

Detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en diferentes partes de plantas de cítricos (*Citrus* spp., Rutaceae).

Xiomara A. Cayetano, Andrea O. Feliz, Deysi M. Hernández, Yara Y. de la Rosa, Luis A. Matos

Centro de Tecnologías Agrícolas (CENTA)-IDIAF

VI Congreso SODIAF

REPUBLICA DOMINICANA
Octubre-24, 2013.

Introducción

- **Huanglongbing de los cítricos**

El HLB es actualmente la principal enfermedad del cultivo de los cítricos, la cual está afectando la citricultura a nivel mundial.

- Asociada a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, (CLas), *C. L. africanus*, (CLaf) *C. L. americanus* (CLam).

- Transmitida por injertos y *Diaphorina citri*, (Hemiptera: Psyllidae) en Asia, América y *Tryoza erytreae* en África.

Introducción

Huanglongbing de los Cítricos (HLB)

- CLas afecta el sistema vascular provocando el declinamiento de las plantas afectadas, convirtiéndolas en improductivas.
- CLas no es sostenible en medios de cultivos artificiales, no tiene cura la enfermedad que produce.
- En República Dominicana se han eliminado más de 55 mil árboles en las principales zonas productoras.

Cronología del HLB en la República Dominicana

- 2001- Reporte de la *Diaphorina citri*.
- 2007- Distribución en casi todo el país del Psílido.
- Agosto 2008 – Observación plantas sintomáticas al HLB en Luperón, Puerto Plata.
- Septiembre 2008. Seis (6) de 16 muestras tomadas resultaron positivas al HLB.



Primeros síntomas observados en lima 'Criollo' o 'Mexicana'

Objetivos

- Determinar la distribución vertical de *Candidatus Liberibacter asiaticus* en su principal hospedero *Citrus* spp.
- Determinar los órganos de la planta de mayor prevalencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

MATERIALES Y METODOS

Descripción del proceso de análisis

1. Colección de muestras

2. Extracción de AND

Comerciales (Kit)

3. Amplificación por PCR

4. Electroforesis

**5. Lectura y Registro
de Resultados**

La extracción del ADN se realizó con un kit Quiagen®



Proceso de extracción de ADN



PCR

Se utilizaron iniciadores que amplifican un fragmento de 650 pb del gen 16S de la proteína ribosomal de la bacteria.

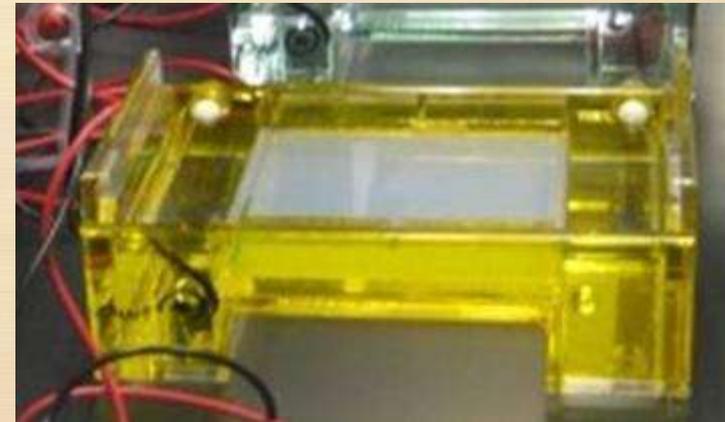
Una mezcla master: *Taq* polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$.

Un programa de PCR: 94C 3 Minutos

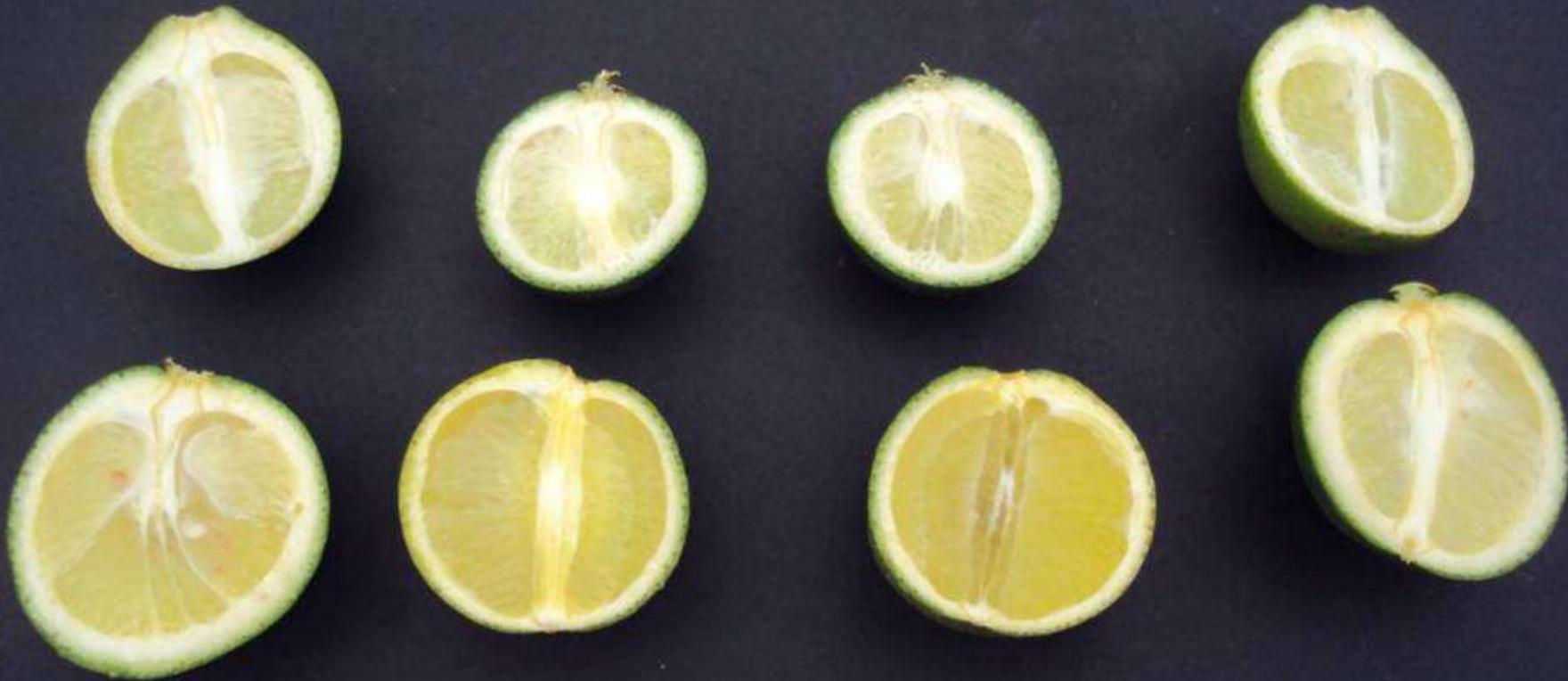
94C 30s

30 ciclos de: 55C 30s

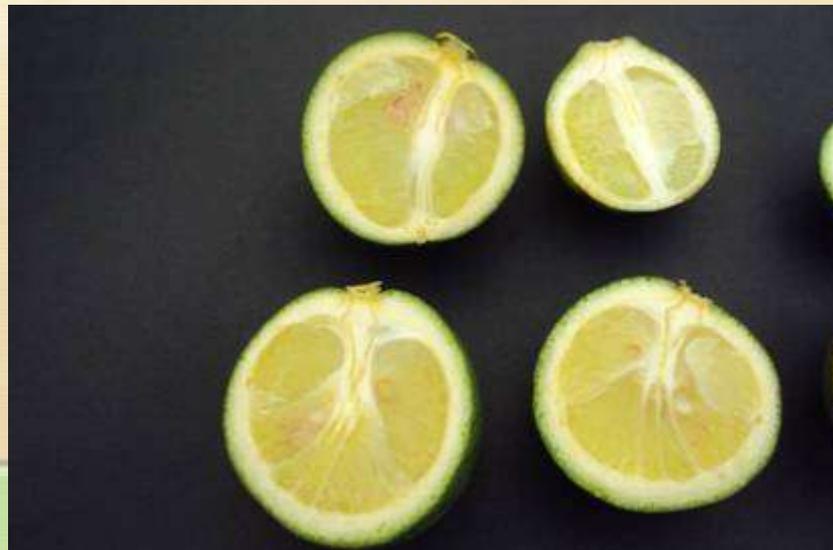
72C 72s



Frutos deformados y usados como muestras



Frutos deformados



Frutos deformados



Partes analizadas del fruto



Columela

Jugo



Semilla

Cotiledon

Cubierta semilla

Partes analizadas de la planta



RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados

Muestras	Sánchez Ramírez			
	Raíz	Tallo	Hoja llena	Brote tierno
Muestra 1	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa
Muestra 2	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
Muestra 3	Positiva	Negativa	Positiva	Positiva
Muestra 4	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
Muestra 5	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

Resultados

Muestras	Monte Plata			
	Raíz	Tallo	Hoja llena	Brote tierno
Muestra 1	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
Muestra 2	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
Muestra 3	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
Muestra 4	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
Muestra 5	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

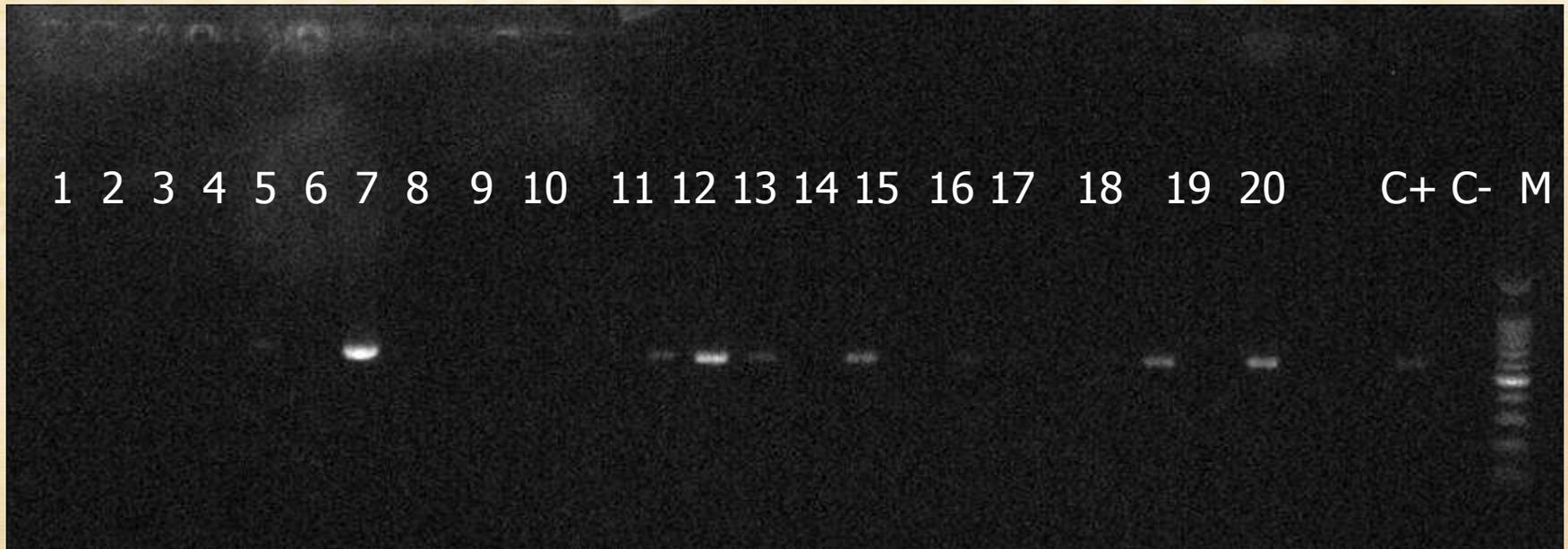
Resultados

Muestras	Hato Mayor			
	Raíz	Tallo	Hoja llena	Brote tierno
Muestra 1	Positiva	Negativa	Negativa	Negativa
Muestra 2	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa
Muestra 3	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa
Muestra 4	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
Muestra 5	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva

Resultados

Muestras	Frutos			
	Cubierta semilla	Cotiledón	Columela	Jugo
Muestra 1	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa
Muestra 2	Positiva	Positiva	Negativa	Negativa
Muestra 3	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa
Muestra 4	Negativa	Positiva	Positiva	Negativa
Muestra 5	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva

Resultados de Electroforesis



Discusión

Los resultados obtenidos indican que la bacteria fue encontrada en todas las partes analizadas.

La prevalencia de la bacteria fue mayor en las hojas llenas, el endospermo y la columela del fruto respectivamente.

Sin embargo, de cinco muestras analizadas de jugos, por lo menos uno fue positiva, esto significa que la bacteria es capaz de invadir y colonizar la mayoría de los tejidos de las plantas afectadas.



Conclusiones

Es de significativa importancia desde el punto de vista diagnóstico la parte a ser muestreada para obtener resultados mas confiables y seguros.

Muchas plantas sintomáticas suelen dar resultados negativos, sobre todo en épocas de altas temperaturas, por lo que es de vital importancia durante este tiempo, el muestreo multi-órganos.

Conclusiones

En las plantas con edades entre 15 a 20 años, la bacteria se encuentra en mayor proporción en las hojas llenas y brotes tiernos y va disminuyendo en la corteza del tallo y las raíces

Mientras que en plantas con edades entre 5 y 6 años, solo encontramos la bacteria en hojas llenas y brotes tiernos. Sin embargo, esto no quiere decir que en plantas jóvenes la bacteria solo aparece en los órganos encontrados.

Muchas Gracias