M, Zehori-Fein E, Daffonchio D and Alma A. 2012. Incidence of ‘Candidatus Liberibacter europaeus’ and phytoplasmas in Cacopsylla species (Hemiptera: Psyllidae) and their host/shelter plants. Phytoparasitica 40:213–221. https://doi.org/10.1007/s12600-012-0225-5.

End of the English version
Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95–98. http://jw-brown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf

Lin H, Han CS, Liu B, Lou B, Bai X, Deng C, Civerolo EL and Gupta G. 2013. Complete Genome Sequence of a Chinese Strain of “Candidatus Liberibacter asiaticus”. Genome Announcements 1(2):e00184-13. https://doi.org/10.1128/genomeA.00184-13.

Lin H, Pietersen G, Han C, Read DR, Lou B, Gupta G and Civerolo E. 2006. Complete genome sequence of “Candidatus Liberibacter africanus,” a bacterium associated with citrus Huanglongbing. Genome Announcements 3:3-4. https://doi.org/10.13406/j.cnki.cyxb.2006.06.005.

Liu Y and Bahar I. 2012. Sequence evolution correlates with structural dynamics. Molecular Biology and Evolution 29:2253–2263. https://doi.org/10.1093/molbev/msq097.

Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S and Lee RF. 2008. Detection of “Candidatus Liberibacter asiaticus” in Diaphorina citri and its importance in the management of citrus Huanglongbing in Florida. Phytopathology 98:387–396. https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0387.

Merfà M V, Pérez-López E, Naranjo E, Jain M, Gabriel DW and De La Fuente L. 2019. Progress and obstacles in culturing “Candidatus Liberibacter asiaticus”, the bacterium associated with Huanglongbing. Phytopathology 109(7):1092-1101. https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-19-0051-RVW

Najm N-A, Silaghi C, Bell-Sakyi L, Pfister K and Passos LMF. 2012. Detection of bacteria related to Candidatus Midichloria mitochondrii in tick cell lines. Parasitology Research 110:437–442. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2509-y.

Pelz-Stelinski KS and Killiny N. 2016. Better Together: Association with “Candidatus Liberibacter Asiaticus” increases the reproductive fitness of its insect vector, Diaphorina citri (Hemiptera: Liviidae). Annals of the Entomological Society of America 109(3):371–376. https://doi.org/10.1093/aesa/saw007.

Pitino M, Armstrong CM and Duan Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H2O2 in citrus plants in response to “Candidatus Liberibacter asiaticus” infection. Horticulture Research 4: 17040. https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40.

Raddadi N, Gonella E, Camerota C, Pizzinat A, Tedeschi R, Cotti E, Mandrioli M, Atilio Bianco P, Daffonchio D and Alma A. 2011. “Candidatus Liberibacter europaeus” sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid Cacopsylla pyri apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. Environmental Microbiology 13:414–426. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02347.x

Roberts R and Pietersen G. 2017. A novel subspecies of “Candidatus Liberibacter africanus” found on native Teclea gerrardii (Family: Rutaceae) from South Africa. Antonie van Leeuwenhoek 110:437–444. https://doi.org/10.1007/s10482-016-0799-x

Sassera D, Beninati T, Bandi C, Bouman EAP, Sacchi L, Fabbi M and Lo N. 2006. “Candidatus Midichloria mitochondrii”, an endosymbiont of the tick Ixodes ricinus with a unique intramitochondrial lifestyle. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56:2535–2540. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64386-0.

Schmitz-Esser S, Linka N, Collingro A, Beier CL, Neuhaus HE, Wagner M and Horn M. 2004. ATP/ADP Translocases: A common feature of obligate intracellular amoebal symbionts related to chlamydiae and rickettsiae. Journal of Bacteriology 186:683–691. https://doi.org/10.1128/ JB.186.3.683-691.2004.

Teixeira DC, Saillard C, Couture C, Martins EC, Wulf NA, Eveillard-Jagoueix S, Yamamoto PT, Ayres AJ and Bové JM. 2008. Distribution and quantification of Candidatus Liberibacter americanus, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. Molecular and Cellular Probes 22:139–150. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2007.12.006.

Trentmann O, Horn M, van Scheltinga ACT, Neuhaus HE and Haferkamp I. 2007. Enlightening energy parasitism by analysis of an ATP/ADP transporter from chlamydiae. PLOS Biology 5:e231. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050231.

Vahling CM, Duan Y and Lin H. 2010. Characterization of an ATP translocase identified in the destructive plant pathogen “Candidatus Liberibacter asiaticus.” Journal of Bacteriology 192(3):834–840. https://doi.org/10.1128/JB.01279-09.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M and Barton JG. 2009. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics 25(9):1189–1191. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033.

Wulf N a, Zhang S, Setubal JC, Almeida NF, Martins EC, Harakava R, Kumar D, Rangel LT, Foisac X, Bové JM and Gabriel DW. 2014. The complete genome sequence of “Candidatus Liberibacter americanus”, associated with Citrus huanglongbing. Molecular Plant-Microbe Interactions 27(2):163–176. https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0292-R.

Zheng Z, Deng X and Chen J. 2014. Whole-Genome Sequence of “Candidatus Liberibacter asiaticus” from Guangdong, China. Genome Announcements 2:e00273-14. https://doi.org/10.1128/genomeA.00273-14.

Zheng Z, Sun X, Deng X and Chen J. 2015. Whole-Genome sequence of “Candidatus Liberibacter asiaticus” from a Huanglongbing-Affected citrus tree in central Florida. Genome Announcements 3:e00169-15. https://doi.org/10.1128/genomeA.00169-15.