

USO DE LA REACCION ALMIDON – YODO PARA LA SELECCIÓN DE HOJAS SOSPECHOSAS CON HLB: DISTRIBUCION ANATOMICA DE NIVELES ANORMALMENTE ALTOS DE ALMIDON EN ARBOLES DE NARANJA VALENCIA POSITIVOS AL HLB

Pedro C. Gonzalez, Ed Etxeberria, Diann Achor, William Dawson, Timothy Spann, Jamie D. Yates and Gene Albrigo.

Horticultural Sciences Department , University of Florida, IFAS, Citrus Research and Education Center, 700 Experiment Station Road, Lake Alfred, Florida 33850

Email: pcgo@crec.ifas.ufl.edu

Resumen:

La enfermedad de los cítricos Huanglongbing (HLB o enverdecimiento de los cítricos), está caracterizada además de otros síntomas por la acumulación de niveles extraordinarios de almidón en las hojas. Esta condición denota desbalances en la relación fuente-sumidero de carbohidratos lo que puede tener implicaciones directas en la salud de los arboles con HLB y en estrategias futuras para el manejo de la enfermedad. Por medio del uso de las microscopias de transmisión electrónica, de barrido y de luz visible, se investigó la distribución inbalanceada del almidón en distintas partes de árboles de naranja Valencia infectados con HLB. En los tejidos aéreos de la planta, la acumulación de almidón en los árboles infectados excede altamente a la de los árboles controles negativos. El almidón se acumula excesivamente en las células fotosintéticas así como en el floema y parénquima vascular en hojas y pesiolo.

En los tallos, el almidón fue observado comúnmente en el parénquima del xilema y en el phelloderma de los árboles infectados pero estaba ausente en los árboles sanos o de control. En contraste, las raíces de los árboles infectados con HLB muestran una deficiencia total de almidón lo contrario de los árboles sanos que contienen depósitos sustanciales de almidón en las raíces. Los resultados soportan la hipótesis de que los cambios sustanciales in la distribución de carbohidratos através del árbol pueden ser no solamente el resultado de la infección con HLB, si no que esto puede causar además un rápido deterioro del árbol infectado y su eventual muerte.

Se presenta además en este trabajo un método simple para la detección visual del almidón en hojas de diferentes variedades de cítricos por medio de la reacción almidón-yodo y resultados preliminares de la cuantificación del contenido de almidón en hojas de cítricos por medio de la misma reacción con el yodo, métodos de gran ayuda para la selección de muestras infectadas con HLB y los cuales tienen un 90 % de correlación con el método del PCR.

ABSTRACT

The citrus disease Huanglongbing (HLB or citrus greening) is characterized, among other symptoms, by extraordinary levels of starch accumulation in leaves. This condition denotes imbalances in carbohydrate source sink relationship which in turn may have direct implications in the overall health of HLB-trees and in future strategies to manage the disease. Using light, scanning, and transmission electron microscopy we investigated the extent of carbohydrate partitioning imbalances throughout the tree. In all aerial tissues, starch accumulation in HLB-affected trees far exceeded that of HLB-negative control trees. Starch accumulated extensively in photosynthetic cells as well as phloem elements and vascular

parenchyma in leaves and petioles. In stems, starch was commonly observed in xylem parenchyma and in the phelloderm of HLB-affected trees but absent from control samples. In contrast, roots from HLB-affected trees were depleted of starch whereas roots from control trees contain substantial starch deposits. The data supports the notion that the substantial changes in carbohydrate partitioning observed throughout the citrus tree may not only be a result of HLB infection, but in itself, a cause for the rapid decline and death of infected trees. We present also here a simple method for visual and quantitative detection of starch in citrus leaves based in the reaction starch-iodine to assist in selecting leaves for HLB testing; this method has a 90 % correlation with PCR analysis.

Keywords: *Candidatus* Liberibacter, citrus greening, phloem collapse

Palabras claves: *Candidatus* Liberibacter, enverdecimiento de los cítricos, colapso del floema

INTRODUCCIÓN

El Huanglongbing de los cítricos “dragón amarillo” o retoños amarillos (HLB, o enverdecimiento de los cítricos) es una enfermedad altamente destructiva, y de rápida propagación. La enfermedad está asociada a la (*Candidatus* Liberibacter spp.) bacteria fastidiosa, Gram-negativa y restringida al floema (9,13), que hasta ahora no ha sido posible cultivarla en medios artificiales, sin embargo se han reportado algunos sucesos recientes en el cultivo parcial de este microorganismo (6). Existen dos formas de HLB más comunes: La forma Africana sensible al calor y que desarrolla mejor sus síntomas en climas frescos causada por la bacteria (*Candidatus* Liberibacter africanus) y la forma Asiática resistente al calor y que desarrolla los síntomas en climas cálidos (*Candidatus* Liberibacter asiaticus). Una tercera forma (*Candidatus* Liberibacter americanus) fue identificada recientemente en Brasil (27). En la Florida, solamente la *Ca. L. asiaticus* ha sido detectada (15) la cual es transmitida por el *Diaphorina citri*, un vector de psíidos descubierto también en Luisiana, Texas y el Sur de California, y recientemente en México (30). La bacteria asociada al HLB infecta a casi todas las especies, cultivares e híbridos de los cítricos. Los más susceptibles son la naranja dulce, la mandarina y los híbridos de mandarina (12), el limón, la toronja y el pomelo se ven afectados en forma moderada; y la lima mexicana, la naranja trifoliada, los citranjos y los citrumelos son más tolerantes y con frecuencia presentan síntomas en las hojas, pero apenas marchites en los tallos. La bacteria es hospedada por otras variedades de plantas ornamentales (12) lo que hace que su erradicación se dificulte más y su control sea crucial.

A pesar de que el HLB ha estado establecido por décadas en el Este de Asia y África del Sur (2,5), el descubrimiento reciente del HLB en Brasil (4,27) y Florida (11,1) ha renovado el interés en esta enfermedad por el impacto potencialmente devastador de la misma en la industria cítrica de dichos países. La producción de jugo de cítricos entre la Florida y Brasil es casi un tercio de la producción mundial (15). En la Florida, la enfermedad se ha diseminado muy rápido y está establecida en prácticamente todos los condados productores de cítricos. En algunas parcelas localizadas en la parte sur del estado, casi un 80% de los árboles han sido infectados con el HLB (Mark Colbert, comunicación personal). En las presentes circunstancias y por la distribución del patógeno, la enfermedad amenaza con diseminarse a las 640,000 acres remanentes de la Industria Cítrica de Florida.

En los árboles de cítricos los síntomas específicos de HLB son muy difíciles de caracterizar, sin embargo los más comunes son los siguientes: En las hojas se observa la aclaración de nervaduras, así como fuertes moteados (por ambos lados de la hoja), manchas de formas irregulares, verdes-claras o amarillas mezcladas con el verde normal sin una clara

división entre ellas. En algunos casos se observa el engrosamiento de las nervaduras de las hojas, tomando un aspecto corchoso. Las hojas jóvenes afectadas permanecen de tamaño pequeño con moteado y amarillamiento, se observan brotes múltiples con hojas pequeñas, pálidas y moteadas creciendo en posición erecta (“orejas de conejos”). Los frutos pueden ser pequeños y de lados irregulares además de pobre coloración, el aborto y atrofiamiento de las semillas es común y la producción de frutas es pobre. Los síntomas varían de acuerdo al tiempo de infección, la etapa de la enfermedad, etc. y pueden ser confundidos o enmascarados con los síntomas de otras enfermedades como deficiencias de minerales como zinc, hierro, manganeso, calcio, etc. (2).

Dentro de otras características inducidas por el HLB, Schneider (20) noto una acumulación masiva de almidón en las hojas de cítricos, presumiblemente como resultado de la presencia de áreas necróticas del floema dispersas en todas partes del sistema vascular en los pecíolos de de las hojas. En su análisis, Schneider (20) llega a la hipótesis según la cual esos bloqueos del floema crean una reserva de fotoasimilados resultando en niveles extremadamente altos de almidón en las hojas de los árboles infectados con HLB, este factor es uno de los que posiblemente contribuye a la apariencia un tanto mas gruesa o parecida al cuero de dichas hojas. De echo, la acumulación excesiva de almidón causa provablemente la desintegración del sistema de tilacoides de los cloroplastos y es lo que causa los síntomas de moteo amarillento en las hojas. El amarillamiento de las hojas como resultado de la acumulación anormal de almidón y la destrucción de tilacoide se puede inducir artificialmente por medio de cortes en forma de anillo en la corteza de las ramas (19).

El contenido de almidón en las hojas afectadas con HLB puede ser 20 veces mayor que los árboles controles o sanos (26). Basado en la habilidad del yodo de ligarse o reaccionar con el almidón resultando en una solución de color azul/violeta (16), los niveles contrastantes de acumulación de almidón en hojas de cítricos han podido ser detectados de manera visual para detectar la presencia de HLB en muchas localidades (31, 17,26) incluyendo la Florida (8). La discrepancia enorme en el contenido de almidón de las hojas de árboles infectados con HLB y de los arboles control sanos refleja una variación significativa en el balance natural de relación fuente de carbono/ sumidero. Si el desequilibrio en el metabolismo de carbón causado por infecciones HLB es restringido a las hojas o es extendido en todas partes de la planta, esto puede tener implicaciones directas en la decadencia de la salud total observada en árboles HLB-afectados y en el futuro estrategias de manejo de la enfermedad. En este reporte, analizamos en mayor detalle la distribución de almidón en el tejido de hojas de árboles en una etapa severa de infección con HLB. Además, estudiamos la distribución de almidón en otras partes de planta comparadas con árboles sanos de control. Se realizaron determinaciones cuantitativas de las concentraciones de almidón en hojas de árboles de cítricos usando la reacción del almidón-yodo en hojas de árboles sanos de control, arboles infectados con HLB confirmados por PCR, así como en muestras de árboles de diferentes parcelas en la Florida, determinándose la factibilidad del método de determinación del almidón tanto visual como cuantitativo como método adicional para la selección de árboles infectados con HLB.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de los árboles

Hojas, tallos jóvenes (verdes), corteza y raíces de árboles de Naranja dulce Valencia (*Citrus sinensis*) de 10 años de edad y confirmados por la técnica de PCR como positivos a HLB, fueron colectadas de parcelas localizadas alrededor de Dover, Florida.

En general, los árboles positivos a HLB de los cuales se tomaron las muestras mostraban síntomas foliares de la enfermedad en aproximadamente un 70% del follaje del árbol indicando un estado avanzado de la infección con HLB (PCR= 19.7; 20.9; 22.3 ciclos)

Muestras de árboles sanos o de control con resultados negativos a HLB fueron obtenidas de árboles crecidos en una plantación sana de la misma especie de naranja cultivada en el Centro de Investigaciones de Cítricos de la Universidad de Florida (CREC).

Reacción del almidón con el yodo

Para la reacción visual del almidón con el yodo, se tomaron muestras de hojas, pecíolos, corteza y raíz cortadas transversalmente con una cuchilla quirúrgica, posterior al corte fueron sumergidas por 2 minutos en una solución de yodo (8.8 gramos KI + 2.2 gramos I₂ en 1 Litro de agua destilada), (16) a temperatura ambiente. Las muestras de tejido fueron lavadas en agua destilada e inmediatamente observadas en un estereoscopio. Las imágenes fueron captadas con una cámara digital Canon PowerShot S3 IS equipada con un adaptador MM99 (Martin Microscope Co.)

Para el método cuantitativo del almidón, las muestras de tejidos de hojas (círculos de 27.3 mm²) se homogenizaron a 6,500 rpm en un homogenizador de tejido con 500 µL de agua destilada. Posteriormente se hirvieron las muestras a 100°C por 10 minutos para la gelatinización del almidón, las muestras fueron centrifugadas por 2 minutos a 2,500 rpm para eliminar los restos de tejido no homogenizado, del sobrenadante se tomaron 300 µL en un tubo ependorf y se añadió 900 µL de alcohol puro para precipitar el almidón, a continuación se centrifugó dicho tubo por 5 minutos a 10,000 rpm para obtener el almidón precipitado, se desechó el sobrenadante y el almidón ya precipitado se resuspendió en 1 mL de agua destilada con agitación vigorosa por 3 minutos en un Vortex. Se adiciona a cada tubo con el almidón soluble 50 µL de la solución de yodo y se lee la absorbancia de la muestra en platos de Elisa a una longitud de onda de 595 nm utilizando para ello un espectrofotómetro para leer micro platos de Elisa Modelo 680 de la marca BioRad. La concentración de almidón se calculó con una curva patrón de almidón de arroz puro de la SIGMA.

Microscopia de Luz visible (LM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Muestras de hojas, pecíolos, tallos, corteza y raíz fueron tomadas de árboles sanos de control y de árboles infectados con HLB. Las muestras fueron fijadas con 3% de glutaraldehído en solución amortiguadora de pH 0.1 M de Fosfato de Potasio, pH 7.2, por 4 horas a temperatura ambiente o toda la noche en refrigerador. A continuación fueron lavadas con la misma solución amortiguadora y fijadas de nuevo durante 4 horas a temperatura ambiente con 2% tetraóxido de osmio en la misma solución amortiguadora. Las muestras ya fijadas fueron deshidratadas con una serie de acetona y embebidas en una resina Supr. (24). Para la microscopia de Luz visible (LM) fueron cortadas secciones de 1 µm con cuchillas de vidrio y a continuación teñidas con Azul de metileno/ azure A, y posteriormente con fucsia básica (21). Las imágenes fueron tomadas con un microscopio compuesto Leitz Laborlux S (Alemania) y una cámara digital Canon Powershot S31S (Tokio, Japón). Para la microscopia electrónica de transmisión (TEM), los mismos bloques de muestras fijadas fueron cortados en secciones de (90-100 nm) con un cuchillo de diamante, recolectados con una malla de cobre aperturas de 200 mesh y teñidas con una solución 2% de acetato de uranilo y teñida de nuevo con citrato de plomo (21). Las imágenes o micrografías fueron tomadas con una cámara digital AMT (Advanced Microscopy Techniques Corp., Danvers, MA) acoplada a un microscopio de transmisión electrónica Morgagni 268 (FEI Company, Hillsboro, OR).

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Tejido de hojas infectadas con HLB y hojas control sanas, fueron fijados usando el mismo procedimiento de fijación para la microscopia electrónica de transmisión. Las muestras fueron deshidratadas en acetona en un secador a punto crítico (Ladd Research Industries, Burlingong, VT). Las muestras fueron cortadas de nuevo con cuchillas de metal a lo largo de la

hoja, montadas en soportes y sometidos a fase de metalizado con oro/paladio con un equipo de metalizado de la misma compañía. Las muestras fueron observadas bajo un microscopio electrónico de barrido Hitachi S530 (Tokio, Japón) y las imágenes tomadas con una cámara digital Canon EOS Rebel XT (Tokio, Japon).

RESULTADOS

Tejido foliar

Para determinar la magnitud a la cual la infección por HLB induce desbalances en el metabolismo de los carbohidratos (reflejado en acumulación de almidón) a través de toda la hoja, se tomaron muestras de tejido tanto autotrófico como heterotrófico. Las micrografías de secciones de las hojas afectadas por HLB comparadas con las hojas control sanas confirman las observaciones realizadas por Schneider (20) que observo niveles anormalmente altos de acumulación de almidón en hojas infectadas con HLB (Fig. 1A versus 1B). En la microscopía de luz visible, los granos de almidón son visibles tanto en las células mesofilicas esponjosas como en las empalizadas (Fig. 1A). Sin embargo granos de almidón relativamente grandes también son observados en las células epidérmicas (Fig. 1A), elementos del floema, floema parenquimatoso así como el xilema parenquimatoso (Fig. 1C). Las hojas de árboles asintomáticos o negativos a HLB se observaron completamente vacías de almidón (Fig. 1B, D), aunque ocasionalmente unos pocos granos de almidón fueron observados en células empalizadas y/o esponjosas, pero nunca en tejido vascular como es el caso de las hojas con HLB. A propósito, la diferencia significativa entre el contenido de almidón de las hojas de cítricos sin síntomas de HLB y las afectadas por HLB son tan remarcadas que pueden ser incluso observadas a en un microscopio con un lente de bajo aumento o con una lupa 10X cuando dichas hojas son tenidas con 2% de yodo (Fig.2). En adición a la acumulación de almidón, se observan evidencias de un colapso del floema en la Fig. 1C. Esto puede ser observado como células no-ovaladas y aplastadas y áreas con células inertes y opacas (Flechas).

La intensidad de la acumulación de almidón así como los detalles sobre la dimensión de los granos y su distribución a través de las células de las hojas se pueden apreciar mejor en las imágenes captadas con el microscopio electrónico (Fig. 3 y 4). Múltiples granos de almidón por cloroplasto son perfectamente visibles en las células empalizadas de hojas afectadas con HLB (Fig. 3A, C), lo contrario de las cloroplastos de las hojas sanas control que contienen solamente una pequeña cantidad de partículas de lípidos y una baja frecuencia de granos muy pequeños de almidón presentes (Fig. 3B, D). Adicionalmente, las partículas de lípidos observadas en las hojas afectadas con HLB (Fig. 3C, flechas) son mas numerosas y visiblemente mas largas que en los controles negativos (Fig. 3 D, flechas). Los granos de almidón en las células epidérmicas son menos numerosas que en las células mesofilicas y empalizadas, sin embargo su tamaño es considerablemente mas largo y en combinación ocupan una porción mas larga del volumen de la célula comparado con las células empalizadas de las hojas afectadas por HLB (Fig. 3 A).

Las imágenes de alto aumento tomadas en el microscopio electrónico de las células empalizadas esponjosas revelan diferencias citológicas entre los controles de hojas no infectadas e infectadas con HLB. En el caso de las células de hojas infectadas con HLB, el citosol ocupa una porción larga del volumen de la célula (Fig. 4A, B), conteniendo una gran diversidad de organelos membranosos, y mitocondria, los cuales además de ser mas numerosos, tienden a congregarse alrededor de los cloroplastos llenos de almidón (Fig. 4C, flechas). El numero mayor de mitocondria y su proximidad a los cloroplastos en las células con HLB fue evidente en todas las preparaciones hechas y es un indicador de un nivel más alto de actividad metabólica asociada a la acumulación de almidón. Otra característica notable fue la apariencia mas granular y densa de las vacuolas en las hojas control sanas. (Fig. 4B, D). Es de

notar que las hojas control sanas a veces contienen algunos granos de almidón, sin embargo los mismos son considerablemente más pequeños (Fig. 4D, flechas) que los que se observan en las células de hojas provenientes de árboles infectados con HLB (Fig. 4C, flechas). Las diferencias en el contenido de almidón y la textura de las vacuolas celulares fueron evidentes no solamente en las imágenes adquiridas con el microscopio de transmisión electrónica, sino que las imágenes tomadas con el microscopio electrónico de barrido confirman dichas observaciones (Fig. 5). Conglomerados de granos de almidón son evidentes en las células de hojas infectadas con HLB aparentemente originados de cloroplastos separados (Fig. 5B). La textura granular de las vacuolas en las hojas control sanas son vistas como una red filamentosa a través de la célula (Fig. 5B). Esta red filamentosa está ausente en los espacios celulares ocupados por las vacuolas en el caso de las hojas infectadas con HLB (Fig. 5A).

Los cloroplastos de las células de hojas infectadas con HLB se muestran virtualmente irreconocibles (Fig. 6A) como resultado de los granos de almidón enormes. El sistema tilacoide sin una grana evidente, es visible solamente entre los granos largos de almidón o aplastados contra la membrana doble de envoltura de los cloroplastos (Fig. 6A). En contraste, los cloroplastos de las hojas sanas de control muestran una morfología típica de bolsa oblicua con un sistema de grana bien desarrollado y contiene unos pequeños granos de almidón (Fig. 6B, flechas). Otra característica distintiva de las células fotosintéticas provenientes de árboles infectados con HLB fue una pared celular visiblemente más gruesa (Figs. 4 y 6), lo que le da a las hojas una textura acartonada o acorchada.

Siguiendo un perfil similar de distribución del almidón, los pecíolos de las hojas de árboles infectados con HLB contienen una cantidad enorme de granos de almidón en las células parenquimatosas dentro (Fig. 7A) y fuera del sistema vascular (Fig. 7C) comparado con los pecíolos provenientes de hojas control sanas (Fig. 7B, D, respectivamente). En todos los casos, los granos son visibles en las laminillas del xilema vascular y en elementos del floema (Fig. 7A). Esto a menudo es ocultado por células del floema colapsadas (Fig. 7A, flechas), una característica intrínseca de la infección con HLB (Schneider, 1968). En contraste, los pecíolos de hojas control sanas muestran un floema normal activo con muy poca o ninguna acumulación de almidón (Fig. 7B). Las micrografías o imágenes adquiridas con el microscopio electrónico de barrido confirman la diferencia en la acumulación de almidón en el parénquima del pecíolo (Fig. 7 C, D). Mientras que las células del pecíolo de las hojas control sanas contienen ocasionalmente algún grano de almidón (Fig. 7 D), el parénquima del pecíolo de las hojas infectadas con HLB contiene cantidades sustanciales de granos de almidón en casi todo el parénquima (Fig. 7 C).

Tallos y corteza

La distribución del almidón en los tallos y corteza fue parecida a la de las hojas en el aspecto de que la acumulación de almidón en los tejidos infectados por HLB excede en varias veces la concentración de almidón en hojas sanas (Fig. 8). En los tallos de los árboles infectados con HLB, las células parenquimatosas contienen granos de almidón en el tejido vascular desde el área del xilema central hasta el área del floema. Mientras que las células parenquimatosas del xilema contienen cantidades significativas de almidón, el colapso del floema provoca solamente una acumulación esporádica en el tejido del floema.

Granos de almidón fueron también abundantes en gran medida en el feloderma exterior de los árboles afectados por el HLB (Fig. 9 A), lo que concuerda con las observaciones hechas de otras partes aéreas de la planta. Sin embargo, nuestras observaciones fueron igualmente consistentes en que el almidón también se acumula en la corteza de los árboles sanos o control, pero en menor medida (Fig. 9 B).

Raíces

Mientras el almidón se acumula desproporcionadamente en todas las células de las partes aéreas de los árboles infectados con HLB (Figs. 1-9), en las raíces la situación es diferente. Raíces teñidas con yodo provenientes de árboles infectados con HLB muestran una ausencia casi total de almidón (Fig. 10 A, C). Una raíz de casi la misma medida de un árbol sano o control presenta almidón en casi la totalidad de las células vivas (Fig. 10B, D). La reducción casi completa del almidón en las raíces de los árboles infectados con HLB puede tener implicaciones severas en su potencial de supervivencia en comparación con las raíces de los árboles sanos o control.

Cuantificación del almidón en hojas sanas e infectadas con HLB

Como se puede observar en la Fig. 11, los valores de almidón en hojas infectadas con HLB superan en más de 4 veces dichos valores para hojas control sanas, pudiéndose establecer un promedio de las concentraciones de almidón para hojas sanas y enfermas que nos ha servido para analizar muestras tomadas al azar en varias parcelas comerciales de cítricos en la Florida teniendo como resultado un 90 % de correlación entre el método de determinación del almidón y el método del PCR, en algunos casos fueron detectados altos niveles de almidón en árboles que inicialmente mostraron valores negativos al PCR y en una segunda colección un mes más tarde de muestras de los mismos árboles resultaron HLB positivos por PCR (Resultados no mostrados en este trabajo).

DISCUSION

El almidón es un producto natural de la fijación fotosintética del CO₂ en tejidos verdes o vegetales. Formado por enlaces α -1,4 glucosa, el almidón existe en dos formas, la parte soluble o cadena lineal pequeña, amilasa, y la parte insoluble o cadena altamente ramificada, amilopectina (22,28). En células verdes, el almidón se acumula durante el día y se moviliza durante la noche (y otros tiempos de baja actividad fotosintética) para mantener un flujo o alimentación constante de carbono a los tejidos heterotróficos. Sin embargo las hojas de los cítricos normalmente acumulan muy bajos niveles de almidón en cualquier tiempo (29) y cantidades considerables solo son observadas como resultado de deficiencias en zinc (23) o artificialmente inducido por cortes en forma de anillos en las ramas (19). Una vez acumulado el almidón en las hojas de cítricos no es degradado (10) ni siquiera durante los ciclos nocturnos y se queda en la hoja indefinidamente.

En el presente estudio hemos demostrado que la acumulación altos niveles de almidón como resultado de la infección con HLB en cítricos no esta restringida solamente a las células fotosintéticas de la hoja como ha sido documentado anteriormente (20, 25, 17, 26), si no que, esta característica se extiende virtualmente a todos los tejidos aéreos de la planta. En nuestras las muestras analizadas por nosotros, los granos de almidón fueron observados comúnmente a través de todas las células fotosintéticas de las hojas y pecíolos, en las células del parénquima de los tejidos vasculares y de la medula y hasta en elementos del floema (Figs. 1-9). Dicho metabolismo de carbohidratos esta significativamente alterado por la infección de la planta con HLB mucho mas allá de los tejidos de hojas, lo cual esta respaldado sin duda alguna con los resultados presentados en este trabajo. La acumulación de almidón fue marcadamente diferente entre todos los tejidos estudiados de árboles controles sanos e infectados con HLB. Considerando que el almidón en el parénquima y feloderma vascular de los tallos de los árboles infectados con HLB acumulan también almidón a niveles mucho más altos que los árboles sanos, las raíces de los árboles con HLB están completamente empobrecidas en reservas de almidón. Esta observación contrasta con lo observado en árboles sanos donde la acumulación de almidón en las hojas y otras partes aéreas de la planta es mínima (Figs. 1-9),

sin embargo las raíces en dichos árboles están repletas de almidón (Fig. 10). La ausencia de reservas de almidón en las raíces de árboles infectados con HLB (Fig. 10 A, C), es aparentemente el resultado de la disminución del transporte de fotoasimilados hacia las raíces y el consiguiente uso de las reservas de almidón para sostener sus propias actividades metabólicas. El agotamiento final de las reservas de almidón conduce a un ayuno total o estrés y por consiguiente una reducción en el potencial de supervivencia en comparación con los árboles sanos (Fig. 10 B, D).

Teniendo en cuenta que nuestras observaciones fueron realizadas con material proveniente de arboles maduros en un estado de infección con HLB relativamente alto o deterioro del árbol (estimado por la presencia general de todos los síntomas de HLB), es un algo difícil llegar a la explicación de una sucesión cronológica de eventos que hayan conducido a la acumulación de altos niveles de almidón en las hojas y otras partes de la planta. Sin embargo, pueden hacerse algunas conclusiones con un grado alto de certeza.

Primero, de acuerdo con Scheneider (20), la acumulación de almidón en el tejido foliar es como resultado del bloqueo total de los fotoasimilados provocado por una necrosis del floema inducida por el HLB. Sin embargo, nuestras observaciones de altos contenidos de almidón tejidos de tallos y cortezas por debajo de la vía de los fotoasimilados contradice en parte esta hipótesis. Si los fotoasimilados son bloqueados totalmente al nivel del pecíolo, no se encontraría ninguna acumulación de almidón en los tallos y corteza por debajo del follaje de las hojas. Es de destacar que muestras de corteza tomadas justo encima de la línea de injerto en árboles infectados con HLB presentan niveles de almidón visiblemente altos con relación a los árboles sanos (Fig. 9) sin ningún signo de bloqueo del floema (Datos no presentados). Además, nosotros con frecuencia colectamos hojas totalmente asintomáticas localizadas entre o junto a hojas sintomáticas, llenas de almidón, condición que contradice algún tipo de bloqueo total del floema. Como alternativa, los elementos bloqueadores o que tapan el floema puede que no sean totalmente uniformes permitiendo el paso de algunos azúcares y acumulación de almidón antes de que ocurra una necrosis total del floema. De esta forma, algunos azúcares alcanzan la parte baja del tallo pero no las raíces donde prácticamente no hay azúcares disponibles para la síntesis de almidón.

Segundo, las grandes dificultades para encontrar raíces secundarias en árboles infectados con HLB, y la ausencia total de almidón en las muestras que se lograron colectar (Fig. 10 A, C) es una buena indicación de un ayuno o estrés de carbohidratos en el sistema de raíces resultado de una redistribución fisiológica de las reservas de carbono. En circunstancias normales, el sistema de raíces acumula cantidades sustanciales de almidón presumiblemente utilizados durante brotes vegetativos y reproductivos (10). Sin embargo, al quedar secuestrados los carbohidratos en las partes aéreas de los árboles atacados por HLB, es muy posible que las raíces utilicen sus reservas para sostener sus propias actividades metabólicas hasta un total ayuno de la raíz y como resultado una total degradación de la misma.

Teniendo en cuenta que anteriormente han sido observadas acumulaciones de almidón in pimientos (14) y papas (18), la desintegración del floema en cebada (7) y obstrucción en cucurbitáceas (3) como respuesta a una variedad de condiciones patológicas limitadas al floema, nosotros examinamos la posibilidad de una acumulación alta de almidón en hojas de cítricos con condiciones como declinamiento o tizón (blight), tristeza, deficiencia de Zinc y fractura de ramas (girdling). Solamente en árboles con deficiencia en Zinc o ramas fracturadas nosotros observamos niveles de almidón en hojas por encima de lo normal, sin embargo en ninguno de los casos estos niveles de acumulación fueron cercanos o comparables con los altos niveles de acumulación observados en hojas de árboles infectados con HLB.

Los resultados presentados en esta comunicación son una evidencia clara de que el HLB tiene una influencia o efecto drástico en el metabolismo de los carbohidratos en la planta. Los datos obtenidos respaldan la noción de que los cambios sustanciales en la distribución de carbohidratos a través del árbol de cítrico puede ser no solo el resultado de la infección con HLB si no que por si misma puede ser la causa de una rápida declinación y posterior muerte de los árboles infectados. La acumulación de almidón ha sido observada prácticamente en todas las células vivas de las partes aéreas del árbol denotando una redirección clara del transporte de los carbohidratos. Si la acumulación generalizada de almidón en las partes aéreas de la planta es a expensas de la movilización de almidón de las raíces o a un incremento en la capacidad de fijación de carbono como consecuencia de la infección con HLB es algo que hay que demostrar todavía. Sin embargo, el movimiento ascendente de las reservas de almidón o carbono es casi imposible con un floema tapado. Es mas probable que el almidón de las raíces sea consumido para sostener sus actividades metabólicas cuando solamente muy pocos azúcares son desplazados hacia abajo desde las hojas, resultando en la muerte de la raíz y por consiguiente la declinación o muerte del árbol.

Por otra parte los resultados obtenidos de la medición cuantitativa y visual del almidón por su reacción con el yodo, en hojas de árboles infectados con HLB y arboles sanos a nivel de campo nos brinda otra herramienta adicional para la selección de muestras posiblemente infectadas con HLB, debido a su alta correlación con el método oficial de detección de la infección o PCR (Reacción en cadena de la polimeraza).

Literatura citada

1. Bouffard K. Greening found in 10 counties. *Citrus Ind* 2006; 87:5-26.
2. Bove JM. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease in citrus. *J Plant Pathol* 2006; 88:7-37.
3. Bruton BD, Fletcher J, Pair SD, Shaw M, Sittertz-Bhatkar H. Association of a phloem-limited bacterium with yellow vine disease in Cucurbits. *Plant Dis* 1998; 82:512-520.
4. Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu JJ, Machado MA. First report of the casual agent of huanglongbing in Brazil. *Plant Dis* 2004; 88:1382.
5. da Garca JV, Korsten L. Citrus huanglongbing review, present status and future strategies. In: SAMH Naqvi (ed). *Disease of Fruits and Vegetables* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Neatherlands. 2004, pp. 229-245.
6. Davis M, Mondal SN, Chen H, Rogers ME, Brlansky RH. Cocultivation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* with Actinobacteria from Citrus with Huanglongbing. *Plant Dis* 2008, (in Press).
7. Esau K. Phloem degeneration in gramineae affected by the barley yellow-dwarf virus. *Amer J Bot* 1957; 44:245-251.
8. Etxeberria E, González P, Dawson W, Spann T. An iodine-based starch test to assist in selecting leaves for HLB testing. 2007, <http://edis.ifas.ufl.edu/HS375>.
9. Garnier M, Bove JM. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. *Phytopathology* 1983; 73:1358-1363.
10. Goldschmidt EE, Koch KE. Citrus. In *Photoassimilate distribution in plants and crops*. E Zamski, A. Schaffer (eds). Marcel Dekker, New York. 1996, pp. 797-823.
11. Halbert SE. Pest Alert. Citrus greening/Huanglongbing, 1995 <http://www.doacs.state.fl.us/pi/chrp/greening/citrusgreeningalert.html>
12. Halbert SE, Manjunath KL. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Fla Entomol* 2004; 87:330.

13. Jagoueix S, Bove JM, Garnier M. The phloem-limited bacterium of greening disease of the protobacteria is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44:379-386.
14. Lebsky V, Poghosyan A. Phytoplasma associated diseases in tomato and pepper in the estate of BCS, Mexico: a brief overview. *Bull Insectol* 2007; 60:131-132
15. Manjunath KL, Halbert SE, Ramadugu C, Webb S, Lee RF. Detection of '*Candidatus Liberobacter asiaticus*' in *Diaphorina citri* and its importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. *Bacteriology* 2008; pp. 387-396.
16. McGrane SJ, Cornell HJ, Rix CJ. A simple and rapid colorimetric method for the determination of amylase in starch products. *Starch* 1998; 4:158-163.
17. Onuki M, Truc NTN, Nesumi H. Delta-JIRCAS workshop. Cantho, Nov. 26-28, 2002, pp. 1-5.
18. Savile DBO. Alteration of potato starch grain structure under the influence of disease. *Amer J Bot* 1942, 29:286-287.
19. Schaffer A, Liu K-C, Goldschmidt E, Boyer CD, Goren R. Citrus leaf chlorosis induced by sink removal: Starch Nitrogen and chloroplast ultrastructure. *J Plant Physiol* 1986, 124:111-121.
20. Schneider H. Anatomy of greening-disease sweet orange shots. *Phytopathology* 1968, 58:1155-1160.
21. Schneider H. Plant anatomy and general botany. In: G. Clark (ed.). *Staining procedures for biological stain commission*. 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 1981, p. 315-373.
22. Smith AM, Denyer K, Martin C. The synthesis of the starch granule. *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* 1987, 48:67-87.
23. Smith PF. Zinc accumulation in the wood of citrus trees affected with blight. *Proc Fla State Hort Sci* 1974, 87:91-95.
24. Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastructure Res* 1969, 26:31-43.
25. Taba S, Nasu K, Takaesu K, Ooshiro A, Moromizato Z. Detection of citrus huanglongbing using an iodo-starch reaction. *Univ Ryokyus, Agric Dept Acad Rpt* 2006, 53:19-23.
26. Takushi T, Toyozato T, Kawano S, Taba S, Ooshiro A, Numazawa M, Tokeshi M. Starch method for simple, rapid diagnosis of citrus huanglungbing using iodine to detect high accumulatuion of starch in citrus leaves. *Ann Phytopathol Soc Japan* 2007, 73:3-8.
27. Texeira DC, Ayers AJ, Kitajima EW, Tanaka FAO, Danet JL, Jagoueix-Eveillard S, Saillard C, Bove JM. First report of huanglongbing-like disease of citrus in Sao Paulo state, Brazil, and association of a new *Liberobacter* species, *Candidatus Liberobacter americanus*, with the disease. *Plant Dis.* 2005; 89:107.
28. Wang TL, Bogracheva TY, Hedley CL. Starch: as simple as A, B, C. *J Exp Bot* 1998, 49:481-502.
29. Yelenosky G, Guy CL. Carbohydrate accumulation in leaves and stems of 'Valencia' orange at progressively colder temperatures. *Bot. Gazette* 1977, 138:13-17.
30. Javier Trujillo Arriaga <http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=384>

Figuras

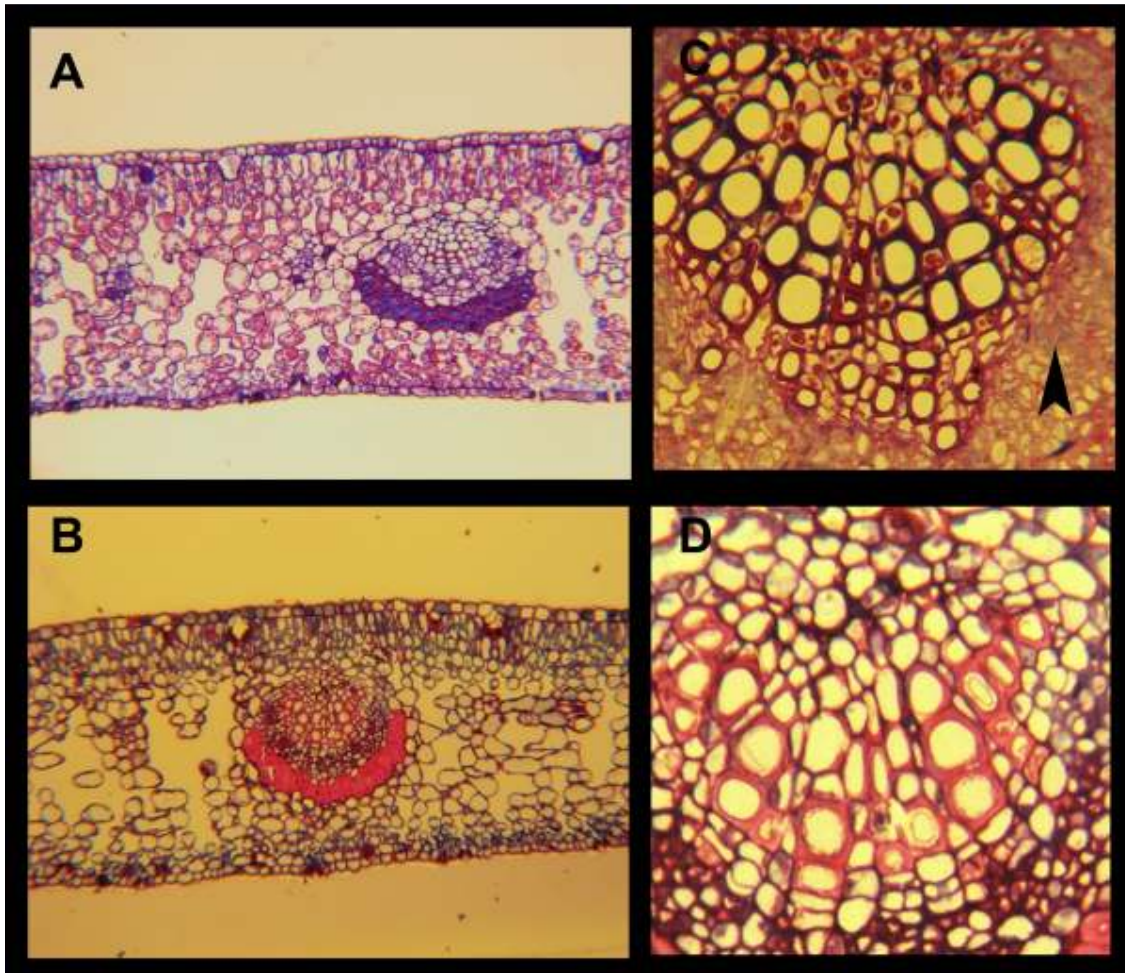


Fig. 1. Imágenes de microscopía de luz visible tomadas a cortes transversales de (A) hojas de árboles de naranja dulce “Valencia” infectadas con HLB y (B) hojas de árboles sanos control de la misma variedad. Las hojas eran comparables en tamaño y edad, y colectadas de áreas similares de los árboles. C y D son imágenes magnificadas de tejido vascular secundario de A y B respectivamente. En ellas se observa la acumulación de almidón en el tejido vascular parenquimatoso y el floema colapsado (cabeza de flecha) característico de células infectadas con HLB.

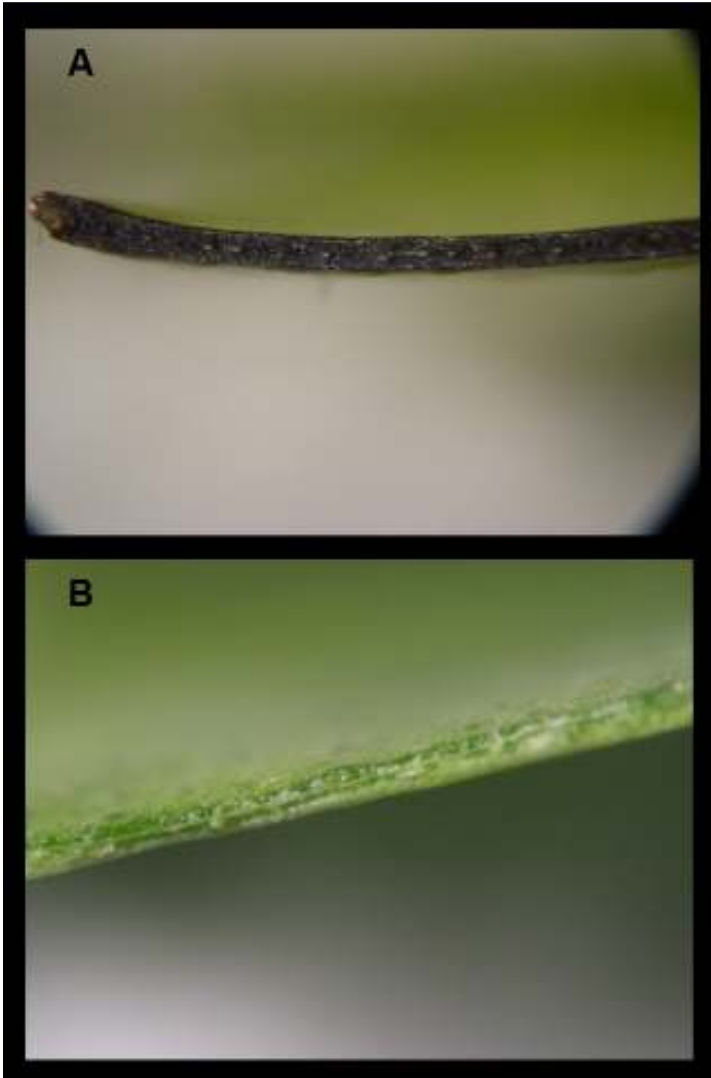


Fig. 2. Imagen tomada con microscopía de luz visible de un corte transversal de una hoja de naranja dulce "Valencia" infectada con HLB (A) y una hoja de un árbol control sano de la misma especie (B). Las hojas fueron cortadas con una navaja transversalmente y sumergidas en una solución de yodo por 2 minutos antes de observarlas bajo el microscopio y tomar la imagen.

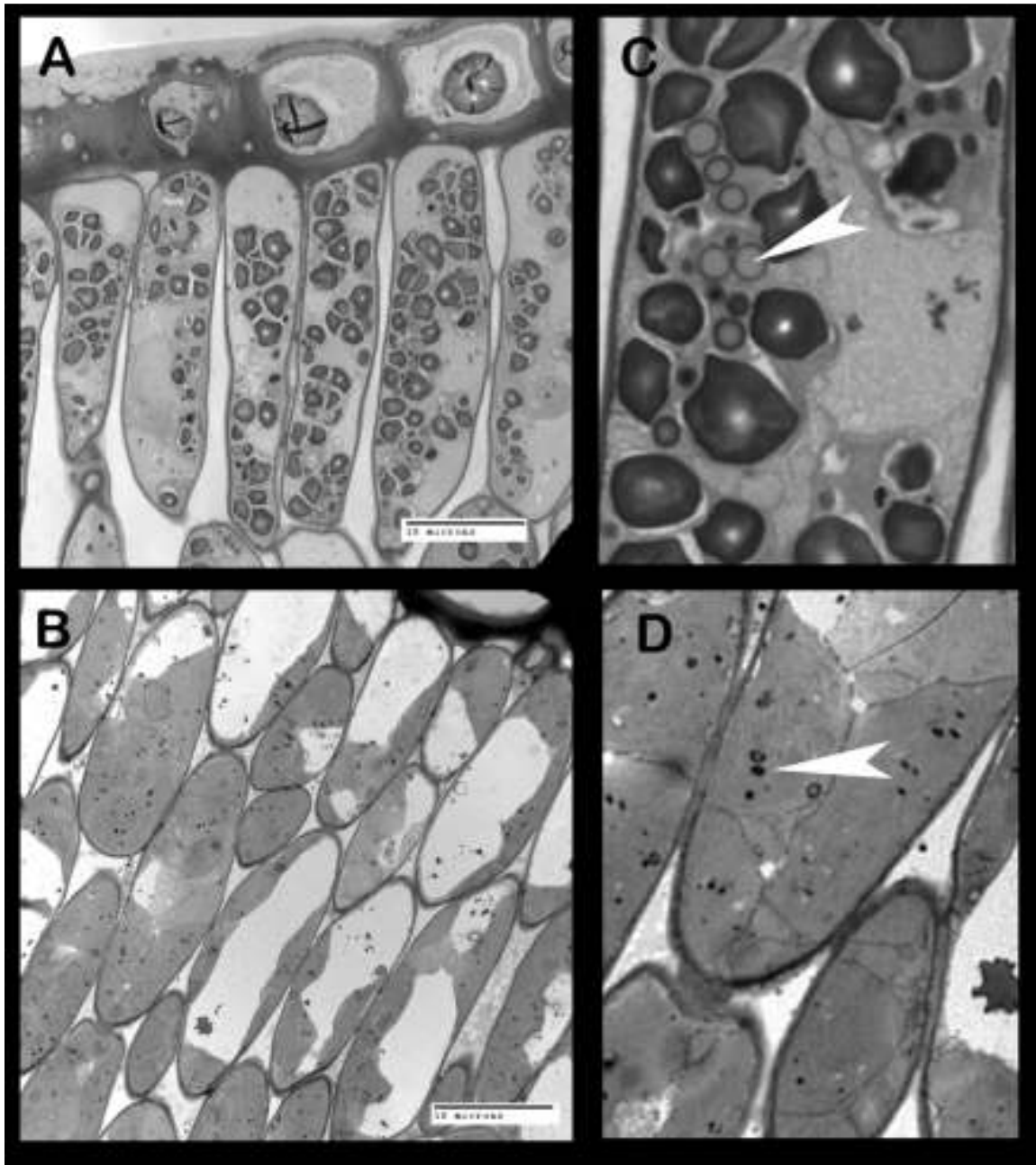


Fig. 3. Imágenes de microscopio electrónico de tejido parenquimatoso empalizado de hoja (A) infectada con HLB y control sano (B). Las hojas infectadas con HLB mostraban las venas corchosas, un síntoma asociado al HLB. C y D son imágenes magnificadas de A y B respectivamente mostrando las diferencias en el contenido de almidón y lípidos. Las flechas indican cuerpos lípidos.

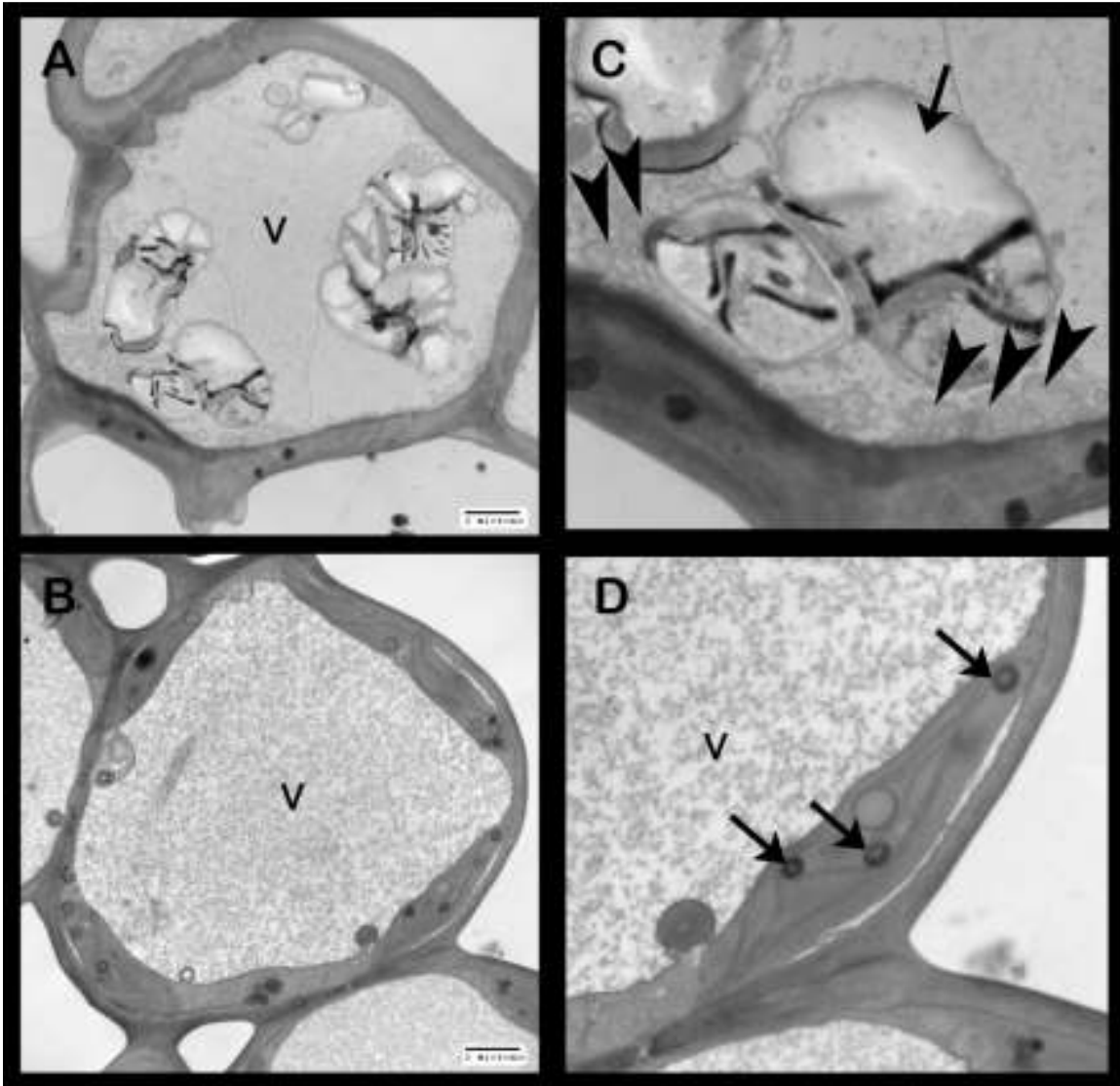


Fig. 4. Imágenes de microscopio electrónico de una sola célula de hojas de cítrico de tejido de parénquima empalizado con HLB (A) y control sano (B). Los cloroplastos de las hojas infectadas con HLB no son claramente distinguibles debido al alto contenido de almidón. C y D son imágenes magnificadas de los cloroplastos A y B respectivamente. Nótese el número grande de mitocondrias en la periferia de los cloroplastos de hojas con HLB. V= Vacuola; cabeza de flecha = mitocondrias y flechas = Granos de almidón.

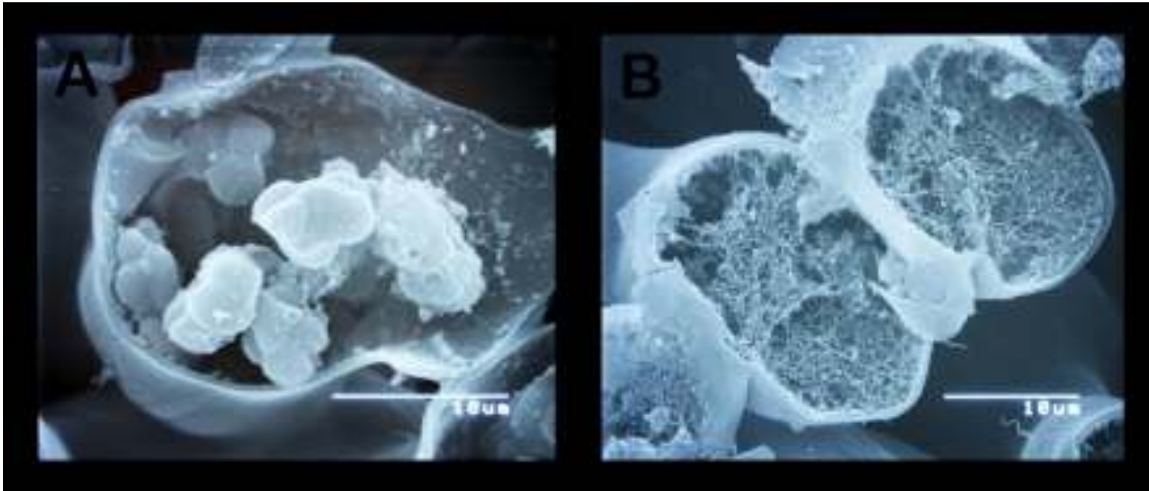


Fig. 5. Imágenes de microscopio electrónico de barrido de células empalizadas de hojas de cítricos (A) as infectadas con HLB y (B) hojas de controles sanos. Se nota claramente los granos de almidón en las células de hojas con HLB (A) y la naturaleza fibrosa de las hojas de control sanas.

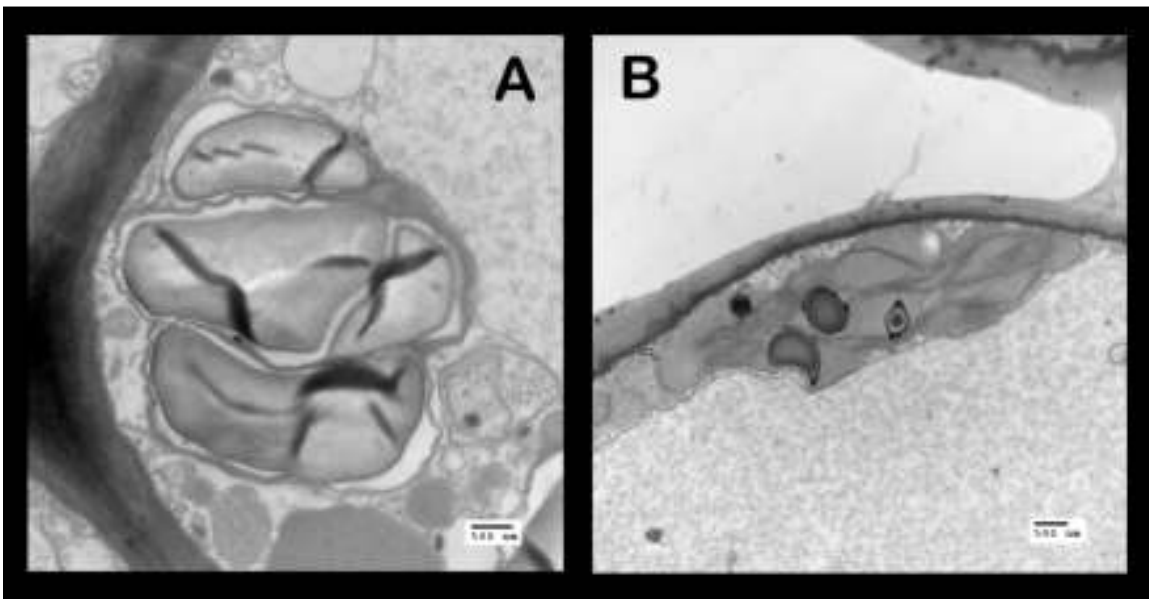


Fig. 6. Imagen de microscopio electrónico de cloroplastos procedentes de hojas de cítricos infectadas con HLB (A) y hojas de controles sanos (B). Se nota la membrana tilacoide compresada entre los granos de almidón y la membrana del cloroplasto en las células de hojas infectadas con HLB (A). Un sistema tilacoide con grana es evidente en las hojas de control sano (B).

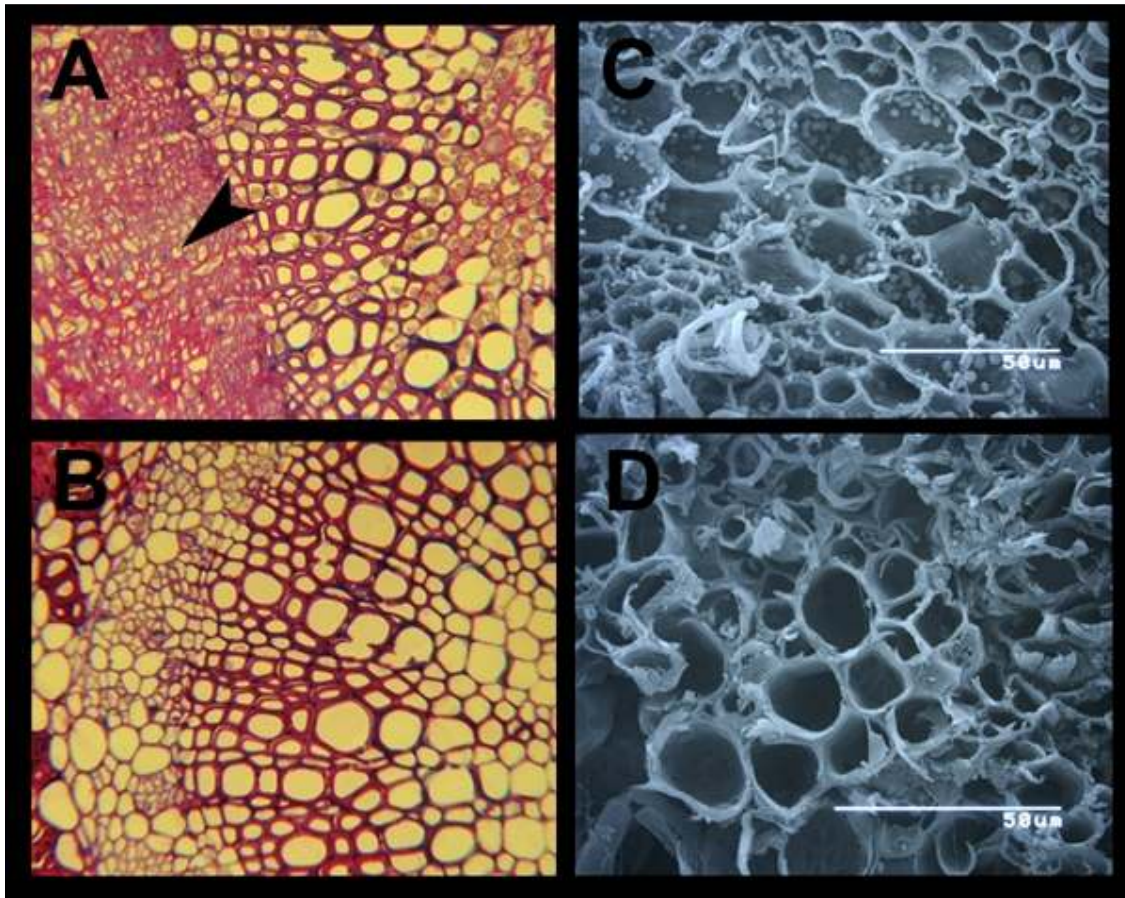


Fig. 7. Imagen de microscopia de luz visible de cortes transversales de la vena intermedia del pecíolo de hojas de cítricos infectadas con HLB (A) y hojas controles sanas (B). En (A) se observa la abundancia de granos de almidón en tejido de medula y de parénquima vascular. C y D son imágenes de microscopio electrónico de barrido de células de parénquima de corteza de hojas infectadas con HLB (C) y hojas de control sanas (D) en ambos casos son hojas de naranja dulce "Valencia".

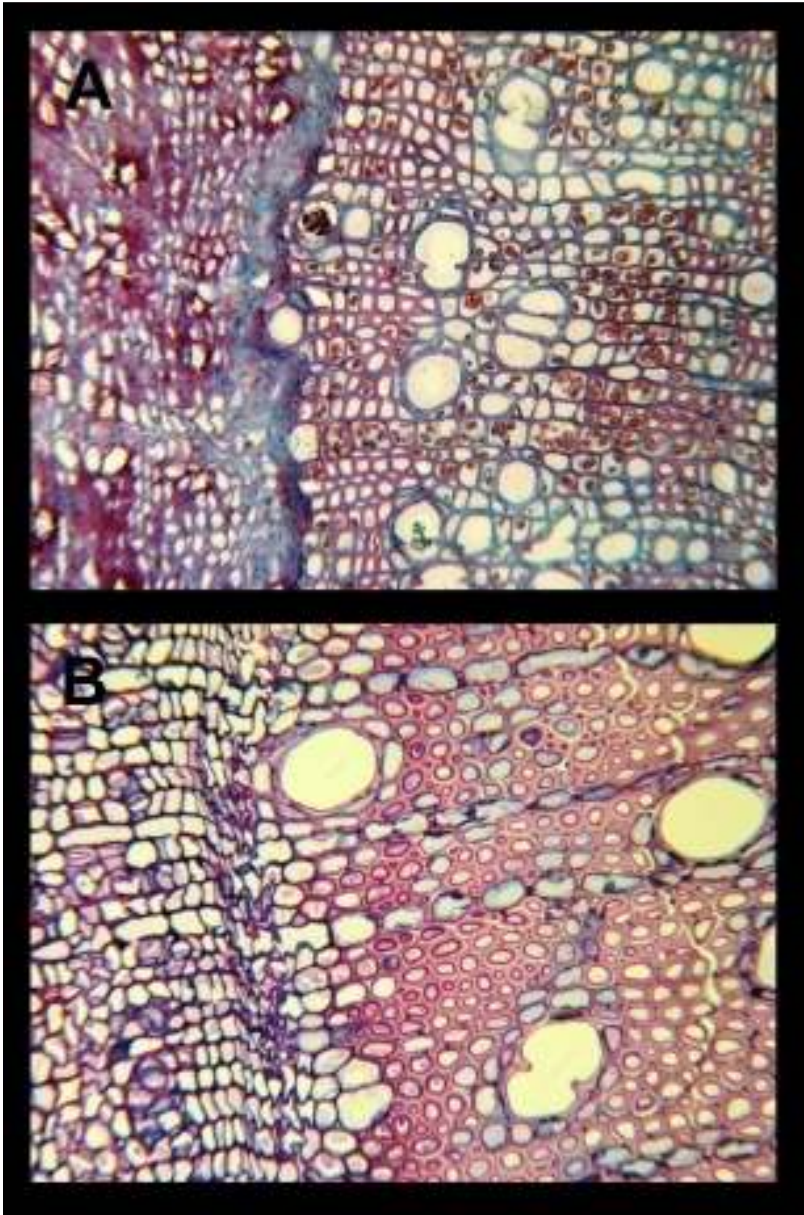


Fig. 8. Imágenes de microscopio de luz visible de cortes transversales de secciones de tallos de (A) hojas infectadas con HLB y (B) hojas de control sano de cítrico "Valencia". Tanto los granos de almidón como el colapso del floema son evidentes en la sección de tejido de tallos de hojas infectadas con HLB (A) y esto está ausente en las muestras de control sano.

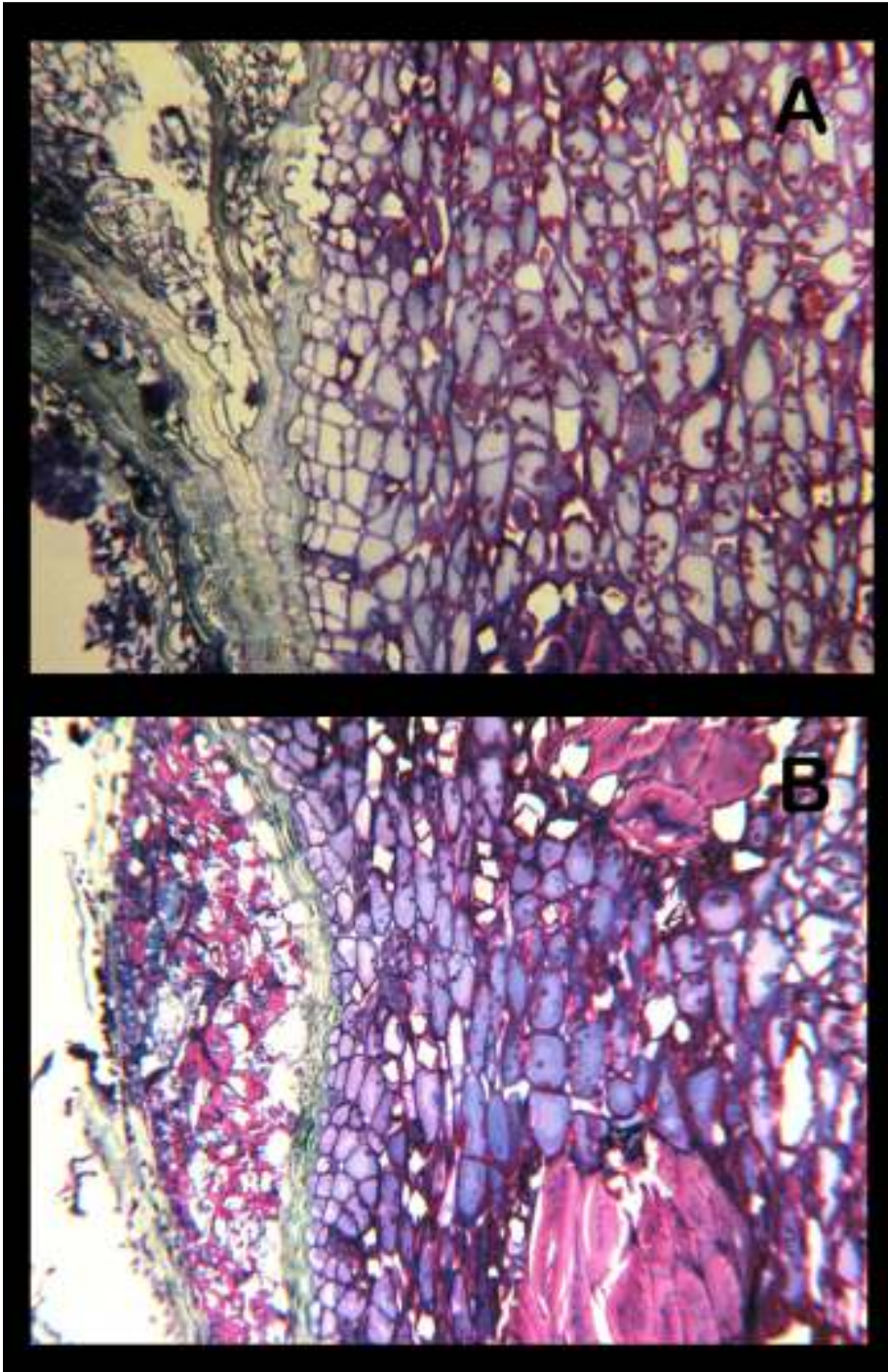


Fig. 9. Imágenes de microscopio de luz visible de corteza de tallos colectados de (A) árboles de cítricos infectados con HLB y (B) corteza de tallos de árboles controles sanos de la misma especie, naranja dulce “Valencia “. Las secciones de corteza fueron cortadas a una altura de 30 cm. por encima de la línea de injerto. Granos de almidón están presentes en ambas muestras, sin embargo son más abundantes en la muestra proveniente de árboles con HLB (A).

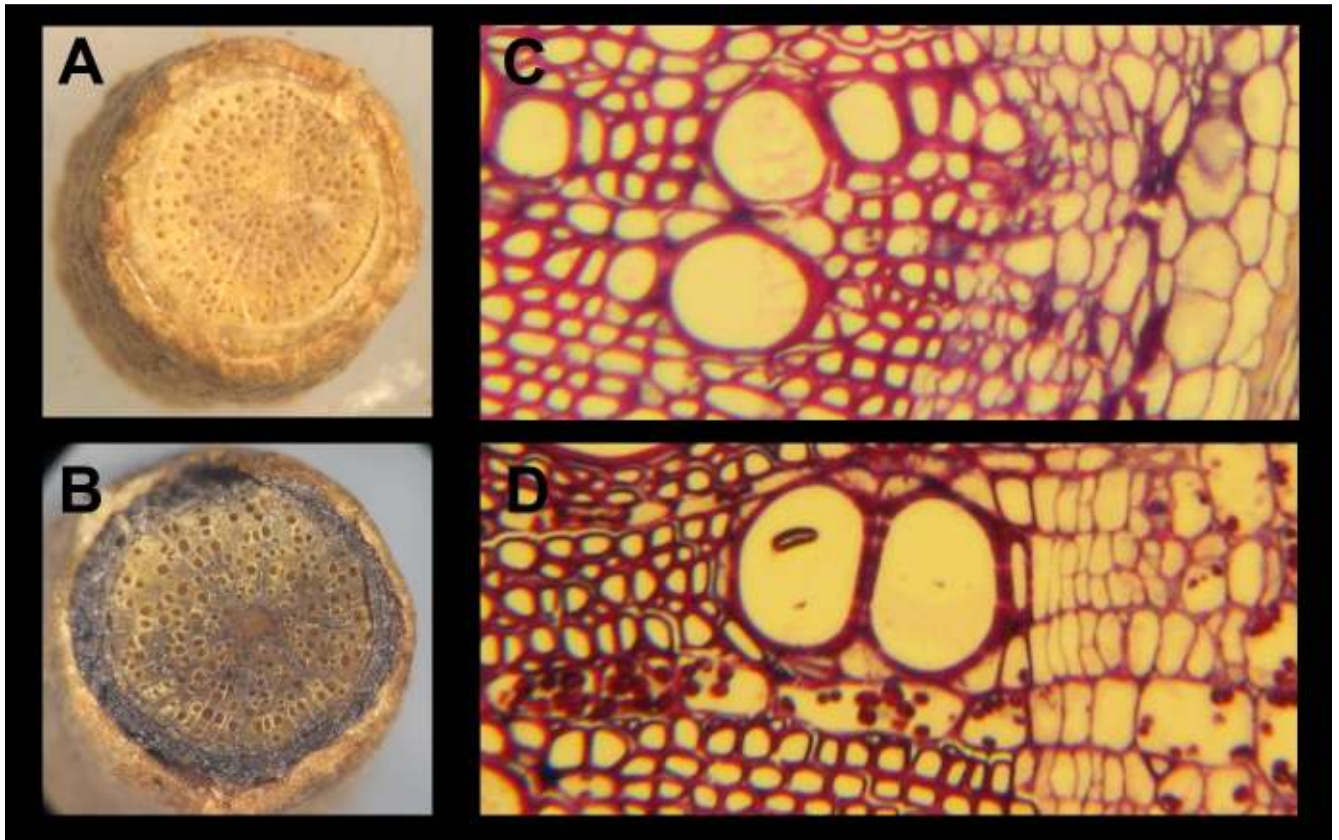


Fig. 10. Secciones de tejido de raíz cortadas transversalmente obtenidas de árboles de cítricos infectados con HLB (A) y control sano (B). Los tejidos de raíces tanto A como B fueron teñidos con una solución de yodo por 2 minutos y observados en un microscopio stereo con aumento 10X. C y D muestran las correspondientes secciones de tejido de raíz observadas en microscopio de luz visible y que muestran la ausencia de granos de almidón de reserva in la raíz de árboles infectados con HLB (C) y la abundancia de almidón en la raíz de árboles de control sanos (D).

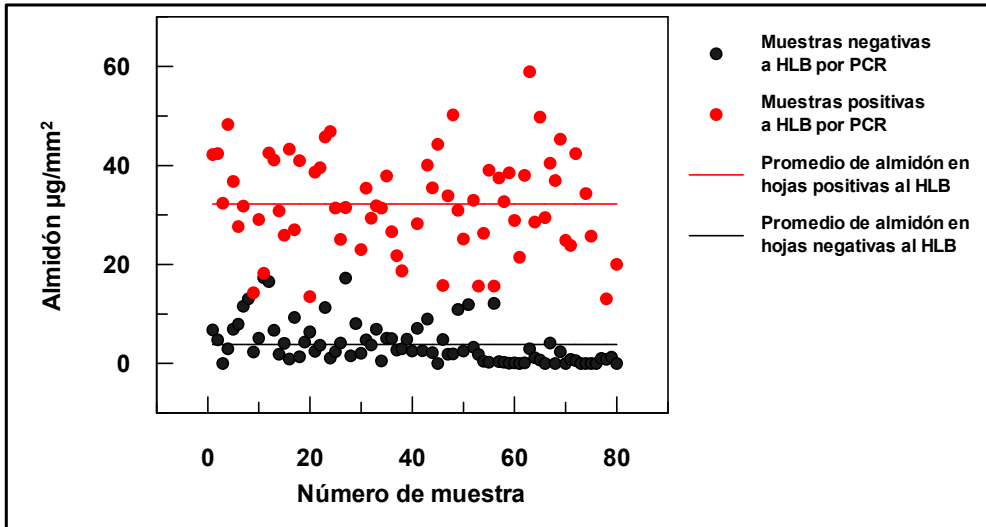


Fig. 11. Valores de contenido de almidón por área superficial de hojas provenientes de árboles con HLB confirmados por PCR (puntos rojos) y árboles controles sanos (puntos negros).