USO DE LA REACCIÓN ALMIDÓN – YODO PARA LA SELECCIÓN DE HOJAS SOSPECHOSAS CON HLB: DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA DEL ALMIDÓN EN ÁRBOLES DE NARANJA VALENCIA POSITIVOS AL HLB

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

Email: pcgo@crec.ifas.ufl.edu

UF UNIVERSITY of FLORIDA
IFAS Research
Citrus Research and Education Center

Citrus Box Tax: Life or Death for Citrus

Published: Friday, November 20, 2009 at 12:01 a.m.

TheLedger.com

"Impuesto por caja de cítrico: Vida o muerte de los cítricos"

Publicado: Viernes, Noviembre 20, 2009 a las 12:01 am

1 centavo/ caja de cítrico producida para la investigación

La seriedad del enverdecimiento de los cítricos todavía no se entiende por todos. " Los científicos tienen un máximo de 10 años para encontrar la solución o no habrá industria citrícola en la Florida".

La expanción del enverdecimiento de los cítricos o HLB, la enfermedad de los cítricos mas seria en el planeta está poniendo en riesgo una industria de $ 9.2 billones y 76,000 empleos en la Florida.

Datos cortesia de los Profesores Ronald P. Muraro y Allen Morris Univ. Florida

COSTOS DE PRODUCCION DE NARANJAS EN FLORIDA

Costos de produccion para árboles de 10 +- años de naranja

	2002-03 No HLB		2007-08 No HLB		2007-08 Presencia de HLB	
	$/Acre	% of Total	$/Acre	% of Total	$/Acre	% of Total
Control de hierba mala y Herbicidas	183.13	23.6	201.36	16.2	201.36	11.5
Fumigació de Pesticidas	137.18	17.7	175.23	14.1	422.68	24.1
Fertilizantes	140.55	18.1	413.83	33.2	413.83	23.6
Poda/ Poda de la copa del arbol	28.03	3.6	35.13	2.8	35.13	2.0
Remoción de árboles/Replantación	102.44	13.2	157.36	12.6	280.00	16.0
Irrigación y matenimiento de zanja	184.16	23.7	263.08	21.1	263.08	15.0
Manejo del HLB y Decontaminación del canker	0.00	0.0	0.00	0.0	135.63	7.7
Costos totales de producción	**775.49**	**100.0**	**1,245.99**	**100.0**	**1,751.71**	**100.0**

Costos del programa de manejo del (HLB) para Valencia Oranges

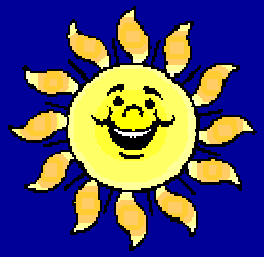
	$ Por Acre (1Acre = 0.405 hectárea)
Costo básico de mantenimiento de una huerta de árboles adultos sin HLB (Incluye decontaminacion de canker)	1,277.66
Costos adicionales por el HLB	
Fumigaciones adicionales (3 fumigaciones + Temik)	**247.45**
Exploració (4 veces / año)	**103.96**
Remoción adicional de árboles y replantación	**122.64**
Sub-Total	**474.05**
Costos de mantenimiento de huerta con HLB	**1,751.71**
Costo de árbol de vivero	$8.50 / árbol
Costos por colección, transporte y pérdidas en carretera	$2.52 / Caja

Arbol sano de naranja dulce “Valencia”

Arbol de naranja dulce “Valencia” sometido a estres hídrico

Arbol infectado con HLB en etapa avanzada de la enfermedad

FOTOSÍNTESIS

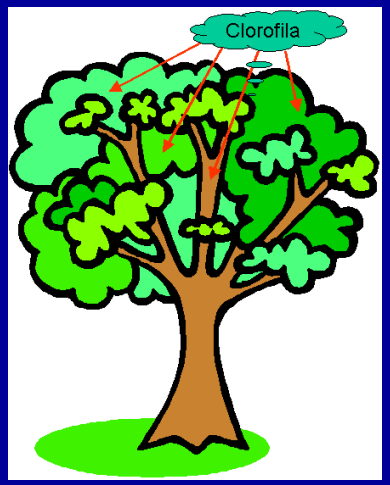


+

+

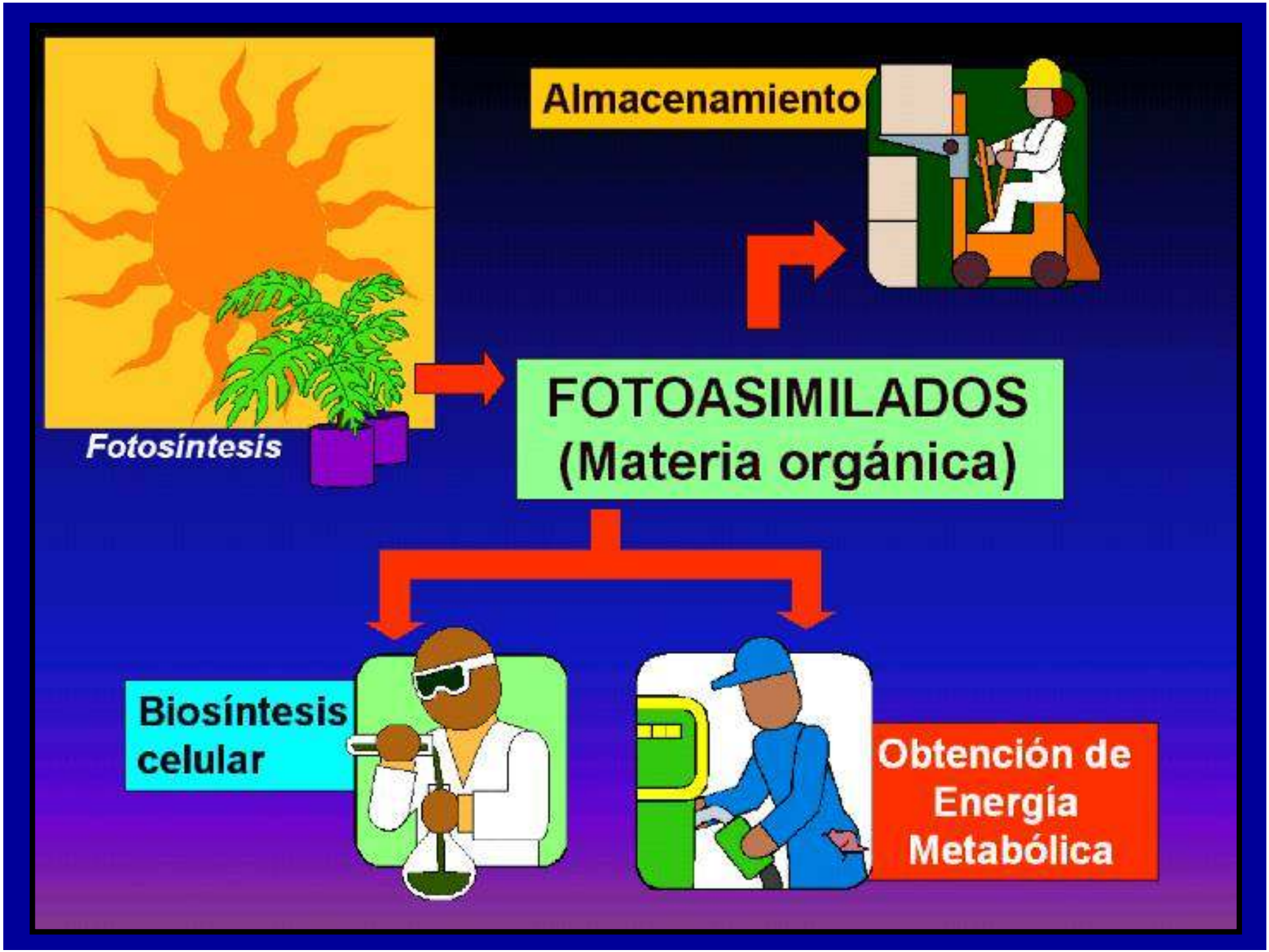
CO_2

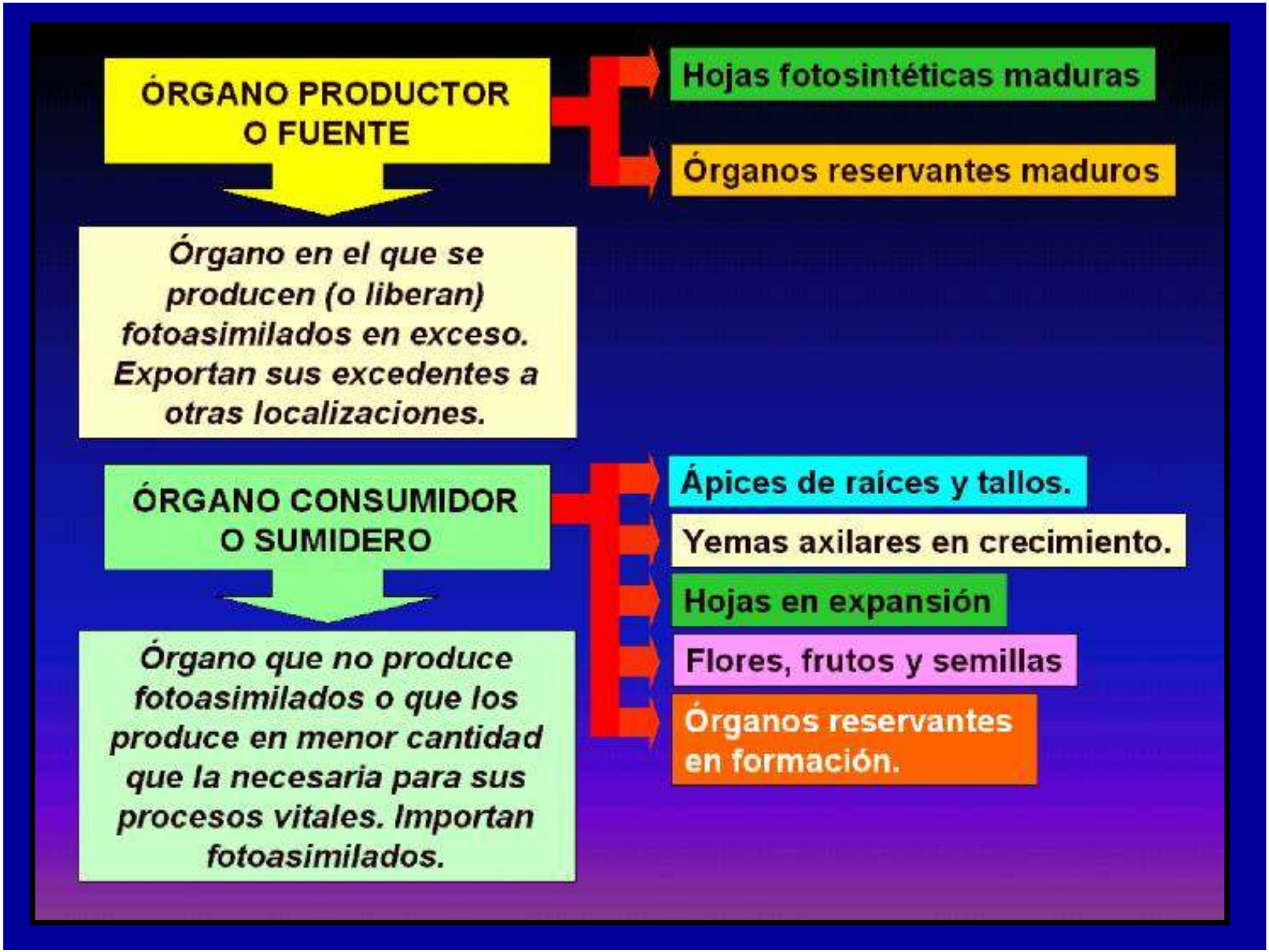
+



Glucosa + Oxígeno

Almidón para reserva y otros carbohidratos


Almacenamiento
Fotosíntesis
FOTOASIMILADOS
(Materia orgánica)
Biosíntesis
celular
Obtención de
Energía
Metabólica


ÓRGANO PRODUCTOR O FUENTE
Hojas fotosintéticas maduras
Órganos reservantes maduros
Órgano en el que se producen (o liberan) fotoasimilados en exceso. Exportan sus excedentes a otras localizaciones.
ÓRGANO CONSUMIDOR O SUMIDERO
Ápices de raíces y tallos.
Yemas axilares en crecimiento.
Hojas en expansión
Flores, frutos y semillas
Órganos reservantes en formación.
Órgano que no produce fotoasimilados o que los produce en menor cantidad que la necesaria para sus procesos vitales. Importan fotoasimilados.

El diagnóstico del HLB (huanglongbing o enverdecimiento de los cítricos) puede ser muy difícil basándose solamente en síntomas visuales de la enfermedad. Los mejores síntomas para detectar el HLB en el campo son los de manchas motedas de las hojas, aclaramiento de nervaduras así como su acorchamiento.

ANTECEDENTES EN LA LITERATURA SOBRE LA DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN EN ÁRBOLES DE CÍTRICO SANOS Y CON HLB

The simple and rapid diagnosis of citrus huanglongbing (Citrus greening) by Scratch method.

Shinji Kawano, Tetsuya Takushi, Tetsuya Toyozato, Atsushi Ooshiro, Masaya Numazawa and Keiji Yasuda
Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, Makabe 820, Itoman, Okinawa, 901-0336, Japan

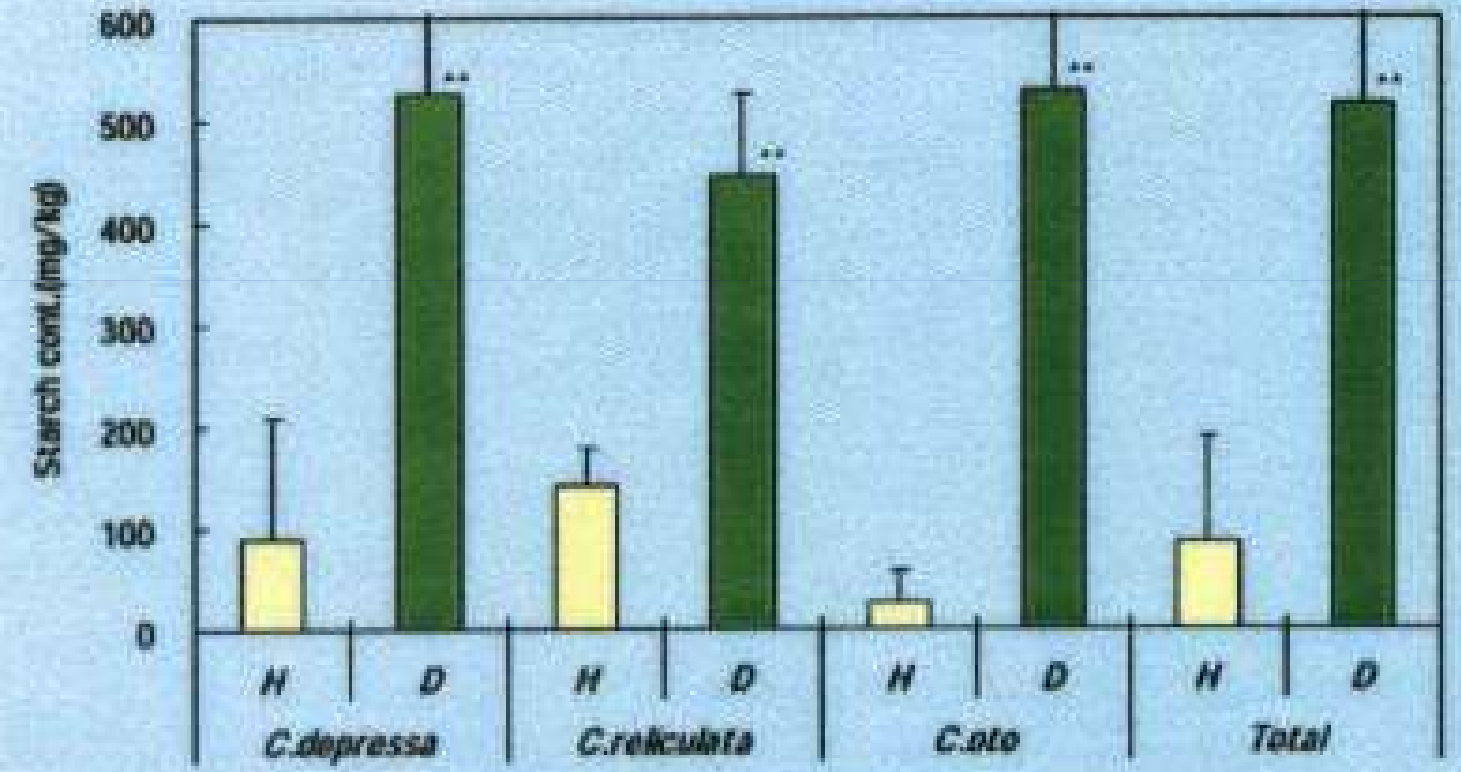
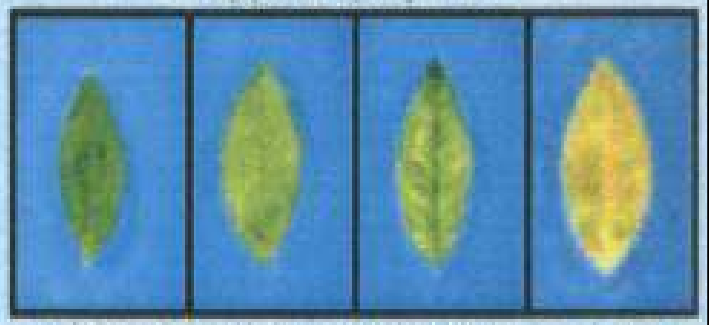


Fig. 1. Comparison of starch content in citrus leaves.
H:Healthy leaves, D:HLB infected leaves. **indicate significant differences at $P<0.01$ as determined by Welch's t-test.

1. Quantitative analysis of starch in citrus leaves.

Quantity of starch of three citrus cultivars (*Citrus depressa*, *C. reliculata*, *C. oto*) was analyzed by using colorimetric determination (Sugiyama and Ooshiro, 2001).
Citrus leaves for test were collected in several typical symptoms (Nasu *et al*, 2003).

Typical symptoms



Pale chlorosis | Mottling | Chlorosis with green netlike vein | Yellowing

2. Scratch method by Iodine-starch reaction.

Comparison of the diagnosis of field samples by Scratch method and PCR assay.

Procedure of Scratch method

1) Scratch a leaf table 20 times with a sandpaper (#120) cut in 1×2cm for sampling tissue.

2) Put the sandpaper into 1ml water in a vinyl pack, and lightly rubbed.

3) Add to 25 μl 0.05M iodine solution for dyeing starch.

4) Observation of dyeing of water solution

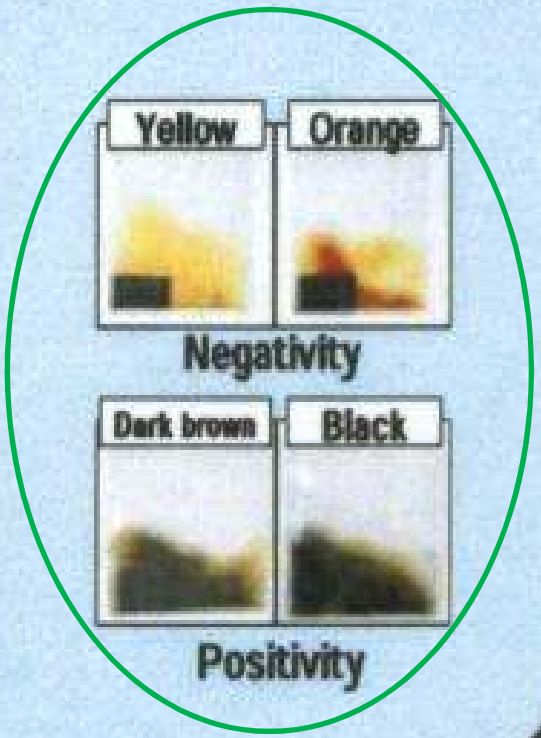


Table 1. Diagnosis of citrus huanglongbing by Scratch method and PCR on field samples from *C.tankan*

	Number of trees	Symptom[1)]	Number of leaves	Positivity(+)		Negativity(-)		Not-clear(±)		Agreement rate with PCR(%)	
				PCR	Scratch	PCR	Scratch	PCR	Scratch	Trees	Leaves
Uruma city	24	N	23	0	0	23	23	0	0	91.7	96.2
		PC	25	1	2	24	23	0	0		
		CN	23	1	1	22	22	0	0		
		Y	7	2	2	5	4	0	1		
Ishigaki city	7	N	5	0	0	5	5	0	0	100.0	90.0
		PC	8	1	1	7	6	0	1		
		M	3	3	3	0	0	0	0		
		CN	2	0	0	2	2	0	0		
		Y	2	0	0	2	2	0	0		

1)N: no symptom
PC: pale chlorosis
CN: chlorosis with green netlike vein
M: mottling
Y: yellowing

Corelación método Almidón-yodo vs PCR > 90 %

Table 2. Diagnosis of citrus huanglongbing by Scratch method and PCR on CTLV and HSVd infected leaves.

	Variety	Symptom	Sample leaves	Positivity(+)		Negativity(-)		Not-clear(±)	
				PCR	Scratch	PCR	Scratch	PCR	Scratch
HSVd leaves	*C.amakusa*	N[1)]	5	0	0	5	5	0	0
		PC	10	0	0	10	10	0	0
		Y	5	0	0	5	5	0	0
CTLV leaves	*C.reticulata*	PC	10	0	0	10	10	0	0

1)N: No symptom
PC: Pale chlorosis
Y: Yellowing

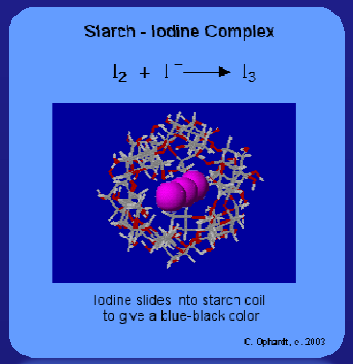
- Accuracy of the Scratch method diagnosis in field samples showed more than 90% of agreement rates to PCR assay (Table 1).
- Scratch method did not show HLB positive reaction in another diseased leaves, *Citrus tatter leaf virus* and *Hop stunt vriod* (Table 2).

Resultado del método de raspado con lija de hojas sanas y hojas con HLB después de introducir la lija con el raspado de la roja en una bolsa plástica con la solución de yodo 0.2 %

Hoja HLB positiva

Hoja sana

MÉTODO VISUAL PARA LA DETECCIÓN DE ALMIDÓN EN DIFERENTES PARTES DEL ÁRBOL DE CÍTRICO BASADO EN LA REACCIÓN ALMIDÓN-YODO



Hoja de árbol Sano

Hoja de árbol con HLB

Solución comercial de yodo 0.2% o solución ($KI + I_2$) preparada en laboratorio (KI= 8.8 g/L, I_2= 2.2 g/L)

Arbol sano

Arbol HLB +

Cortes de hojas sumergidos en 0.2% yodo por 1.5-2 min

Sección de hoja con vena principal + yodo

Arbol sano

Arbol HLB +

Sección del peciolo de las hojas + yodo

Arbol sano

Arbol HLB +

Sección de tallos de tamaño medio + yodo

Arbol sano

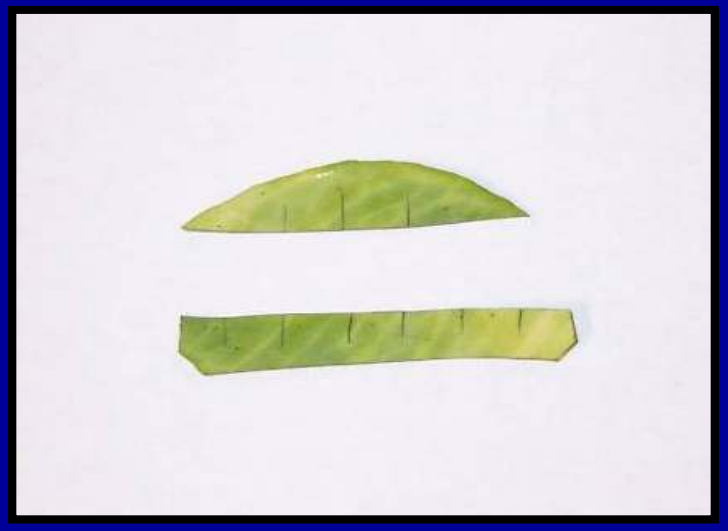
Arbol HLB +

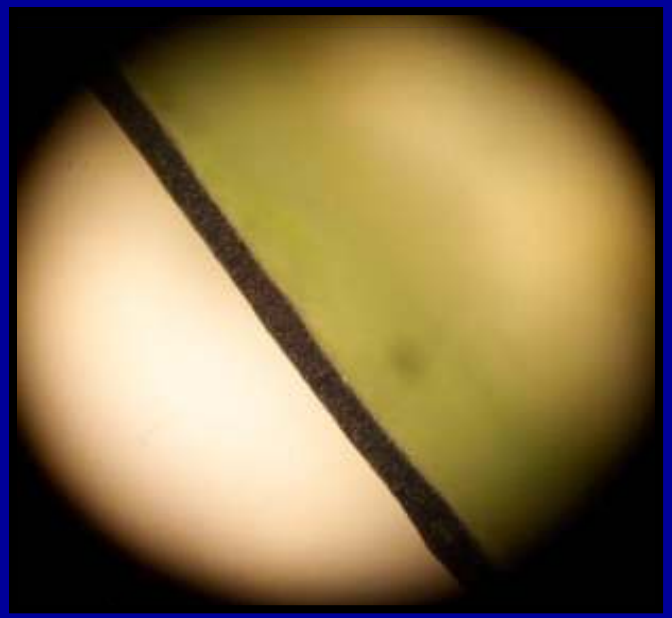
Raices de cítricos + yodo

Arbol sano

Arbol HLB +

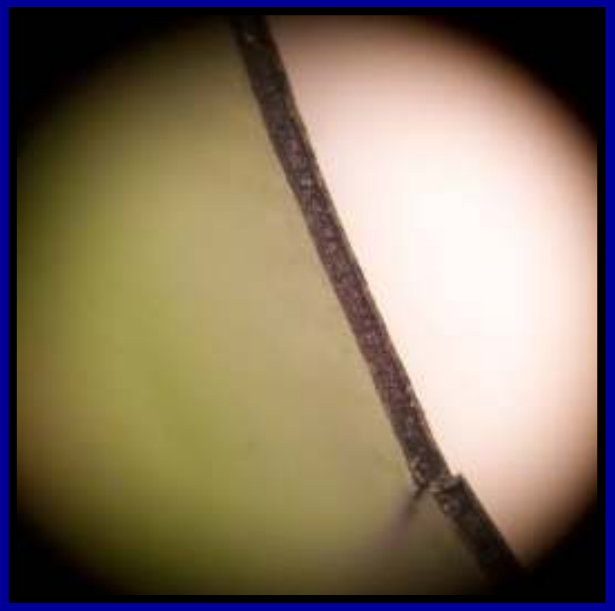
Muestra TS2 : Navel Swingle, Immokalee, N-5 Parcialmente soleada, NE.





Resultado: Método almidón: +++++ PCR: 23.02 +

Muestra TS4: Valencia, 80-8, Immokalee, N-5, Soleada, N-W



Resultado: Método almidón: ++++ PCR: 25.04 +

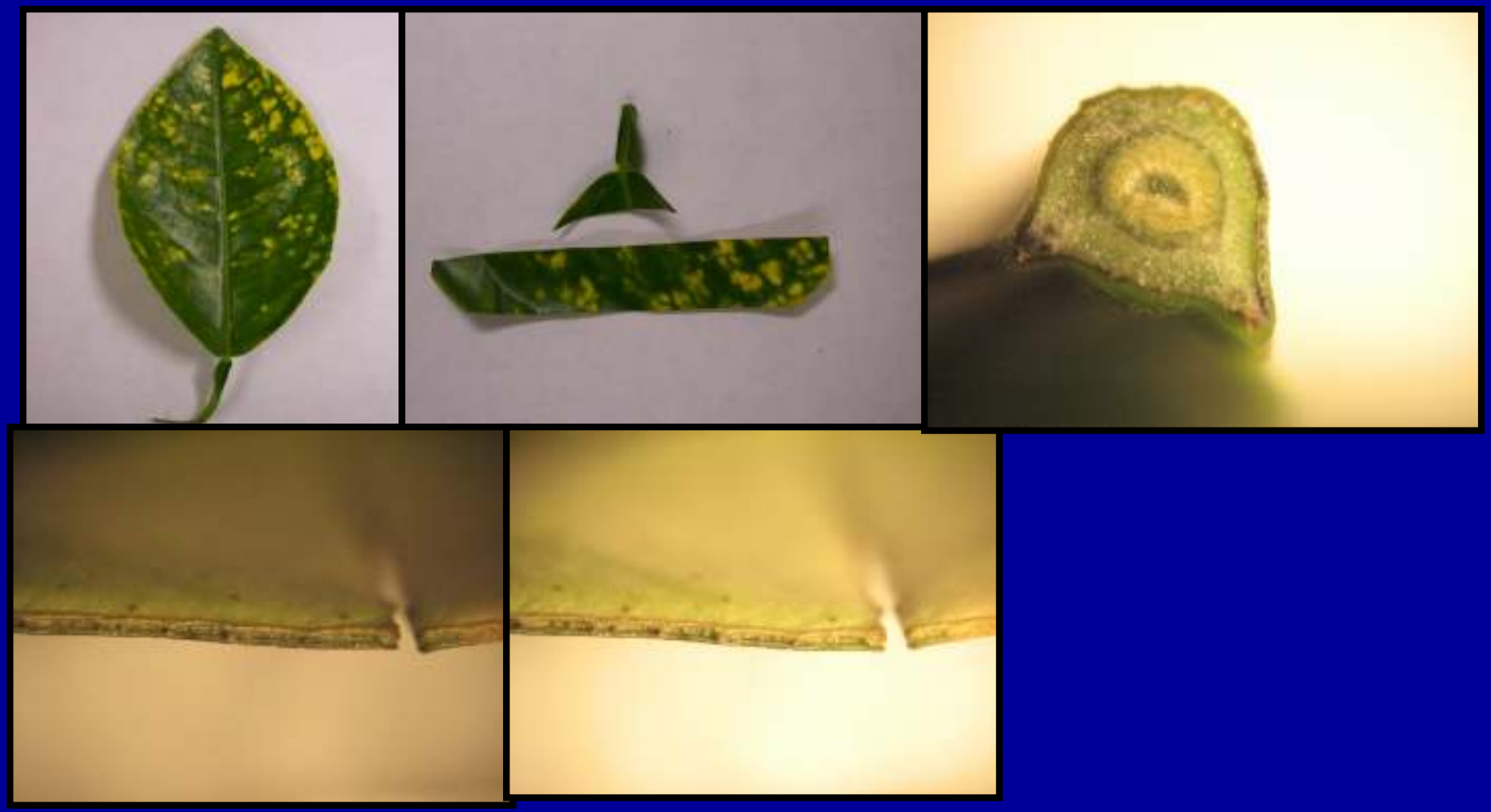
Muestra : Rhode Valencia Swingle, Immokalee, West, N-5

Resultado: Método almidón: ++++ PCR: 25.78 +

Muestra de hojas de un árbol con deficiencias nutricionales y su reacción al yodo

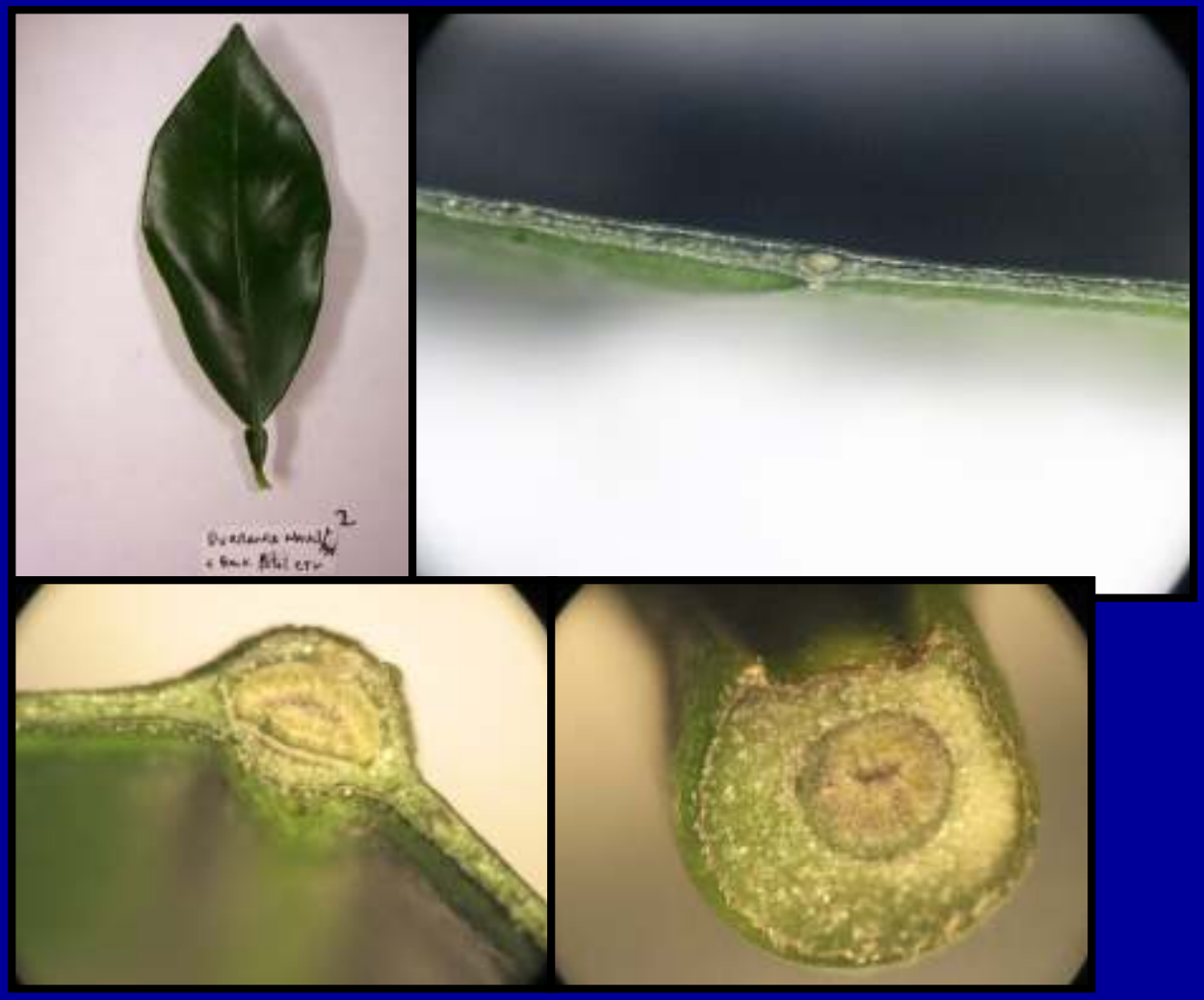
Resultado: Método almidón: negativo PCR: negativo

Muestra de hojas de un árbol con deficiencias nutricionales y su reacción al yodo



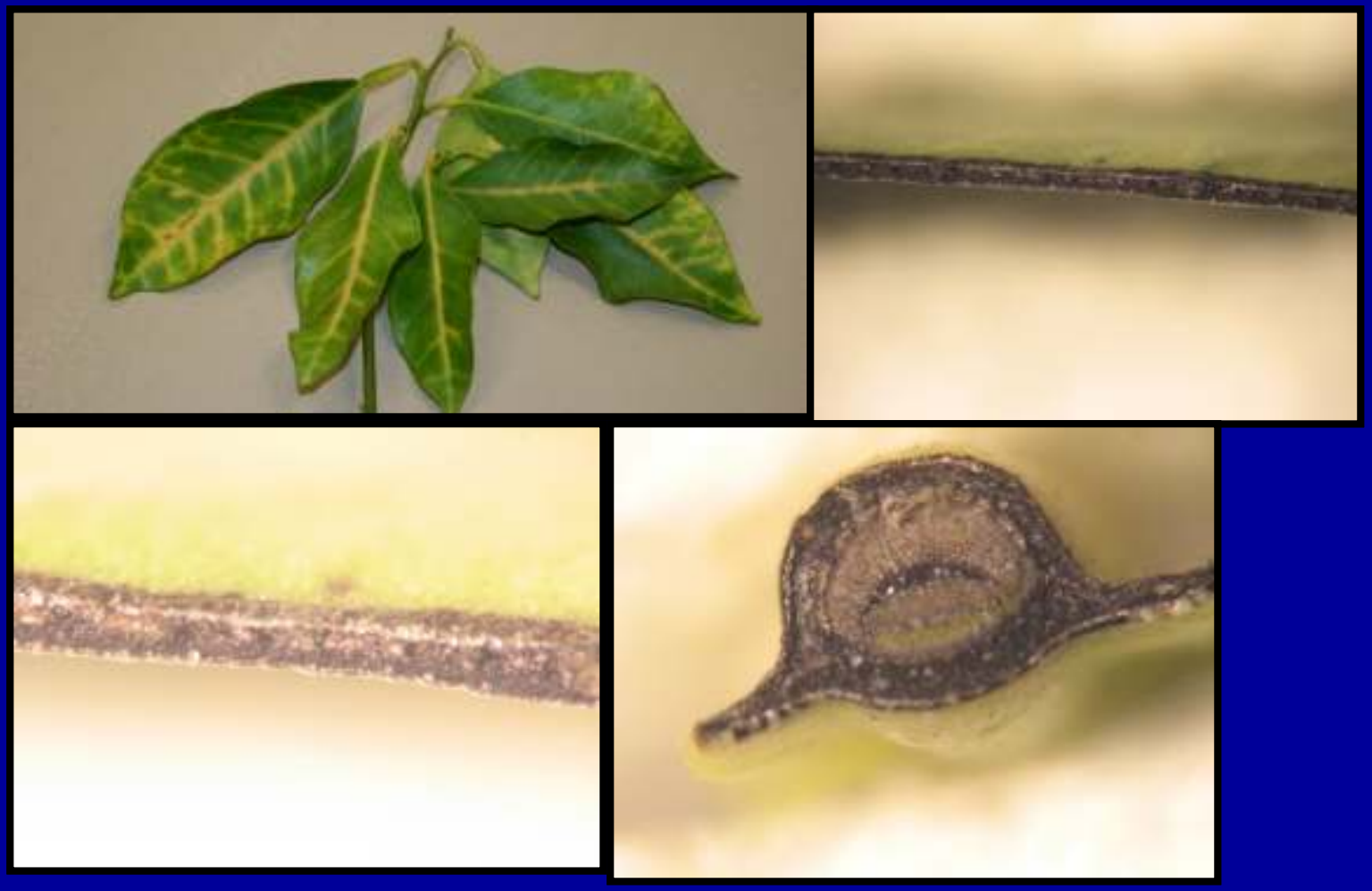
Resultado: Método almidón: negativo PCR: negativo

Muestra de hojas de un árbol VTC positivo y su reacción al yodo



Resultado: Método almidón: negativo PCR: negativo

Muestra de hojas de un árbol con rama partida o quebrada y su reacción al yodo



Resultado: Método almidón: +++ PCR: negtivo

Muestra : Valencia Swingle, CREC control negativo

Resultado: Método almidón: Negativo PCR: Negativo

ESTUDIOS CON DIFERENTES TIPOS DE MICROSCOPÍA PARA LA LOCALIZACIÓN DEL ALMIDÓN EN DIFERENTES PARTES DEL ÁRBOL DE NARANJA VALENCIA

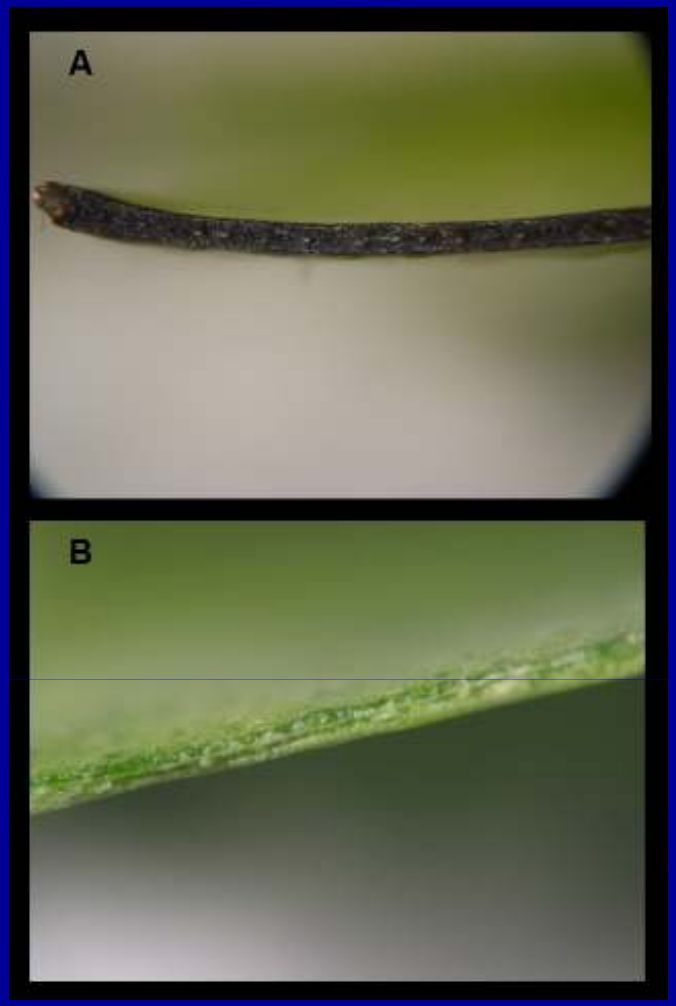
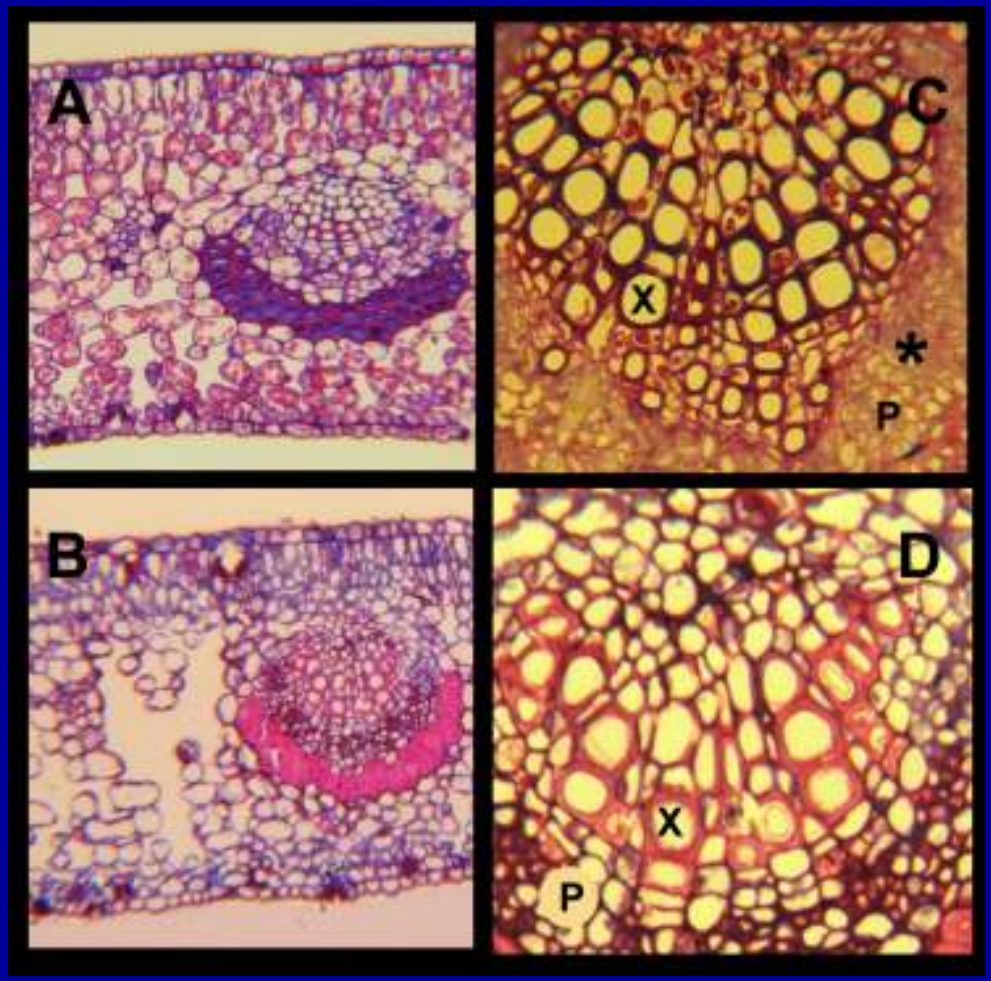
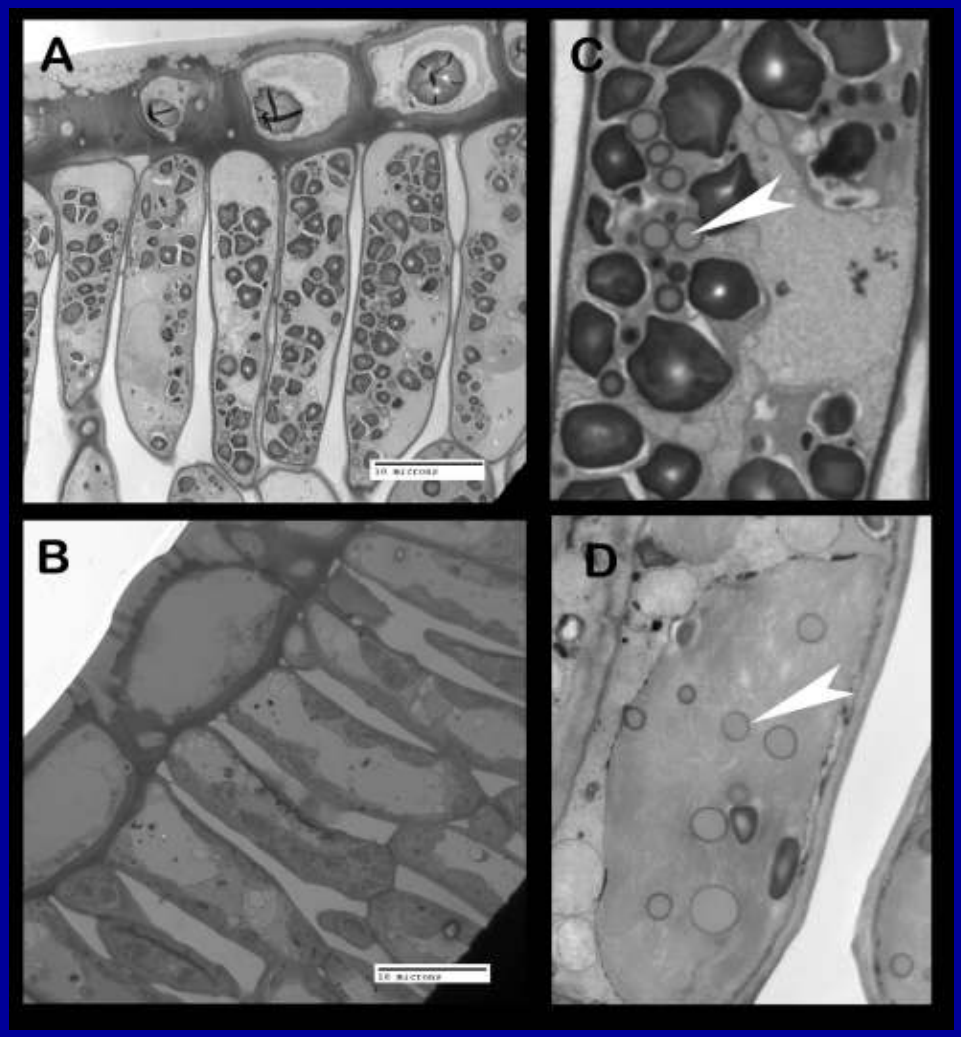


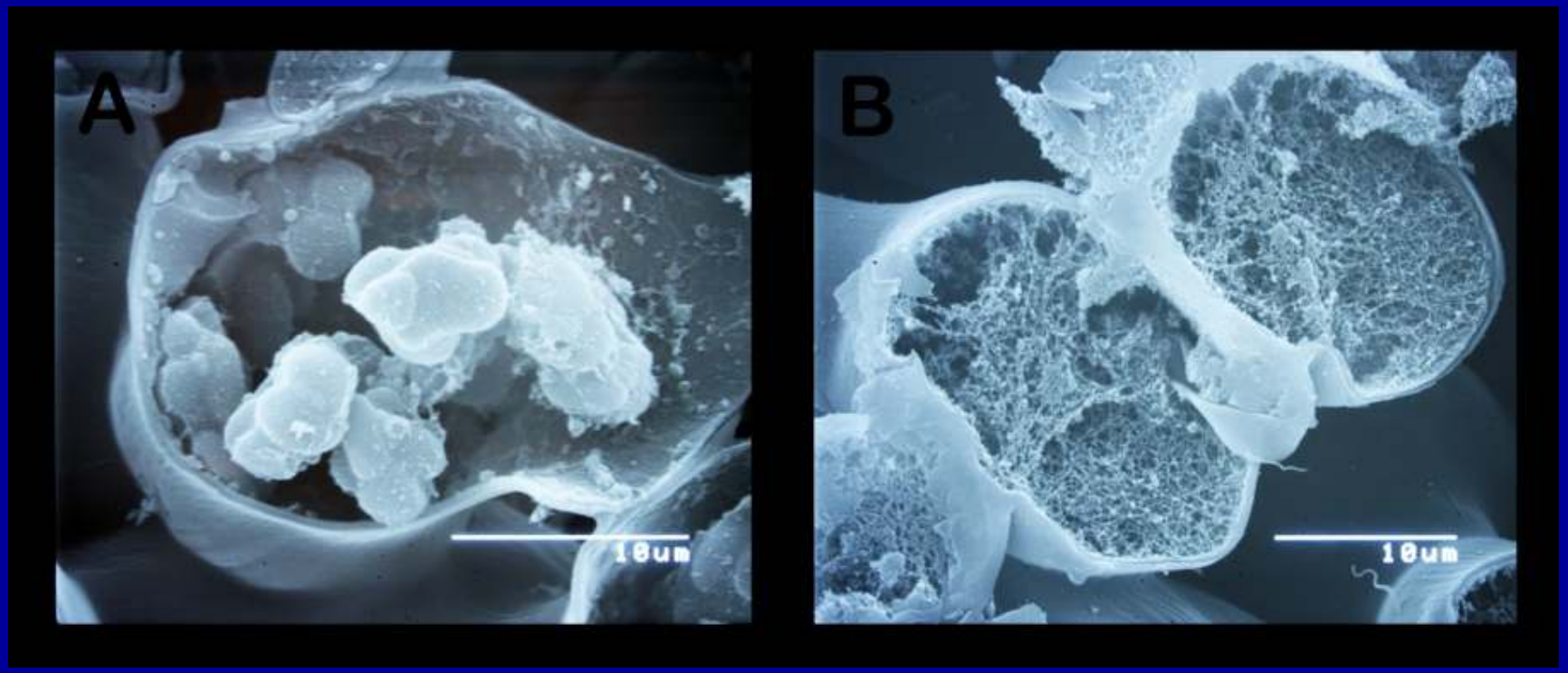
Imagen tomada con microscopía de luz visible de un corte transversal de una hoja de naranja dulce "Valencia" infectada con HLB (A) y una hoja de un árbol control sano de la misma especie (B) después de sumergidas en yodo 0.2% por 2 minutos .



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. C y D son imágenes magnificadas de tejido vascular secundario de A y B respectivamente. En ellas de observa la acumulación de almidón en el tejido vascular parenquimatoso y el floema colapsado (*) característico de células infectadas con HLB.

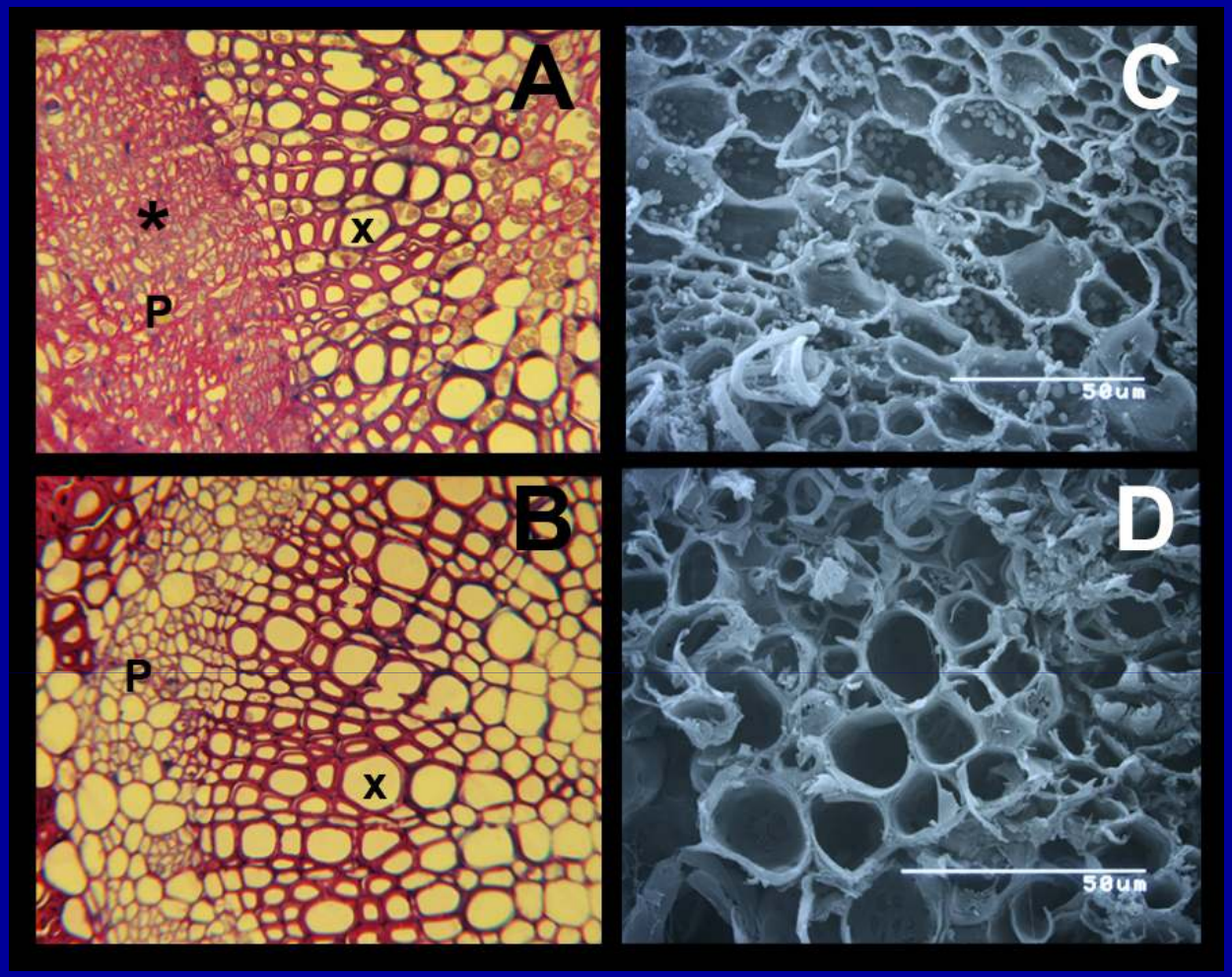


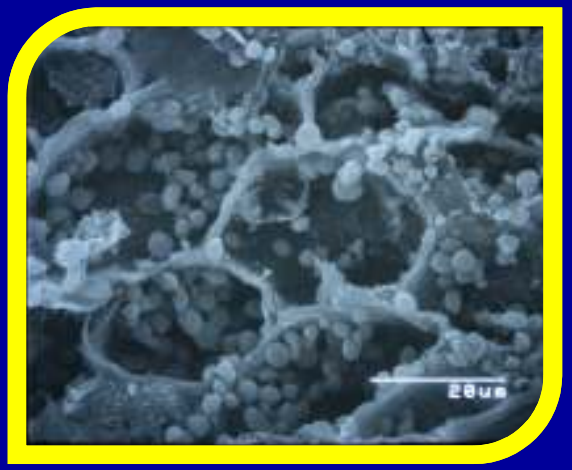
Imágenes de microscopio electrónico de tejido parenquimatoso empalizado de hoja (A) infectada con HLB y control sano (B). C y D son imágenes magnificadas de A y B respectivamente mostrando las diferencias en el contenido de almidón y lípidos. Las flechas indican cuerpos lípidos.



Granos de almidón

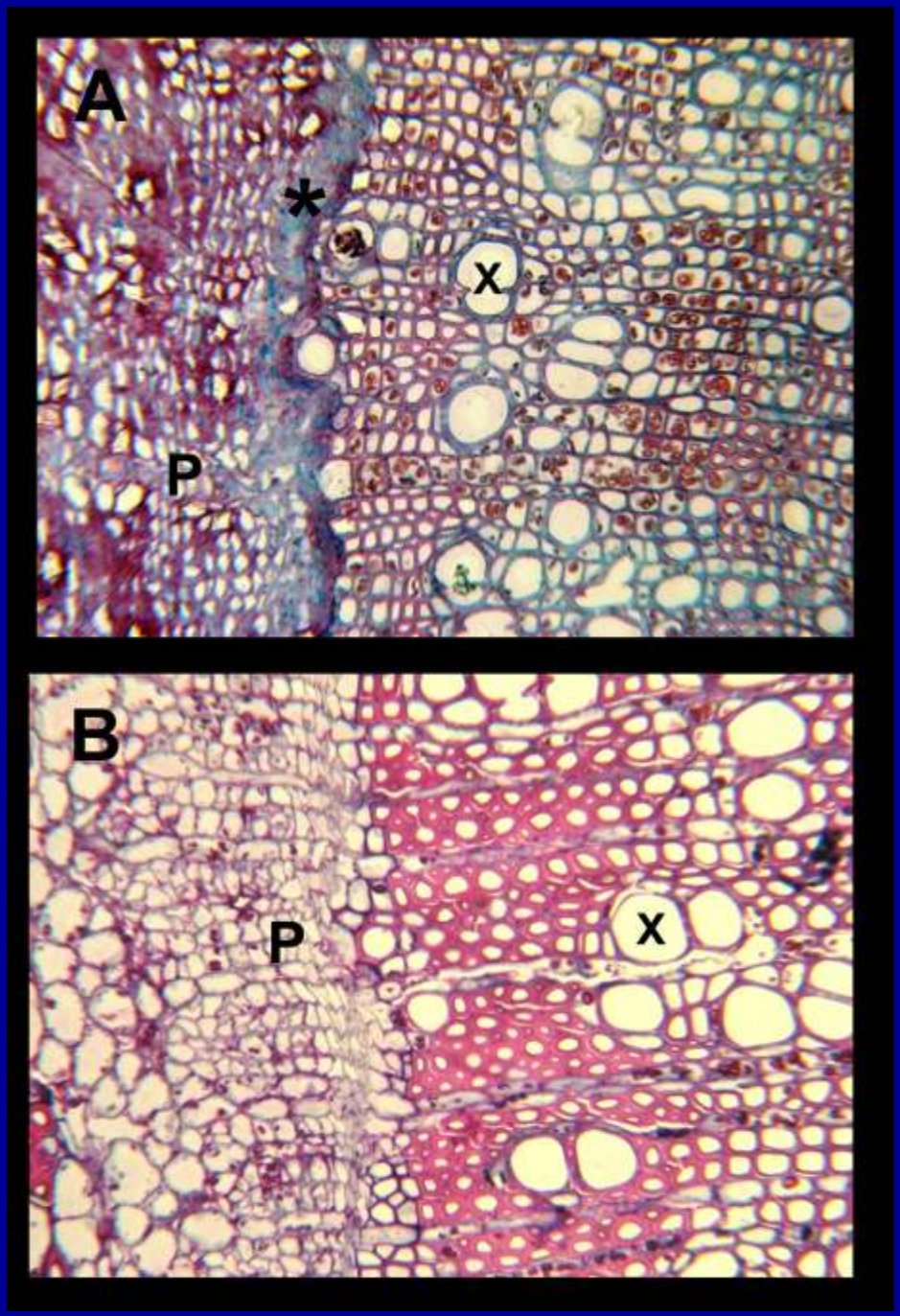
Imágenes de microscopio electrónico de barrido, de células empalizadas de hojas de cítricos (A) as infectadas con HLB y (B) hojas de controles sanos. Se nota claramente los granos de almidón en las células de hojas con HLB (A) y la naturaleza fibrosa de las hojas de control sanas.



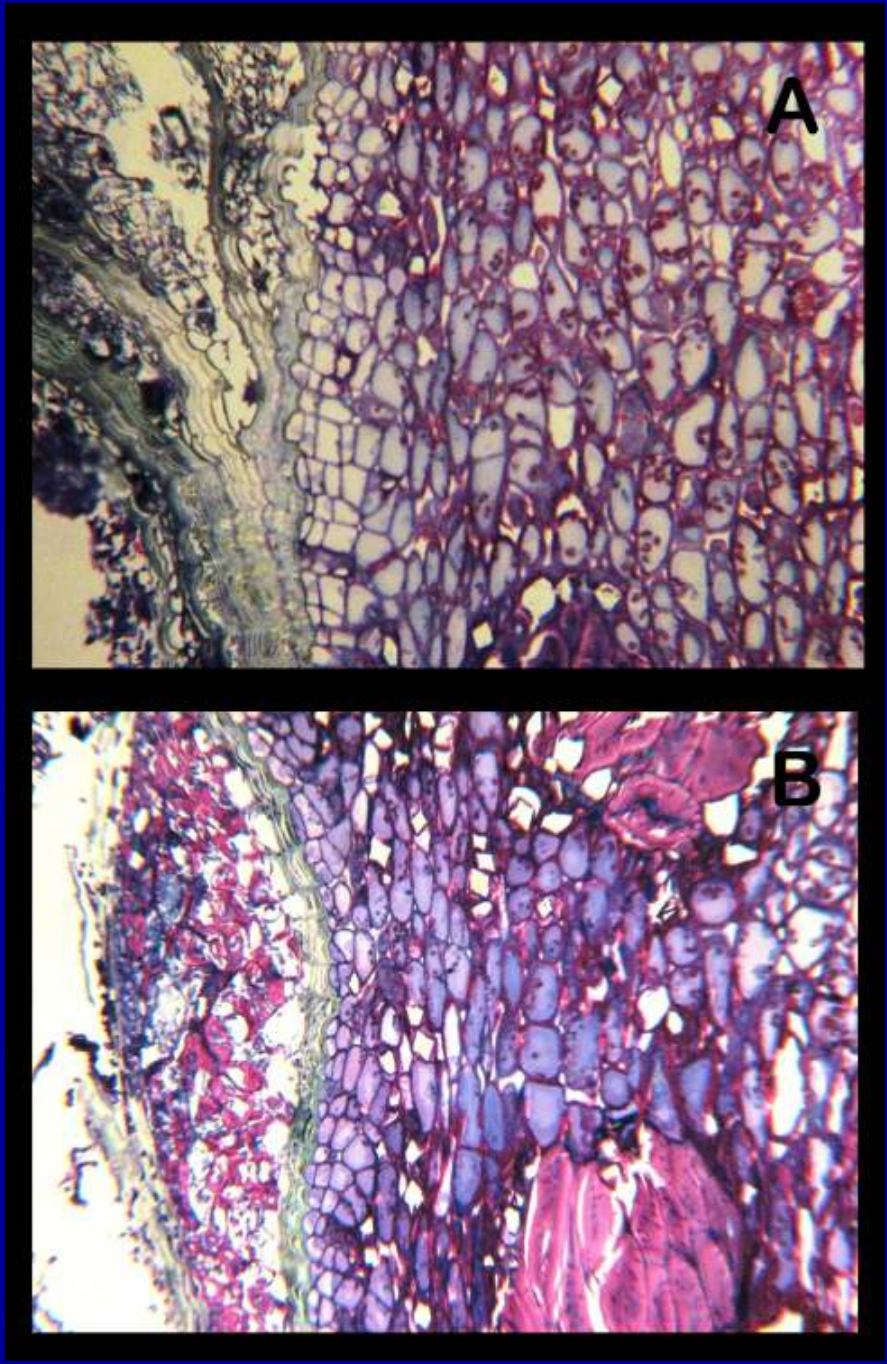


C-1

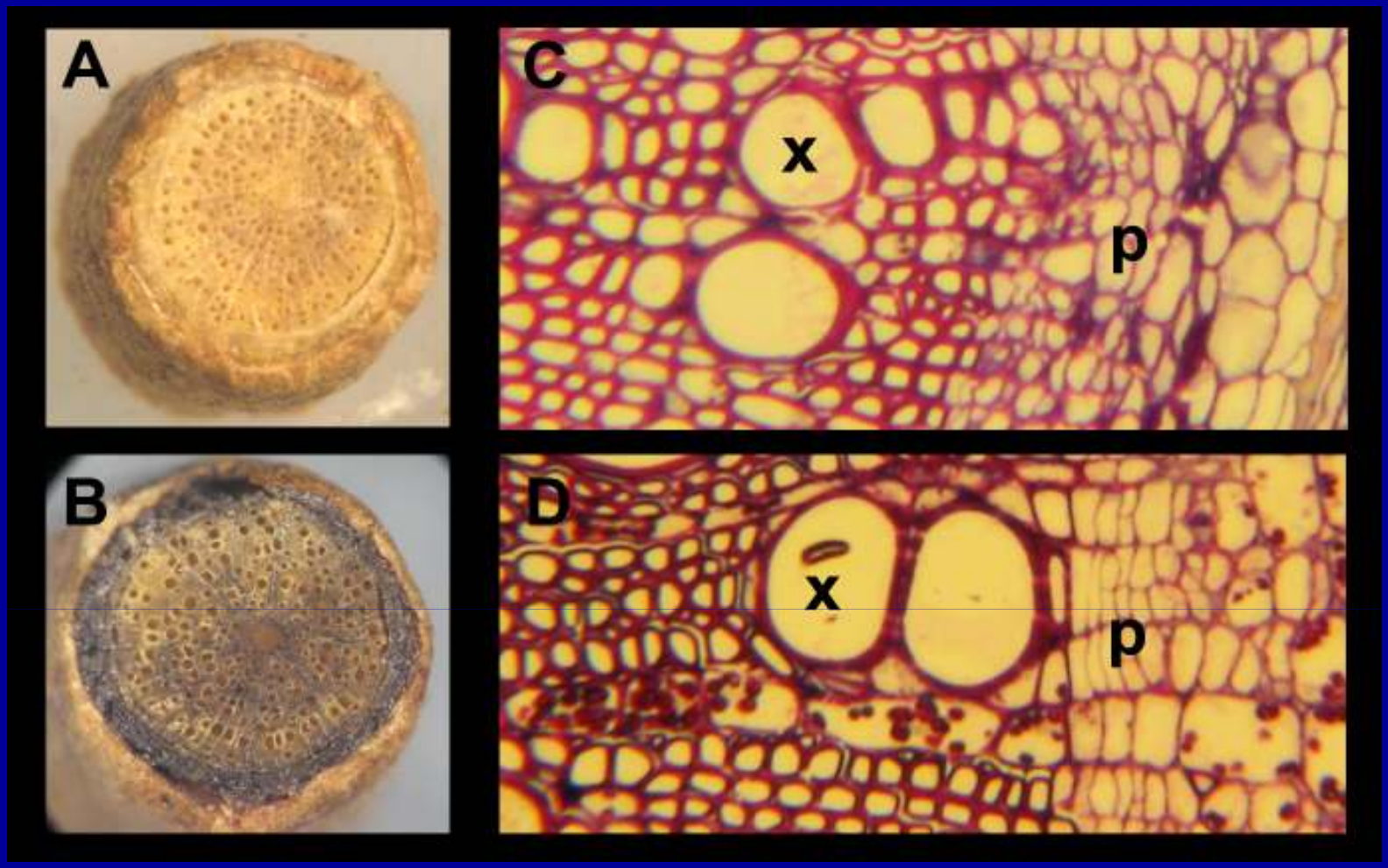
Imagen de microscopía de luz visible de cortes transversales de la vena del peciolo de hojas de cítricos infectadas con HLB (A) y hojas controles sanas (B). En (A) se observa la abundancia de granos de almidón en tejido de médula y de parénquima vascular. C y D son imágenes de microscopio electrónico de barrido de células de parénquima de corteza de hojas infectadas con HLB (C, C-1) y hojas de control sanas (D) .



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 esta ausente en las muestras de control sano.



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).



Secciones de tejido de raíz cortadas transversalmente obtenidas de árboles de cítricos infectados con HLB (A) y control sano (B). (A y B + yodo). 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).

- Las hojas o ramas de árboles infectados con HLB acumulan niveles de almidón muy por encima de los niveles normales en hojas sanas, sucediendo lo contrario en las raíces .

- Cuando el almidón se mezcla con el yodo en agua, inmediatamente se forma con complejo almidón/yodo coloreado intensamente en color azul-violeta.Por consiguiente niveles altos de almidón en hojas pueden ser visualizados usando esta reacción.

- El floema de las hojas con alta acumulación de almidón aparece colapsado.

SELECCION DE LAS HOJAS PARA EL ANALISIS DE ALMIDON

La selección de las hojas es un paso crucial en este proceso. De la misma forma que enviar cientos de hojas para analisis de PCR es ineficiente, para el análisis del almidón es también ineficiente el envio de hojas cuyos síntomas facilmente pueden ser determinados como la causa de otras enfermedades que no son HLB.

Nosotros recomendamos los siguientes criterios para la selección de la hojas:

- Seleccionar las hojas que muestran síntomas severos de HLB evitando tomar hojas con síntomas relacionados a otras enfermedades, como por ejemplo, deficiencias nutricionales.

- Seleccionar hojas de ramas sin deterioro físico, o sea ramas partidas o con daños en la corteza aún si no tienen HLB.

- Las hojas que estan en las partes mas soleadas del árbol son mejores, tratar de no tomar hojas de las partes del árbol expuestas mayormente a la sombra .

- Analizar varias hojas que muestren síntomas similares.

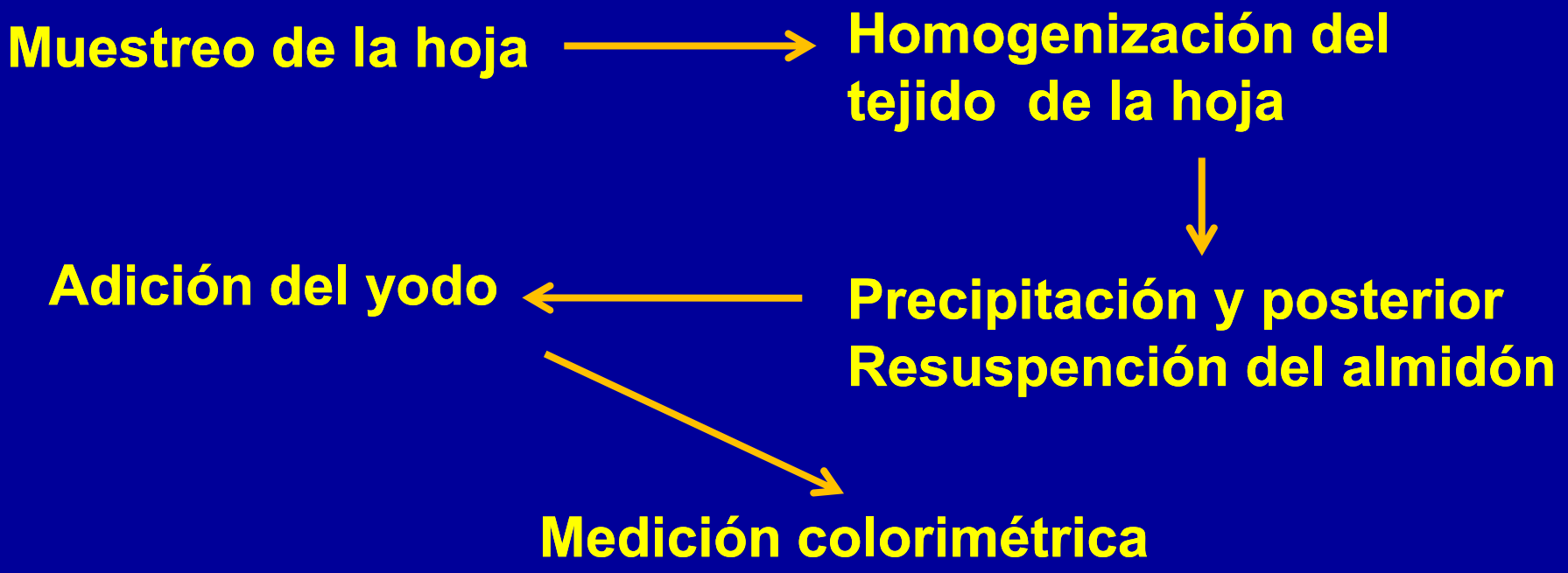
Por favor notar que:

La infección por HLB no es la única causa que puede inducir acumulación anormal de almidón en hojas de cítricos. Algunas especies (ejemplo Murcott) contienen niveles de almidón en las hojas algo superior a otras especies de cítricos.

Daños físicos en la planta ejemplo (daños en forma de anillos en la corteza o girdling, ruptura de ramas, picadas de insectos) , que interumpan el transporte de azúcares o fotasimilados en la planta pueden inducir una acumulación excesiva de almidón en las hojas de cítricos.

Enfermedades como Phytophtora , Virus de laTristeza y Declinamiento (Blight) pudieran inducir una acumulación de almidón execesiva en hojas de cítricos, aunque datos preliminares no mostraron correlación en este aspecto.

DISEÑO DE UN MÉTODO CUANTITATIVO PARA DETERMINACIÓN DEL ALMIDÓN, EN GRANDES CANTIDADES DE MUESTRAS DE HOJAS DE CÍTRICOS EN EL LABORATORIO, LOS NIVELES NORMALES DE ALMIDÓN EN HOJAS SANAS PUEDEN VARIAR LIGERAMENTE DE ACUERDO A LA VARIEDAD DE CÍTRICO ANALIZADA.

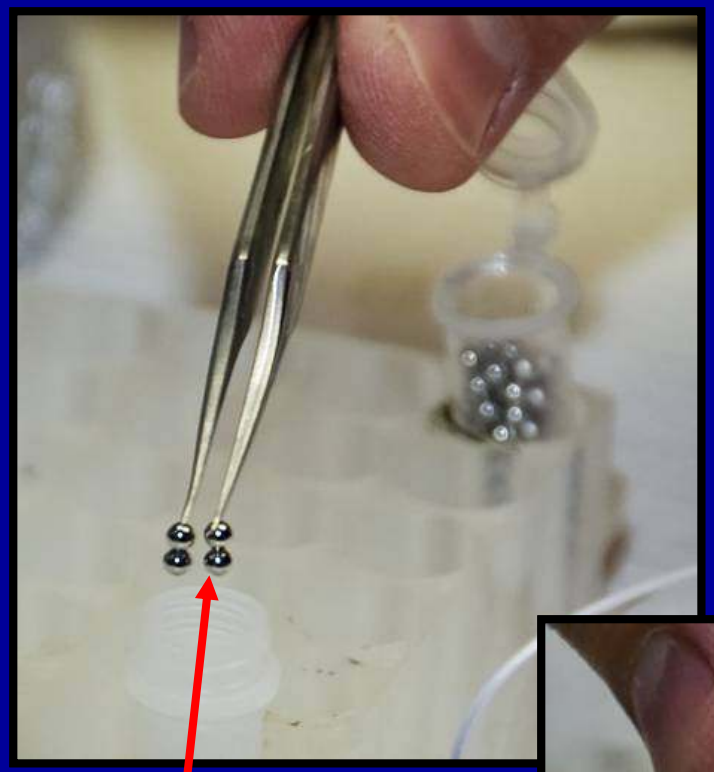


Método cuantitativo de determinación de almidón en hojas de cítricos

1 disco de la hoja

Homogenizador

Muestra de tejido de la hoja en forma de disco para la homogenización



Bolas de metal 3.8 mm

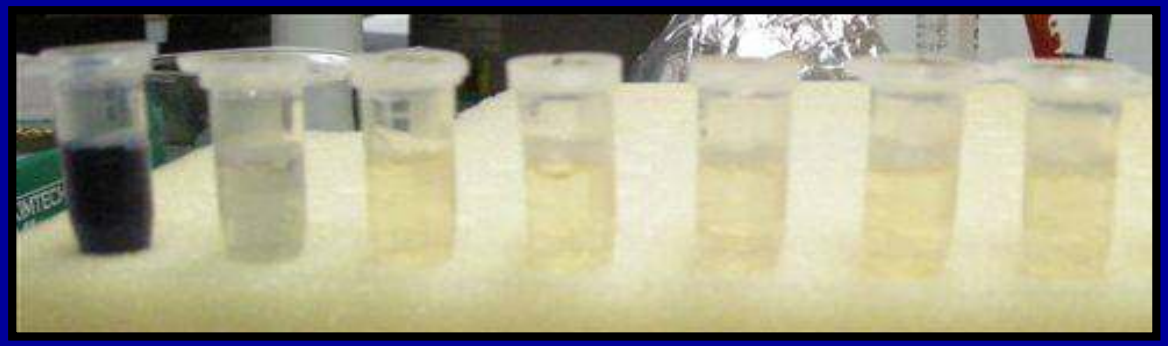
Tejido después de homegenizado

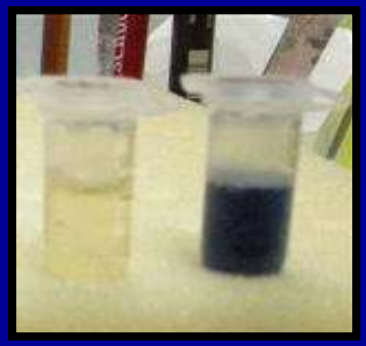
Color de la reacción del almidón de la hojas con yodo, después de extraído, precipitado y homegenizado en agua, notese diferencia en intesidad del color azul-violeta para diferentes muestras.

Micro-Plato de Elisa para la lectura colorimétrica a 595 nm

λ maxima espectro absorbción de diferentes almidones: papa = 580 nm, trigo = 620 nm, maíz = 609 nm, arróz = 601 nm, hoja cítrico = 592 nm

(Control -) (Control +HLB)



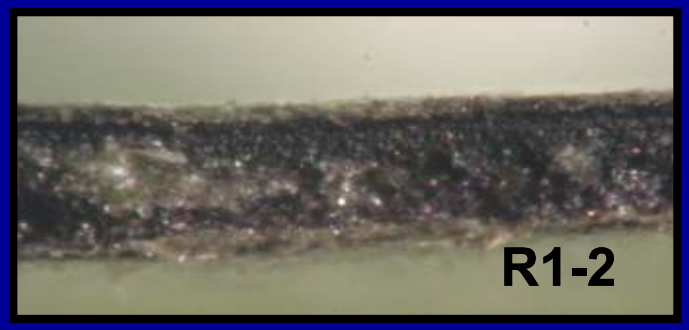


Reacción almidón / yodo de hojas con HLB, y otras enfermedades, No 6 = hoja de árbol con deficiencia en Zn, muestras de árboles con CTV y Blight han dado negativas a altos contenidos de almidón.

Muestras de *Citrus* aurantifolia (Lima Persa) del Sur de la Florida confirmadas como positivas al HLB por PCR

Real time PCR = 28.09 positivo

Almidón = 34.48 µg/mm²



Almidón = 42.12 µg/mm²

Valor promedio almidón= 38.3 µg/mm²

Muestras de *Citrus* aurantifolia (Lima Persa) del Sur de la Florida confirmadas como positivas al HLB por PCR

Real time PCR = 28.27 positivo

Almidón = 28.95 µg/mm^2

Almidón = 15.42 µg/mm^2

Valor promedio almidón= 22.19 µg/mm^2

Muestras de *Citrus* aurantifolia (Lima Persa) del Sur de la Florida Confirmadas como positivas al HLB por PCR

Real time PCR = 32.92 Línea borde

Almidón = 8.68 µg/mm²

Almidón =1.94 µg/mm²

Valor promedio almidón= 5.31 µg/mm²

CONCLUSIONES

- Los datos presentados respaldan la noción de que los cambios sustanciales en la distribución de los carbohidratos a través del árbol de cítrico puede ser no sólo el resultado de la infección con HLB, si no que por si misma la causa del rápido declinamiento y posterior muerte del árbol infectado.

- La acumulación de almidón en árboles con HLB ha sido observada prácticamente en todas las células vivas de las partes aéreas del árbol, denotando una redirección clara del transporte de los carbohidratos.

- Los resultados obtenidos de la medición cuantitativa y visual del complejo amidón / yodo, en hojas sanas e infectadas con HLB nos brinda una herramienta adicional para la selección de muestras debido a su alta correlación (90%) con el método oficial de detección PCR.

GRACIAS !!