



Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional del Nordeste

Trabajo Final de Graduación

Modalidad Tesina

**“Evaluación de la presencia de HLB en
Rutáceas y citrus asilvestrados en parques y
reservas de la provincia de Misiones”**

Autor: Maria Paula Aranda

Asesor: Lic. en Genética (P.h.D): Alberto Martín Gochez

LUGAR DE REALIZACIÓN

INTA: EEA Bella Vista, Municipio 3 de Abril Ruta provincial

N°27 KM 38,3

Año: 2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer enormemente a mi familia por su apoyo incondicional, por compartir las alegrías y estar junto a mí en las adversidades, y por haberme brindado la oportunidad de estudiar lo que tanto amo.

Gracias al grupo de trabajo del área de Fitopatología- Citrus de la EEA INTA Bella Vista, por su predisposición, cariño y ayuda en numerosas oportunidades en las que lo necesité.

Un agradecimiento especial Alberto Gochez, que como director de tesis, me guió y aconsejó para poder cumplir esta meta.

ÍNDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Objetivos.....	10
Materiales y Métodos.....	10
Resultados y Discusión.....	14
Conclusiones.....	16
Bibliografía.....	17
Anexos.....	19

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB) es considerado mundialmente como la enfermedad más destructiva de los cítricos. Detectado originalmente en China, el HLB se ha expandido por la mayoría de los países citrícolas de Asia, África y América. En los últimos 6 años ha mostrado un preocupante avance sobre nuestro continente, especialmente en nuestro país, provocando perjuicios para toda la cadena de producción citrícola. Hasta el momento no se conoce ninguna especie cítrica resistente a esta enfermedad o métodos efectivos para su control. La presencia de diversas especies cítricas asilvestradas, así como también rutáceas nativas en la selva misionera, precisamente en la zona en la cual se han encontrado plantas positivas para esta enfermedad, podría constituir un reservorio del patógeno y una amenaza constante para la citricultura del NEA. Los objetivos del trabajo fueron 1) Localización y caracterización de plantas de citrus asilvestrados en áreas naturales de la provincia de Misiones, 2) Identificación diagnóstico de síntomas sospechosos correspondientes con HLB utilizando métodos moleculares en los individuos identificados 3) Adquirir experiencia y realizar entrenamiento de prácticas profesionales. El material vegetal utilizado para este trabajo consistió en muestras de las diferentes especies de Rutáceas colectadas en cuatro muestreos realizados en la Provincia de Misiones durante el periodo Agosto 2016 / Junio 2017. Se visitaron 20 áreas protegidas a lo largo de la provincia de Misiones. Se geoposicionaron un total de 290 puntos, y se tomaron además muestras tanto de las zonas protegidas, como también en caminos, casas, rutas y quintas comerciales. El material vegetal fue posteriormente acondicionado en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la EEA Bella Vista y sometido a diagnóstico por PCR convencional y qPCR para detectar presencia del patógeno causal del HLB. El análisis de las muestras dio resultado negativos para la presencia de *Candidatus Liberibacter* spp. en las muestras colectadas dentro de las reservas y áreas protegidas visitadas. Estos resultados sirven como punto de partida e insumo para posteriores trabajos que se llevarán a cabo, y para documentar que hasta la fecha el avance de la enfermedad en la región en estudio, fue mayormente debido a introducciones de material vegetal, más que por la presencia de ambientes predisponentes u hospedantes de rutáceas nativas o asilvestradas que componen las comunidades de las áreas protegidas de la provincia de Misiones.

INTRODUCCIÓN

Los cítricos son plantas perennes, originarias del sudeste asiático. En la actualidad el cultivo de los cítricos se extiende por todo el mundo, centralizado en dos franjas bien definidas, en el Hemisferio Norte, desde los 41° hasta los 16° y en el Hemisferio Sur, entre los 11° y 35° (*fuentes: SINAVIMO*).

La citricultura es una actividad que a nivel mundial se realiza a escala comercial y se desarrolla en climas tropicales como subtropicales por lo que su producción está afectada por el fenómeno de la estacionalidad, dando lugar a períodos de estación y contra estación (*fuentes: FUNDECITRUS*).

Situación Mundial de la citricultura:

China es el primer productor de fruta cítrica fresca con un estimado de 29.570.000 tns; le siguen Brasil y Estados Unidos con una estimación de 17.750.000 tns y 9.147.000 tns, respectivamente en segundo y tercer lugar (*fuentes: YARA*).

Situación Hemisférica:

En el Hemisferio Norte se encuentran los países con mayor producción y consumo de cítricos, entre el 70% y el 80% de la producción mundial, el resto proviene de países del Hemisferio Sur, En consecuencia, la ubicación geográfica de Argentina le ha permitido convertirse en un proveedor de fruta fresca confiable en diversas regiones durante la primavera y el verano boreal (*fuentes: FUNDECITRUS*).

Situación Argentina:

La producción nacional de frutas cítricas en la Argentina es de 2.824.147 Tns aproximadamente y ocupando el octavo lugar en la producción mundial.

Dentro de las 2.824.147 Tns un 52% corresponde a la producción de limones, un 31% a naranjas, 13% a mandarinas y sólo un 4% a pomelos (*fuentes: FEDERCITRUS*).

Los cultivos se extienden en dos grandes regiones, el Noroeste (NOA) donde se producen principalmente limones, también naranjas (Figura 1) y pomelos, y el Noreste (NEA), donde las principales producciones son de naranjas y mandarinas.

El 39% de la producción nacional se destina a mercado interno para consumo en fresco, el resto se exporta o industrializa (*fuentes: SENASA-DNFA/DTI*).

El Huanglongbing es en la actualidad, la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial. Es causada por bacterias Gram negativas, que se localizan exclusivamente en los vasos cribosos del floema. Hasta el momento se han descrito tres especies de bacterias pertenecientes al género *Candidatus Liberibacter* de la subdivisión α -Proteobacteria. Según la nomenclatura propuesta por Murray y Schleifer (1994),

Candidatus se refiere a que son microorganismos no cultivables y el término Liberobacter (Liber: corteza, bacter: bacteria), que más tarde fue sustituido por Liberibacter, hace alusión a la localización de estos microorganismos en el floema de las plantas afectadas (Jagoueix *et al.*, 1994). La especie Ca. L. africanus (CLaf), sensible al calor (20-25 °C) es el agente causal de la forma africana. Ca. L. asiaticus (CLas), es la especie más virulenta, tolerante al calor (35-37°C) y ampliamente distribuida (Asia, Oceanía y América) (Miyakawa, y Tsuno, 1989; Texeira *et al.*, 2005; Bové, 2007). En la península arábiga (Yemen y Arabia Saudita) y en las islas del Océano Índico (Reunión y Mauricio) se encuentran las formas africana y asiática de la bacteria (Bové y Garnier, 1984). Ca. L. americanus (CLam), es sensible al calor (28-32°C), fue informada por primera vez en Brasil, y recientemente fue detectada en una muestra foliar en China (Texeira, *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2008). Otro tipo de microorganismo procarionte perteneciente al grupo de los fitoplasmas ha sido identificado en Brasil y China asociados a los síntomas del HLB, los cuales han sido incluidos en los subgrupos 16Sr IX y I, respectivamente (Chen *et al.*, 2008; Texeira *et al.*, 2008)

Los síntomas de HLB son variados, y pueden parecerse a otros trastornos, sin embargo, hay algunas características únicas. Un árbol que se infecta en el campo usualmente desarrollará uno o más brotes amarillos, de ahí el nombre de la enfermedad. Si otras partes del árbol permanecen sanas o asintomáticas, la enfermedad adquirirá un aspecto sectorizado. Las hojas afectadas desarrollan un patrón de áreas amarillas y verdes que carecen de límites claros entre los colores, dando una apariencia de “moteado manchado” (McClellan *et al.*, 1970). Este es el síntoma foliar más característico y los patrones son asimétricos en las dos mitades de la hoja (Bové, J. M. 2006). Las hojas también pueden volverse más gruesas, con las venas agrandadas y con aspecto corchoso. En estadios más avanzados, se pueden desarrollar síntomas de deficiencia de zinc, seguido de caída de hojas y desintegración de la ramita.

En los árboles infectados por HLB hay una caída excesiva de fruta (McClellan *et al.*, 1970), los cuales son sintomáticos, pequeños, torcidos y; a medida que maduran, el extremo estilar permanece verde, de ahí el nombre de "greening". Cuando se corta a la mitad, se observa a las semillas abortadas, de coloración oscura, y los haces vasculares en el eje de la fruta están descoloridos. Las frutas, especialmente las

naranjas dulces, también pueden tener una apariencia moteada, y si la cáscara se presiona con el dedo, se obtendrá un color plateado del área deprimida.

El HLB existe como dos tipos generales: asiático y africano. Los síntomas son generalmente los mismos, aunque la forma asiática se considera más severa debido a que el ataque puede ser más extenso, y eventualmente puede resultar en la muerte del árbol. La forma asiática también es más tolerante al calor. Los síntomas de HLB africano son suprimidos por la exposición larga a las temperaturas sobre 30 ° C. Por lo tanto el HLB africano se encuentra generalmente en los cítricos en las elevaciones sobre 700 m, mientras que el HLB asiático prospera en las áreas más baja, áreas más calientes. La recién descubierta forma americana en Brasil parece asemejarse estrechamente al tipo asiático de HLB en la expresión y gravedad de los síntomas; sin embargo, las pruebas en Brasil demuestran que es intolerante al calor similar al tipo africano (Silvio A. Lopes, datos no publicados). (Gottwald *et al.*, 2007)

La transmisión del HLB ocurre en la naturaleza a través de insectos psílidos: *Diaphorina citri* Kuwayama, para las formas americana y asiática de la bacteria, y *Trioza erytreae* Del Guercio, para la especie africana. Aún no se conoce el vector transmisor del fitoplasma a los cítricos. También puede transmitirse a través de injerto de cítrico a cítrico. Mediante la planta parásita *Cuscuta* sp. ha podido transmitir experimentalmente CLas de cítrico a vicaria (*Catharantus roseus*) (Garnier y Bové, 1983), a tabaco (*Nicotiana tabacum* «xanthi») (Garnier and Bové, 1993) y a tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Duan *et al.*, 2008). CLaf (Garnier and Bové, 1983) y CLam han sido transmitidos a vicaria (Bové, 2008). Aún no ha sido comprobado si esto ocurre a través de semillas (Lin, 1956). Debido a la naturaleza de los agentes causales de HLB, no es posible el empleo de pruebas bioquímicas para su detección, por lo que la observación de síntomas en el campo, los métodos biológicos, la microscopía, los ensayos inmunoenzimáticos y, más recientemente, las técnicas moleculares como la hibridación de ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son las alternativas de diagnóstico más viables. (Collazo *et al.*, 2008)

En el año 2012, el HLB ha sido encontrado en el norte de la provincia de Misiones en el departamento Gral. Manuel Belgrano, y se ha extendido a los departamentos de San Pedro y Guaraní en 2013, y posteriormente en el Departamento Iguazú (Iguazú), y Wanda en 2014. Posteriormente nuevos positivos fueron identificados en Eldorado, San Martin y San Ignacio en 2015, y L. N. Alem y Apóstoles en 2017. Aunque en un comienzo las plantas infectadas eran encontradas solo en traspatios, se han encontrado

positivos para HLB en lotes comerciales en las localidades de San Antonio (Gral. M. Belgrano), Colonia Delicia (Eldorado) y en Apóstoles y San José, cerca de la frontera con la provincia de Corrientes. Al mes de Mayo de 2017, la cantidad de casos de cítricos positivos para HLB en la provincia de Misiones suman 189 (J. P. Agostini, INTA EEA Montecarlo, 2017, comunicación personal) (Figura 2). En el mes de Junio de 2017, tres positivos fueron confirmados en plantas de traspatio en las provincias de Formosa (Clorinda y Laguna Naick Neck) y Chaco (Campo Largo) (*fuentes*: SENASA).

En el año 2013, se denunciaron plantas positivas para HLB en diversas regiones de Paraguay, tanto en quintas comerciales como en casas particulares las cuales fueron erradicadas. (Wlosek-Stangret *et al.*, 2014). Hasta el año 2015 se registraron más de 500 casos positivos para HLB en distintas regiones de Paraguay (Britos, 2016).

El largo periodo de incubación de esta enfermedad (de 6 meses a 2 años) y la capacidad del vector de proliferar no solo en cítricos sino también en otras especies vegetales como por ejemplo el mirto común (*Murraya paniculata*, Rutaceae), muy utilizado como ornamental en la zona noreste de Argentina, plantea un serio problema para el manejo de esta enfermedad, con el agravante que hasta la fecha, no se ha logrado erradicar la enfermedad una vez instalada la misma en una región particular.

Aunque la enfermedad se ha extendido en los últimos años en la zona centro-norte de Misiones, la baja presencia del vector en esa región así como el constante monitoreo por parte de SENASA y las instituciones participantes en el Programa Nacional de Prevención del HLB (enumeradas en la resolución N° 336-2014 del SENASA como participantes Ministerio de Agricultura de la Nación, SENASA, INTA, INASE, EEAOC) (*fuentes*: SENASA), han acotado el avance de esta enfermedad a lugares de citricultura marginal, fuera de la zona centro de la provincia de Misiones. En esta última, se emplazan la mayoría de los lotes comerciales (naranjas y mandarinas para consumo en el mercado nacional y lotes de exportación), cuya producción es procesada en empresas de la provincia, las cuales son polos industriales e importantes fuentes de trabajo para toda la región. El trabajo de monitoreo y análisis de muestras provenientes de plantas sospechosas colectadas en lotes, arbolado urbano y traspacios, se realiza utilizando protocolos estandarizados de

PCR convencional y Real Time -PCR por parte de la red de laboratorios participantes en el Programa Nacional de Prevención del HLB.

La flora autóctona de Misiones cuenta con varias especies de rutáceas nativas como el “Guatambú blanco” (*Balfourodendron riedelianum*) y “Canela de venado” (*Helietta apiculata*), entre las especies más abundantes, de las cuales se desconoce si podrían ser portadores de la bacteria causante del HLB y, más aún, qué peligro correrían las poblaciones nativas de rutáceas en caso del ingreso del HLB a la región. Por otro lado, en la zona de San Pedro existe registro de material cítrico “asilvestrado” entre los que se citan naranjo agrio “Apepu” (*Citrus x aurantium*) y el denominado “limón mandarina” (*Citrus x taitensis*) (Stampella *et al.*, 2013), ambos susceptibles al HLB, con lo cual aumentan las probabilidades de diseminación de esta enfermedad en la zona debido a la presencia de posibles individuos susceptibles dentro de las áreas naturales protegidas los cuales no estarían incluidos en el monitoreo realizado en el marco del programa de prevención de SENASA.

Diversas rutáceas han sido caracterizadas como hospedantes alternativos tanto del vector como de la bacteria causante del HLB (Pietersen *et al.*, 2010; Roberts *et al.* 2017). La presencia de diversas especies cítricas asilvestradas (Stampella *et al.*, 2013), así como también rutáceas nativas en la selva misionera, precisamente en la zona en la cual se han encontrado plantas positivas para esta enfermedad, podría constituir un reservorio del patógeno y una amenaza constante para la continuidad de la citricultura regional, refiriéndonos no solo a la provincia de Misiones, sino también a regiones de citricultura más consolidada, tal es el caso del noroeste de la provincia de Corrientes, con el inmediato perjuicio para los productores locales e industrias relacionadas al citrus. De esta manera, se vuelve una necesidad imperiosa mantener un conocimiento actualizado del estado de diseminación del vector y de la sanidad los posibles hospedantes alternativos para HLB en zonas poco relevadas, como por ejemplo parques nacionales y provinciales, cercanas a lugares en donde se han registrado plantas positivas para HLB.

OBJETIVOS

- ✓ Localización y caracterización de Rutáceas y Citrus asilvestrados en áreas protegidas de la provincia de Misiones
- ✓ Identificación y diagnóstico de síntomas sospechosos correspondientes con HLB utilizando métodos moleculares.
- ✓ Adquirir experiencia y realizar entrenamiento de prácticas profesionales en el manejo de técnicas moleculares para diagnóstico de enfermedades de plantas y monitoreo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de los puntos de muestreo

Se definieron diversos puntos de muestreo en zonas protegidas en la provincia de Misiones, ubicados en cercanía a los lugares en donde SENASA ha identificado la presencia de plantas positivas para HLB (Figura 2).

Se realizaron 4 muestreos en 20 puntos, distribuidos de la siguiente forma:

1 °Muestreo del 22 al 26 de Agosto de 2016

- Reserva Natural Estricta San Antonio
- Parque Provincial Urugua-í
- Parque Provincial Cruce Caballero
- Parque Natural Municipal Salto Koppers
- Parque Provincial Piñalito
- Reserva Mainumby

2° Muestreo del 10 al 14 de Octubre de 2016

- Parque Provincial De la Araucaria
- Parque Provincial Salto Encantado Del Valle del A° Cuña Pirú
- R. Priv. U.N. La Plata Valle A° Cuña Pirú
- Parque Provincial Del Teyú Cuaré
- Parque Provincial Esmeralda
- Reserva de Biosfera Yabotí
- Reserva Privada Yaguarundí
- Parque Municipal Dos de Mayo.

3° Muestreo (Sur) del 1 al 4 de Marzo de 2017

- Jardín Botánico Alberto Roth

→Parque Provincial de la Sierra “Ing. Raúl Martínez Crovetto”

→Reserva Ecológica Tupambae

4° Muestreo del 12 al 15 de Junio de 2017

→Reserva Priv. Rincón Nazarí

→Campamento educativo "Rincón de Tuna" Garupa

→Reserva de Usos Múltiple de la EEA Cerro Azul

→ Parque Provincial de la Sierra “Ing. Raúl Martínez Crovetto”

Se debió gestionar un permiso ante el Ministerio de Ecología de la Provincia de Misiones (otorgado bajo Disposición Nro. 053/2016) para el muestreo en esas áreas naturales protegidas, lo cual se realizó en el marco del convenio INTA-AUDEAS-CONADEV (Proyecto CIAC 940164) el cual vincula a las Experimentales de INTA Bella Vista (Corrientes) y Montecarlo (Misiones), la FCA-UNNE (Corrientes), la FCEQyN, FCAYF de la UNaM y el Laboratorio GIGA del Instituto de Biología Subtropical (IBS) nodo Posadas (Misiones).

Metodología de muestreo

Dado que no se contaba con información de posibles positivos de HLB en las áreas protegidas que se visitaron, se procedió primeramente a realizar muestreos aleatorios simples (MSA) en cada lugar, geoposicionando cada individuo identificado y colectando muestras en caso de presentarse síntomas sospechosos de HLB.

En el caso de encontrarse individuos positivos para CLas se decidió volver a visitar esos puntos determinados como positivos para HLB, afín de muestrear nuevamente y de manera sistemática todos los cítricos localizados en la cercanía de estos, definiéndose en ese caso el tamaño muestral y el tipo de muestreo específico a utilizar que amerite en cada tipo de contingencia (muestreo sistemático, muestreo aleatorio estratificado, muestreo por conglomerados, etc).

Las muestras fueron tomadas al azar en cada lugar visitado. De cada planta se recolectaron 15 a 20 hojas de sintomatología dudosa, desde los 4 puntos cardinales de la misma.

Cada muestra se colocó en bolsas plásticas, con papel servilleta para evitar excesos de humedad y su correspondiente rotulación correlativa. Todas las muestras colectadas se conservaron en lugar fresco para luego ser llevadas al Laboratorio de Sanidad Vegetal del grupo de fitopatología de Citrus en la EEA Bella Vista para su correspondiente análisis.

En cuanto a la práctica profesional que este trabajo brindo, se adquirió experiencia en cuanto a: gestión de permisos de ingreso y muestreo en organismos públicos, compra de insumos y equipamiento para laboratorio, practica en cuanto al contacto con responsables de otras instituciones (Universidades, SENASA, INTA, productores, dueños de reservas y responsables de emprendimientos educativos y eco-turísticos privados). Además se profundizo la experiencia en cuanto a técnicas de diagnóstico y manejo de la enfermedad HLB, en base a manejo de técnicas moleculares de última generación (extracción de ADN por variados métodos, cuantificación por fluoronometria, diagnóstico por medio de PCR convencional y qPCR).

Acondicionamiento de muestras y extracción de ADN

Una vez llegadas al laboratorio, cada muestra se limpió cuidadosamente con algodón embebidos en agua de canilla y se le dio entrada con un número correlativo en un libro de registro de muestras específico para el proyecto CIAC 940164. Seguidamente las muestras rotuladas fueron acondicionadas de la siguiente manera: se procedió a extraer las nervaduras de las hojas, colocándolas en tubos plásticos con alcohol 96° para su conservación.

Se realizó la extracción del ADN genómico total de cada muestra colectada, para lo cual se pulverizo 0,5g de nervaduras conservadas en alcohol por medio de mortero y nitrógeno líquido, para luego realizar el proceso de extracción de ADN por el método de CTAB (Protocolo Murray y Thompson 1980) el cual se detalla en el Anexo I.

Con el objeto de obtener una mayor cantidad y calidad de ADN, se decidió poner a punto el método de extracción y de esta manera reemplazar la utilización del nitrógeno líquido (Anexo I) por medio de disrupción mecánica utilizando un homogeneizador Precellys 24 (Bertin Corp.) y esferas de cromo de 2,3mm diámetro (Biospec Inc.). Al realizar este cambio se debieron ajustar algunos pasos del protocolo de extracción de ADN, la cantidad de material vegetal (nervaduras) que se utilizó debió ser de 0,3 g, y un volumen de CTAB 1,5 ml en vez de 3 ml.

PCR real-time de tipo cuantitativo (qPCR)

-Se preparó la reacción de trabajo para qPCR de la siguiente forma:

En una cabina de flujo laminar, se realiza una solución conocida como master mix (Anexo II), se rotula la placa de tubos (tipo Eppendorf® de 0,2 ml). Se toman los reactivos del freezer los cuales se encuentran conservados a -4°C, una vez que estos se pueden manipular, se prepara la master mix para la cantidad de muestras a ser

analizadas y se alícuota en cada tubo 23 µl. Una vez realizado esto se llevaron los tubos alicuotados a otra cabina de flujo laminar, agregándose el ADN (2 µl) conservado a una temperatura de -4°C, adicionándose siempre una muestra control negativa y una positiva proveniente de ADN de plantas confirmadas como portadoras del patógeno causal del HLB. Los tubos fueron colocados en un termociclador Termociclador Bio Rad CFX96, para ser sometidos al ciclado correspondiente para cada tipo de primers utilizado.

Se utilizaron Primers HLBam, HLBas, HLBr, HLBsonda (Li *et al*, 2006) (Tabla 3) con el siguiente esquema de ciclado Ciclo 1: 95° 5` y 40 ciclos de Ciclo 2: 95° 30``; Ciclo 3: 59° 45`` (Anexo II). Al final del ciclo se visualizaron las curvas utilizando el software Bio-Rad CFX Manager. Como norma de trabajo cada muestra fue analizada por duplicado en dos reacciones de PCR diferentes, para evitar la posible aparición de falsos positivos o negativos.

PCR convencional

-Se preparó la reacción de PCR de la siguiente manera:

En una cabina de flujo laminar, se preparó una solución conocida como master mix (Anexo III). Los reactivos líquidos conservados a -4°C, puestos en hielo molido y una vez manipulables, se utilizaron para preparar la master mix para la cantidad de muestras a ser analizadas, alicuotandose 23 µl de la misma en tubos especiales para PCR de 0,5 ml de capacidad. Una vez realizado esto los tubos alicuotados fueron llevados a otra cabina de flujo laminar, agregándose el ADN (2 µl) conservado a una temperatura de -4°C. Los tubos fueron colocados en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (AG 22331, Hamburg), para ser sometidos al ciclado correspondiente para cada tipo de primers utilizado.

Para primers A2J5 (tabla 3) (Hocquellet *et al.*, 1999) se utilizó el siguiente esquema de ciclado Ciclo 1: 95° 5`

35 ciclos; Ciclo 2: 95° 30`; Ciclo 3: 60° 30``; Ciclo 4: 72° 45``; Ciclo 5: 72° 5` 12° finales. Se espera obtener una banda de 703 pb.

Para primers OI (tabla 3) (Hocquellet *et al.*, 1999) se utilizó el siguiente esquema de ciclado Ciclo 1: 95° 5` 35 ciclos; Ciclo 2: 94° 30``; Ciclo 3: 60° 30``; Ciclo 4: 72° 1`; Ciclo 5: 72° 5` 12° finales. Se espera obtener una banda de 1160 pb.

Al final del ciclado correspondiente, los amplicones esperados a ser visualizados se observaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5%

Para la preparación del gel al 1,5% se diluyeron 0,6 g de agarosa en 40 ml de buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH 8,3) 1X y se calienta hasta que la agarosa se disuelva,

posteriormente se vacía el preparado en una cama electroforética de acrílico con un peine para marcar las calles. Una vez solidificado se lo coloca en la cuba electroforética con el buffer conductor (TAE) y luego se procede a sembrar cada muestra utilizando una micropipeta (Gilson, Inc). En cada calle se sembraron 10 µl de la reacción y 3 µl de un colorante de carga (Blue Loading Dye, Promega Corp.) adicionado con GelRed (Biotium Inc.), adicionando en una de las calles 3 µl del marcador molecular (100bp DNA Ladder - Promega Corp.). Finalmente se conecta la cuba electroforética con un tiempo y voltaje determinado (80 minutos a 90 volts), para ser visualizado con luz UV utilizando una mesa UV/White Light Fluorescent Table (Vilber Lourmat) y documentar los resultados por medio de un digitalizador DigiDoc-It Imaging System v2.4.3 (UVP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestras colectadas

Se geoposicionaron un total de 290 puntos en reservas y parques provinciales visitados (Tabla 1 y 2), se registraron además otros puntos cercanos a cada área protegida visitada, localizados en lugares como casas, caminos y quintas comerciales, donde se encontraron cítricos y otras Rutáceas con síntomas sospechosos de HLB. El objeto de muestrear plantas sospechosas fuera de los parques, se basó en la necesidad de conocer el estado sanitario de los alrededores en el caso de que deberían realizarse muestreos de contingencia (Figura 3).

Se identificaron 29 muestras de Rutáceas nativas en los parques visitados, colectándose 20 muestras para análisis molecular (Tabla 2)

Se recolectaron un total de 191 muestras vegetales.

1º Muestreo: del total de las 92 muestras que se recolectaron, 12 pertenecen a otras Rutáceas; de estas 12 que pertenecen, 6 fueron tomadas en zonas protegidas y las 6 restantes en casas de traspatio, quintas comerciales y caminos. De las 80 muestras de material vegetal de cítricos, 46 fueron tomadas en zonas protegidas y las 34 restantes en casas de traspatio, quintas comerciales y caminos.

2º Muestreo: del total de 56 muestras que se recolectaron, 11 pertenecen a otras Rutáceas.

De las 11 que pertenecen a otras Rutáceas, 10 fueron tomadas en zonas protegidas y la restante en un camino. De las 45 muestras de material vegetal de cítricos, 38 fueron tomadas en zonas protegidas y las 7 restantes en casas de traspatio, quintas comerciales y caminos.

3° *Muestreo*: del total de 43 muestras que se recolectaron, 5 pertenecen a otras Rutáceas.

De las 5 que pertenecen a otras Rutáceas, 4 fueron encontradas en zonas protegidas y la restante en una casa. De las 38 muestras de material vegetal de cítricos, 8 fueron tomadas en zonas protegidas y las 30 restantes en casas de traspatio, quintas comerciales y caminos.

4° *Muestreo*: del total de 20 muestras que se recolectaron, 2 pertenecen a otras Rutáceas. Las 2 que pertenecen a otras Rutáceas, 1 se recolectó en una zona protegida y la restante en un sector lindero de calle. De las 18 muestras de material vegetal de cítricos, 6 fueron tomadas en zonas protegidas y las 12 restantes en casas de traspatio, quintas comerciales y caminos.

Análisis molecular de las muestras

Siguiendo el protocolo de extracción y primers de PCR convencional y qPCR descriptos, no se identificaron muestras positivas para CLas, CLaf, CLam en ninguna de las muestras de citrus y Rutáceas colectadas en parques y reservas provinciales de la provincia de Misiones. (Figura 4)

Dado que la EEA Bella Vista adquirió recientemente (Mayo 2017) un cuantificador por fluorescencia (Quantus, Promega Corp), las muestras analizadas utilizando el método de extracción de ADN por medio de nitrógeno líquido y CTAB solo fueron cuantificadas por medio de métodos comparativos (apreciación visual contra un patrón). La cuantificación de algunas de las muestras reveló que en algunos casos el método de extracción produjo muy bajos títulos de ADN, principalmente de muestra de material vegetal joven, o rutáceas nativas, las cuales resultaron muy difíciles de procesar. Todas las muestras que produjeron títulos bajos debieron ser reprocesadas para confirmar los resultados obtenidos.

La utilización del homogeneizador permitió incrementar sustancialmente la cantidad de ADN obtenido, incluso doblando la cantidad de material genético recuperado.

De la misma manera teniendo en cuenta que para realizar una qPCR se necesita como mínimo una concentración de ADN de 100 ng/ul (Lin *et al.*, 2010) la cuantificación fluorométrica de las muestras se convierte ahora en un paso obligatorio para el correcto análisis de las muestras en el laboratorio

CONCLUSIONES

Todas las muestras colectadas fueron diagnosticadas como no positivas para la presencia de CLas, CLam y CLaf. Dado que el avance de la enfermedad se acrecienta cada año en la provincia de Misiones, estos datos son altamente relevantes como material de referencia para posteriores campañas y muestreos zonales; como así también para demostrar que el avance de la enfermedad se realiza mayormente por introducciones de material vegetal desde fuentes no certificadas, más que por la presencia de ambientes predisponentes u hospedantes de variadas especies de rutáceas nativas o asilvestradas que componen las comunidades de las áreas protegidas de la provincia de Misiones.

Conforme a los resultados obtenidos en esta experiencia se puede concluir que este trabajo permitió realizar prácticas profesionales en el diagnóstico y aplicación de técnicas moleculares de última generación para la determinación de la enfermedad HLB, así como también experiencia en la diagramación y realización de trabajos de muestreo, gestión y capacitación en la temática propuesta.

BIBLIOGRAFÍA

- Bové JM. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathol.* 88:7-37
- Britos MJ. 2016. Situación actual del HLB en Paraguay. Workshop HLB. 23-24 de Noviembre de 2016. Centro de Convenciones. Posadas, Misiones.
- Collazo CC; Pantoja ML; Riverón RL. 2008. Técnicas empleadas para el diagnóstico del huanglongbing de los cítricos. *Revista CitriFrut*, vol 25, N°2. 24-30
- Gottwald TR; Da Graça JV; Bassanezi RB. 2007. Citrus Huanglongbing: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2007-0906-01- RV.
- Hocquellet A; Toorawa P; Bové JM; Garnier M. 1999. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the beta operon. *Mol. Cell. Probes* 13, 373-379.
- Li W; Hartung JS; Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. January 2006.
- Lin H; Chen C; Doddapaneni H; Duan Y; Civerolo EL; Bai X; Zhao X. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus Huanglongbing.
- McClellan APD; Schwarz RE. 1970. Greening or blotchy-mottle disease of citrus. *Phytophylactica* 2:177-194.
- Pietersen G; Arrebola E; Breytenbach JHJ; Korsten L; Le Roux HF; La Grange H; Lopes SA; Meyer JB; Pretorius MC; Schwerdtfeger M; Van Vuuren SP. 2010. A survey for 'Candidatus Liberibacter' species in South Africa confirms the presence of only 'Ca. L. africanus' in commercial citrus. *Plant Disease*, 94(2), pp.244-249.
- Roberts R; Cook G; Grout T; Rwomushana I; Nderitu P; Seguni Z; Materu C; Steyn C; Pietersen G; Roux HL. 2017. Detection of 'Candidatus Liberibacter species' from citrus in Eastern Africa. Abstracts from the 5th International Research Conference on Huanglongbing. *Journal of Citrus Pathology*, 4(1). pág. 36.
- Stampella PC; Delucchi G; Pochettino ML. 2013. Naturalización e identidad del "limón mandarina", *Citrus x taitensis* (Rutaceae, Aurantioideae) en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 48(1), pp.161-169.
- Wlosek-Stangret C; Bogarin C; Venialgo C; Sanchez G; Ojeda J; Cantero A; Batte L; Vega F; Gimenez L; Canteros BI. 2015. HLB in Southern Paraguay. Current status of the outbreak. *Journal of Citrus Pathology* 2 (1). Abstracts from the 4th International Research Conference on Huanglongbing. pag. 45.

Fuentes consultadas en internet:

YARA website: www.yara.com.ar/crop-nutrition/crops/citricos/key-facts/world-citrus-production/

FEDERCITRUS website: http://www.federcitrus.org/index_esp.html

FUNDECITRUS website: <http://www.fundecitrus.com.br>

SENASA-DNFA/DTI- Oficina de estadísticas de comercio Exterior –Dic 2013.

SINAVIMO website: <http://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/citrus-sinensis>

ANEXOS

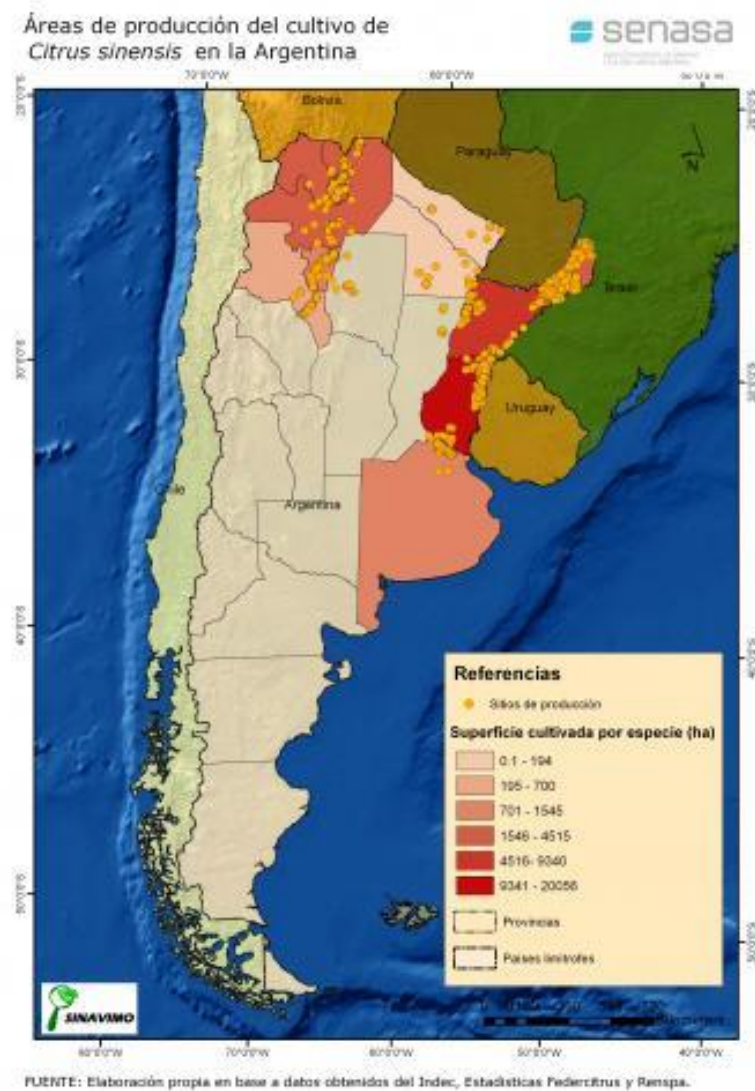


Figura 1. Áreas de producción de *Citrus sinensis* en Argentina. (fuente: SINAVIMO)

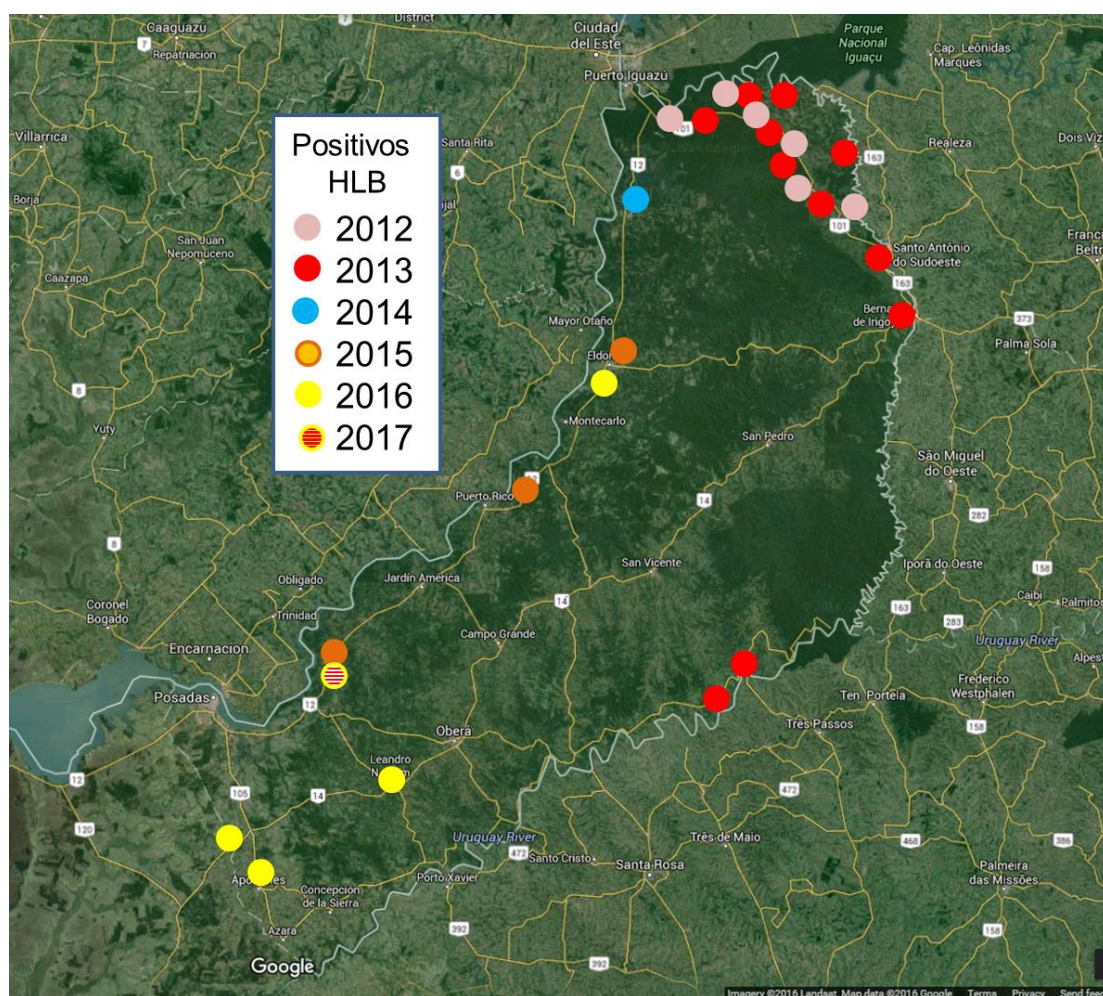


Figura 2. Positivos encontrados para HLB en cítricos de la provincia de Misiones (Adaptado de: <https://geonode.senasa.gov.ar/maps/207/view>)

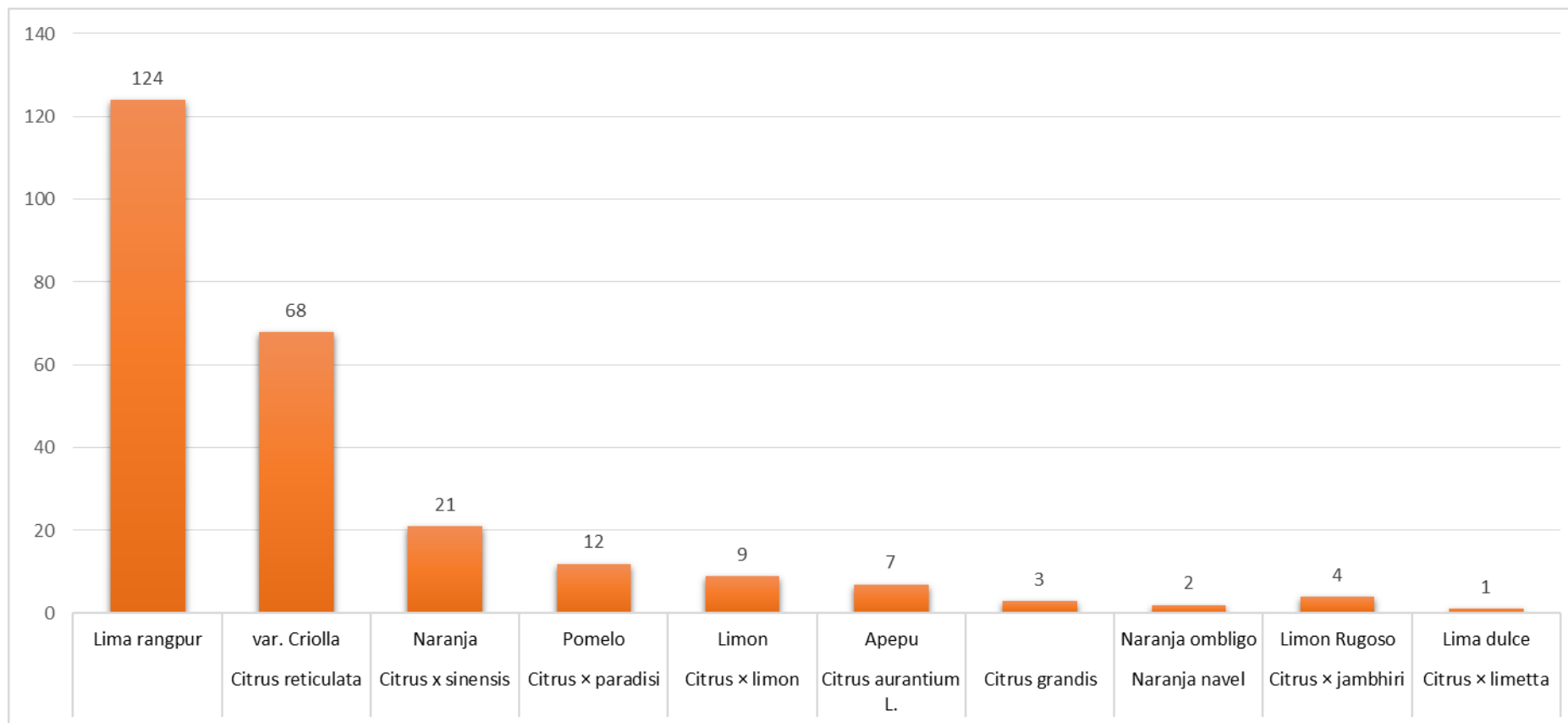


Tabla 1. Listado de variedades cítricas identificadas en las reservas visitadas de la provincia de Misiones (nombre científico y nombre común). Se detalla el número de individuos identificados y el número de muestras colectadas para identificación molecular de *Candidatus Liberibacter sp.*

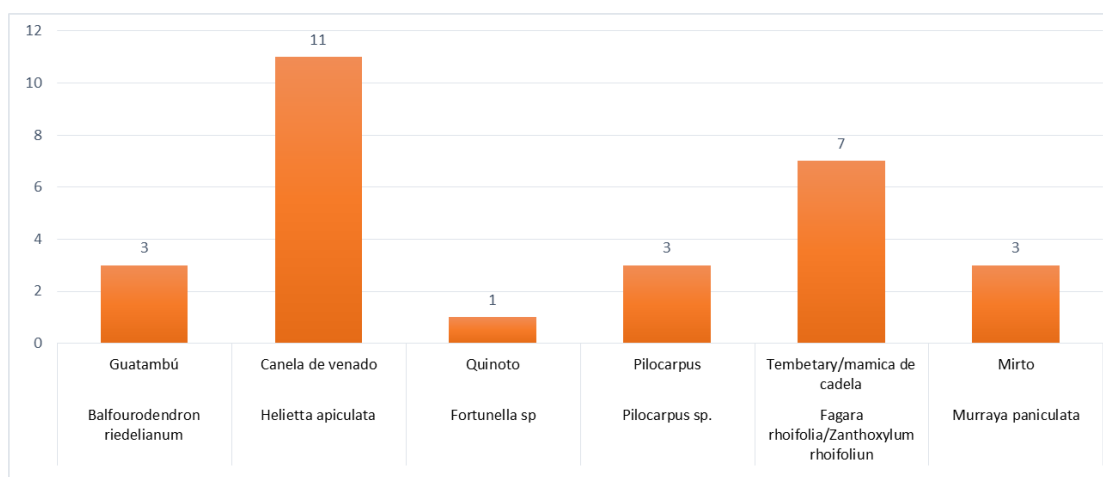


Tabla 2. Listado de Rutáceas (No del género *Citrus sp.*) identificadas en las reservas visitadas de la provincia de Misiones (nombre científico y nombre común). Se detalla el número de individuos identificados y el número de muestras colectadas para identificación molecular de *Candidatus Liberibacter sp.*

Tabla 3. Primers utilizados para PCR convencional y qPCR real time en el presente trabajo.

Primer	Secuencia	tamaño amplicon	referencia
OI-1	(5' to 3') GCGCGTATGCAATACGAGCGGGCA	1160 pb	Hocquellet et al.,1999
OI-2	(5' TO 3') GCCTCGCGACTTCGCAACCAT	1160 pb	Hocquellet et al.,1999
A2	(5' TO 3') TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT	700 pb	Hocquellet et al.,1999
J5	(5' TO 3') ACAAAAAGCAGAAATAGCACGAAACAA	700 pb	Hocquellet et al.,1999
HLBas	(5' TO 3') TCGAGCGCGTATGCAATACG		Li et al, 2006
HLBam	(5' TO 3') GAGCGAGTACGCAAGTACTAG		Li et al, 2006
HLBr	(5' TO 3') CTACCTTTTCTACGGGATAACGC		Li et al, 2006
HLBp sonda	(5' TO 3') AGACGGGTGAGTAACGCG		Li et al, 2006
COXf	(5' TO 3') GTATGCCACGTCGATTCCAG		Li et al, 2006
COXr	(5' TO 3') GAATGCCCTTAGCAGTTTGGC		Li et al, 2006
COXp sonda	(5' TO 3') ATCCAGATGCTTACGCTGG		Li et al, 2006

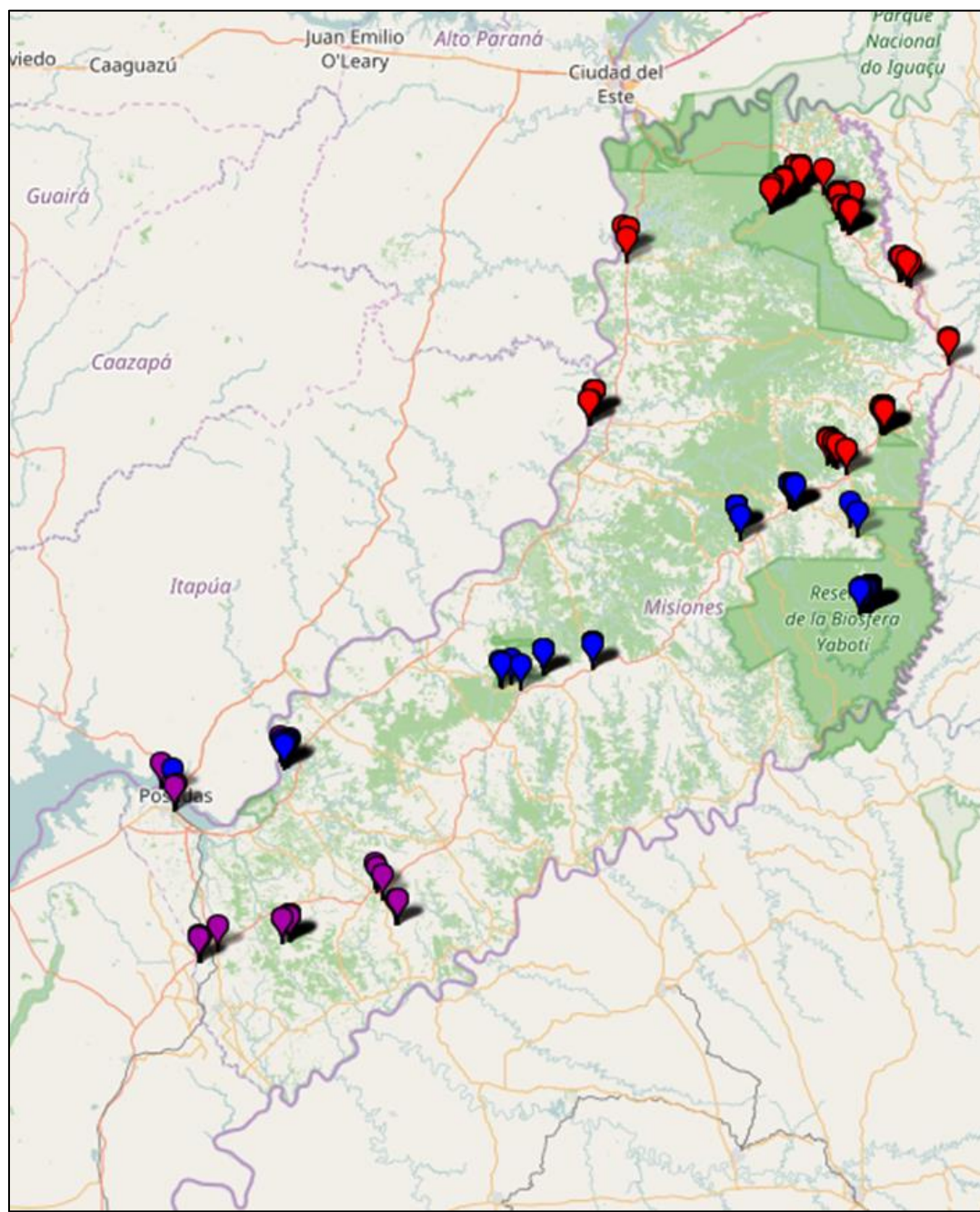
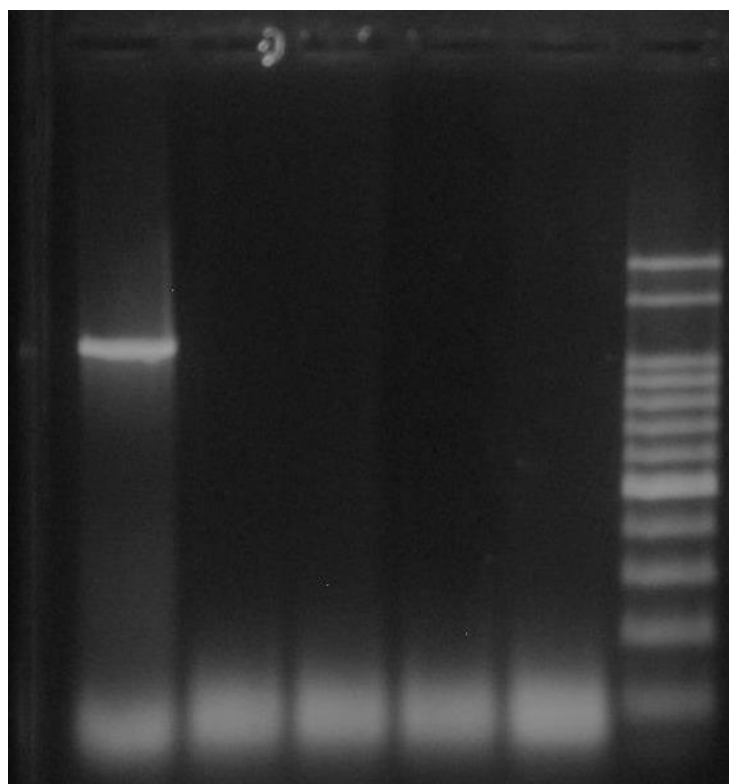


Figura 3. Resumen de Citrus y Rutáceas geoposicionadas durante los muestreos del primer año Proyecto CIAC 940164. Se realizaron 4 campañas de colecta en 20 áreas y parques protegidos de la provincia de Misiones abarcando la zona Norte (Agosto 2016, rojo), Centro (Octubre 2016, azul) y Sur (Marzo y Junio 2017, violeta).

A.



B.

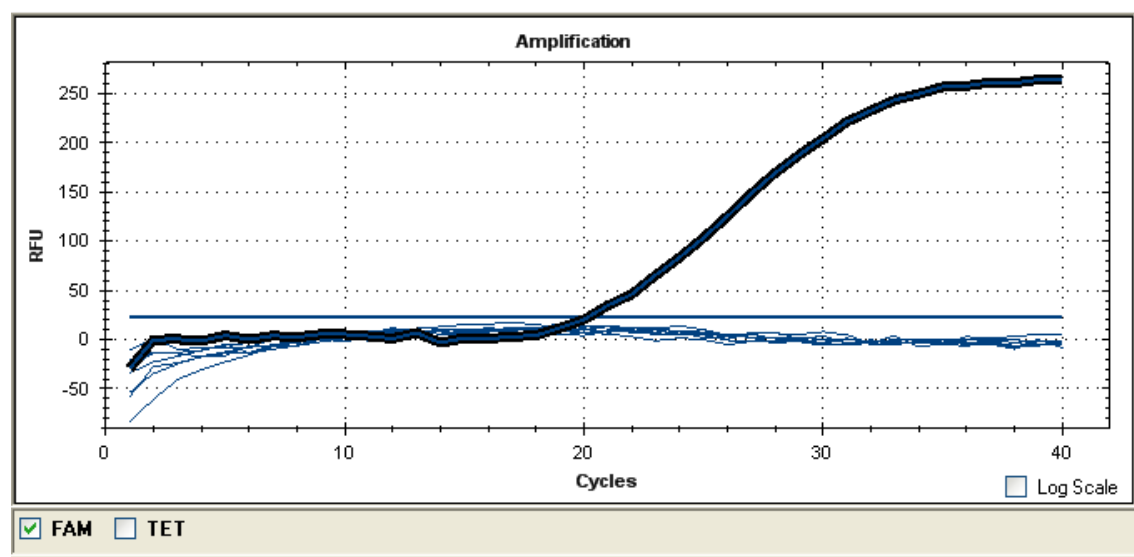


Figura 4. A. Gel de agarosa al 1.5% en el cual se observan bandas obtenidas al utilizar primers OI por medio de PCR convencional. B. Resultados del análisis molecular de la presencia de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) por medio de qPCR, en este caso todas las muestras figuran como negativas, excepto el control (curva sigmoidea).

Anexo I

Protocolo de Extracción de ADN desde Material vegetal cítrico

-Lavar las hojas en agua corriente para eliminar residuos. Secar con papel secante, toalla de papel o gasa.

-Cortar con una tijera las láminas de las hojas y alas del pecíolo.

-Tomar 5-6 pecíolos y nervadura central y pesar 500 mg mientras se va cortando desde el pecíolo hacia la nervadura. Guardar en papel aluminio a 4°C si aún no se va a extraer hasta 5 días y a -20°C si pasa más tiempo.

-En mortero de cerámica colocar el material (cortado lo más chiquito posible al pesar) triturar usando nitrógeno líquido y pisador. La muestra queda como polvo y de color claro y bien seca.

-Antes de comenzar la extracción con nitrógeno líquido colocar 3 ml de buffer de extracción para cítricos (C-TAB cítricos) en tubos tipo Falcon con tapa celeste.

Una vez preparado el buffer C-TAB se guarda sin B-mercaptoetanol y cuando se va a ocupar se toma una cantidad equivalente al número de muestras que se van a procesar.

Cada 10 ml de buffer van 20ul de B-mercaptoetanol (el cual se colocara recién al momento de uso).

El buffer C-TAB se prepara con:

C-TAB 20g

+ NaCl 82g

+ PVP-25- 20g

+ TRIS 1 M PH8 100ml

+ EDTA 0.5M 100 ml y completar con agua (1 litro)

Esterilizar y poner al momento de usarse 2 ml de B mercaptoetanol o su equivalente para menor cantidad.

Para diluir el PVP se debe mezclar con el NaCl en un poco de líquido y se disuelve en mezclador con calor, queda algo lechoso, recién entonces se mezcla con el resto.

-Colocar la muestra molida en el tubo que contenga los 3 ml de buffer. Intentar mezclar bien sin agitar demasiado.

-Incubar a 65 °C por 30 minutos. Mezclar por inversión cada 10-15 minutos.

-Centrifugar 5 minutos a 3500 rpm. En la centrífuga adecuada para esa velocidad, no usar la microcentrífuga.

- Recuperar a nuevos tubos tipo eppendorf de 3 ml la cantidad de 900 ul del sobrenadante y adicionar 900 ul de cloroformo- isoamilalcohol 24:1 conservado a a 4°C.
- Agitar en vortex ligeramente y centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm.
- Recuperar a nuevos tubos 800 ul del sobrenadante (fase acuosa) y adicionar 800 ul de Isopropanol.
- Incubar a -20 °C 30 minutos o toda la noche. En este punto se puede dejar más días.
- Centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Lavar el pellet con 100ul de Etanol al 70% conservado a -20 °C. Este es en realidad alcohol puro pero en el proceso de almacenamiento y uso se considera que llega a 70°. Tener mucho cuidado de no perder el ADN. Se puede extraer una cantidad de alcohol y dejar luego a secar en el flujo laminar.
- Centrifugar 10 minutos a 14.000 rpm y repetir este paso. A veces no es necesario hacer 2 veces.
- Secar el pellet en vacío, en flujo laminar y resuspender en 30-100 ul de agua mili-Q, 2 ul de ARNasa
- usar para el PCR de 1- 5 ul.

Anexo II

Protocolo para preparación de Master Mix para PCR real-time de tipo cuantitativo (qPCR) (Lin *et al.*, 2010)

Reactivos	Cf	Ci	Vi(x1)
Buffer	1x	10x	2,5 µl
MgCl ₂	6mM	25mM	6 µl
dNTPs	0,25mM	5mM	1,25 µl
Pr HLBam	0,25 µM	5 µM	1,25 µl
Pr HLBas	0,25 µM	5 µM	1,25 µl
Pr HLBr	0,25 µM	5 µM	1,25 µl
HLBp sonda	0,15 µM	3 µM	1,25 µl
COXf	0,3 µM	6 µM	1,25 µl
COXr	0,3 µM	6 µM	1,25 µl
COXp sonda	0,15 µM	3 µM	1,25 µl
Taq pol	1U	5U/ µl	0,2 µl
ADN molde		2 µl	2µl
Agua			4,3 µl

Vi: Volumen inicial

Ci: Concentración inicial

Cf: Concentración final



Anexo III

Protocolo para preparación de Master Mix para PCR convencional

(Hocquellet *et al.*, 1999)

Primers A2-J5

Reactivos	Cf	Ci	Vi(x1)
Tampón	1 X	10 X	2,5 µl
MgCl ₂	2 mM	25mM	2 µl
dNTPs	0,2 mM	5Mm	1 µl
Pr A2	0,5 µM	5 µM	2,5 µl
Pr J5	0,5 µM	5 µM	2,5 µl
Taq. ADN Polimerasa	1,5 U	5U/µl	0,3 µl
ADN molde	2 µl		2 µl
AGUA sin nucleasas c.s.p 25 µl			

Primers OI1-OI2

Reactivos	Cf	Ci	Vi(x1)
Tampón	1 X	10 X	2,5 µl
MgCl ₂	2,5 mM	25mM	2,5 µl
dNTPs	0,2 mM	5Mm	1 µl
Pr OI1	0,5 µM	5 µM	2,5 µl
Pr OI2	0,5 µM	5 µM	2,5 µl
Taq. ADN Polimerasa	1 U	5U/µl	0,2 µl
ADN molde	2 µl		2 µl
AGUA sin nucleasas c.s.p 25 µl			