90 AÑOS 1928 - 2018

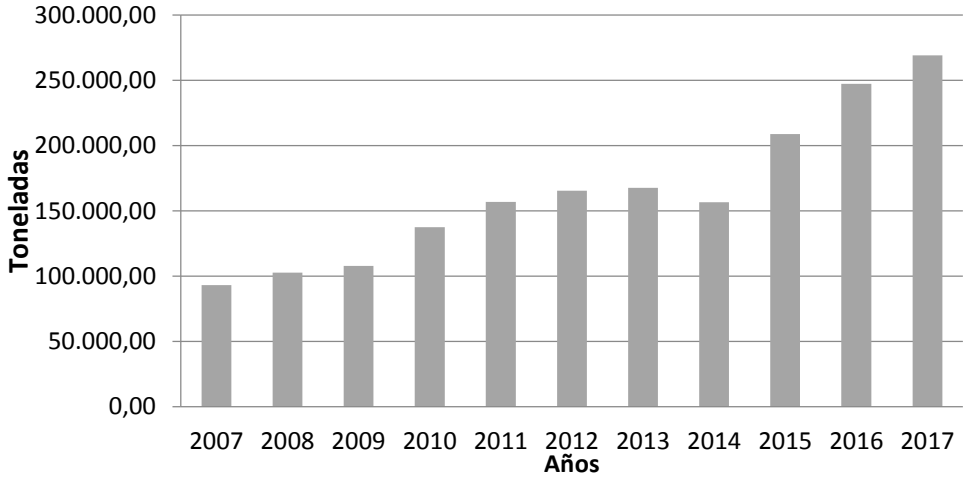
PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO

Jornada Técnica del Comité de Cítricos

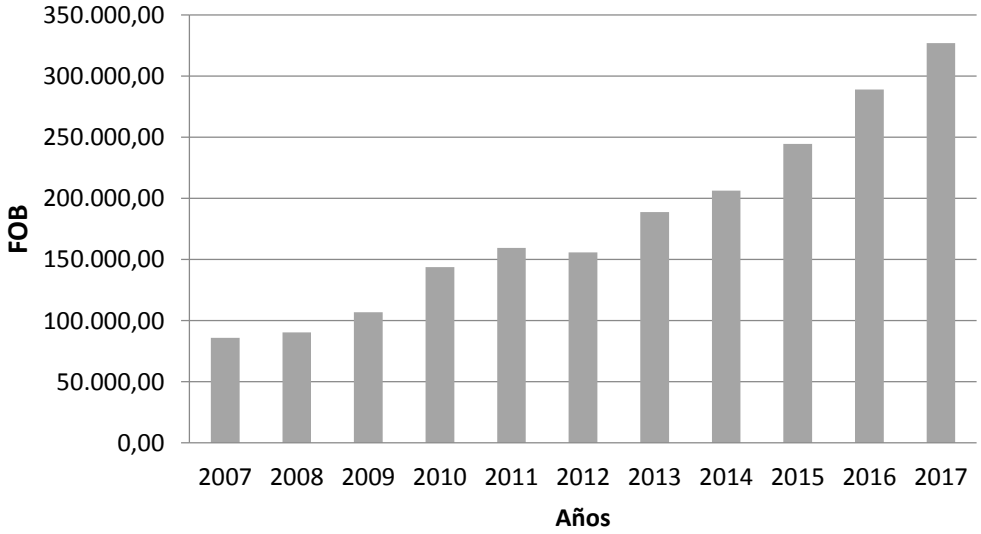
Reingeniería al germoplasma clonal de cítricos para la producción de yemas libres de enfermedades transmisibles por injerto

Profesora Ximena Besoain
Escuela de Agronomía
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Exportaciones de cítricos en Chile



Exportaciones (ton) de cítricos en Chile entre los años 2007-2017.

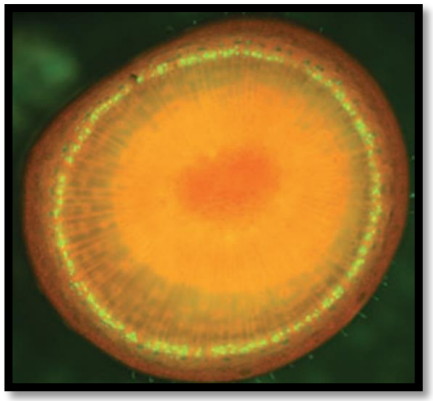
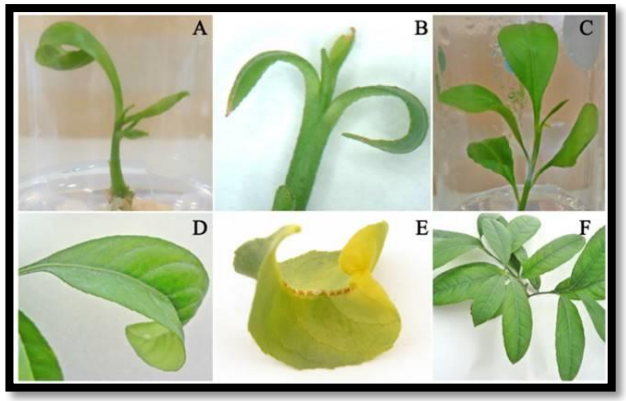


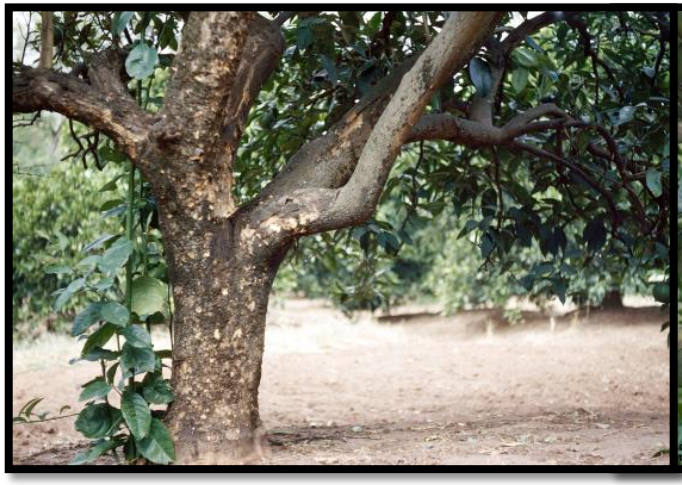
Ingresos por exportaciones (M US$ FOB) de cítricos en Chile entre los años 2007-2017.

Fuente: Datos obtenidos de ODEPA con información del Servicio Nacional de Aduanas.

Problema

- Los cítricos han sido afectados por numerosos agentes patógenos, la mayoría enfermedades transmisibles por injerto (Citrus Graft Transmissible diseases, CGTDs), con importantes pérdidas.

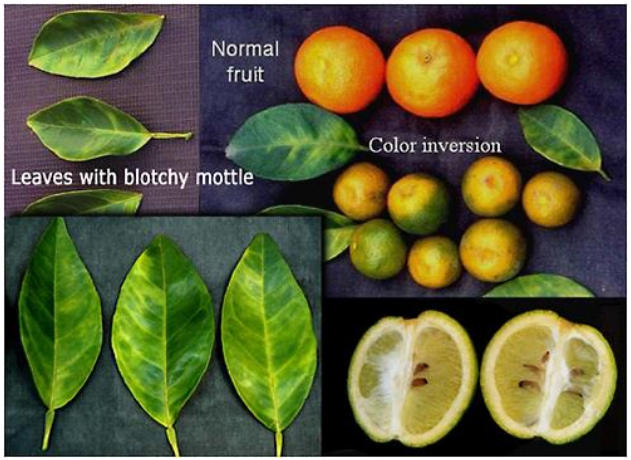





Fuente: Pests and Diseases of CultivatedCitrus in the United States; Satyanarayana and Dawson 2012; Alcántara-Mendoza *et al*., 2017.

Patógenos emergentes

- Considerando lo antes expuesto, es fundamental proteger esta industria de actuales y/o futuras amenazas. Especialmente de la pandemia conocida como Huanglongbing o HLB.



Diaphorina citri

Trioza erytreae

Fuente: http://www.agrocalidad.gob.ec; J. M. Bové, La Brède, France.

Escenario mundial

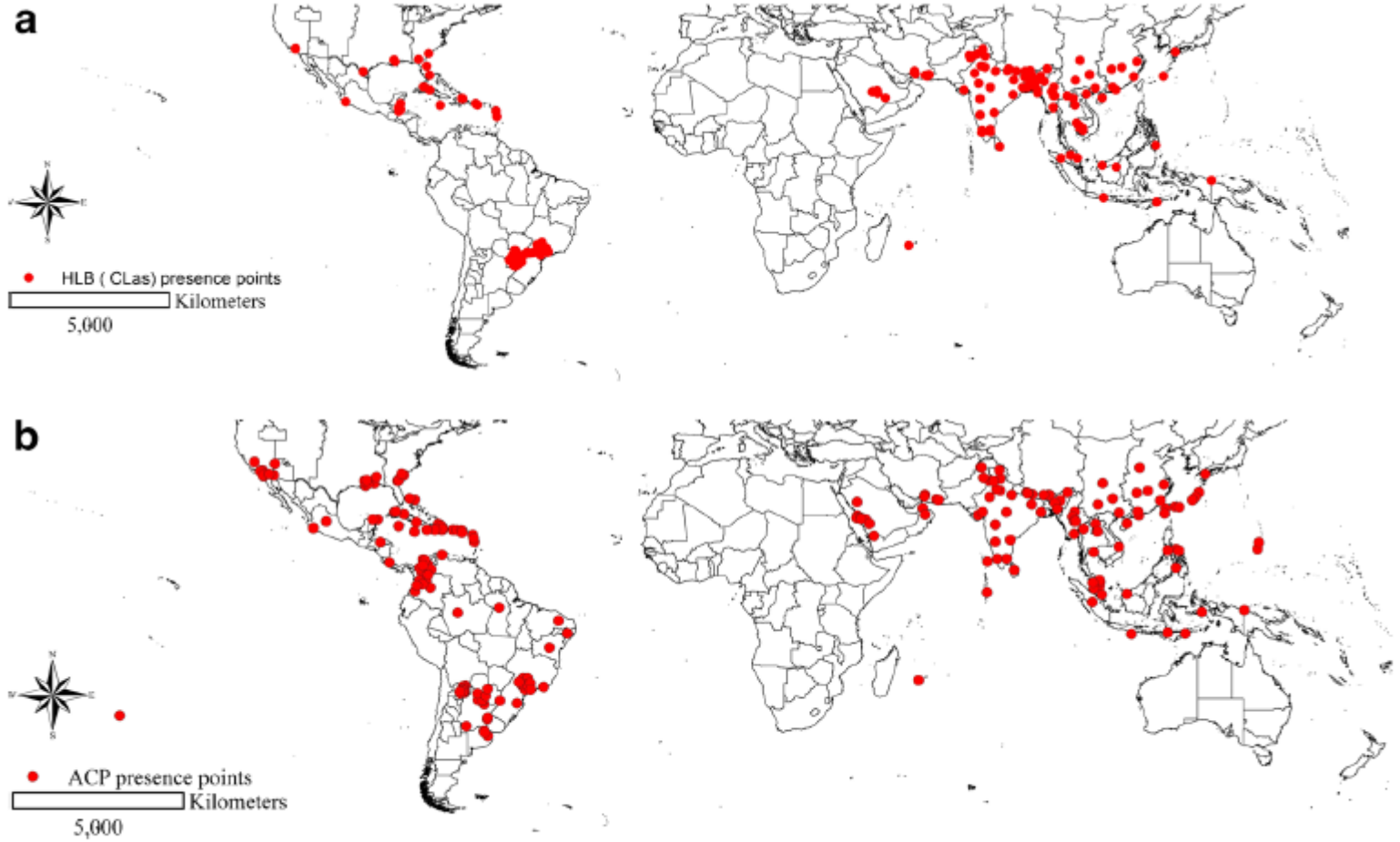


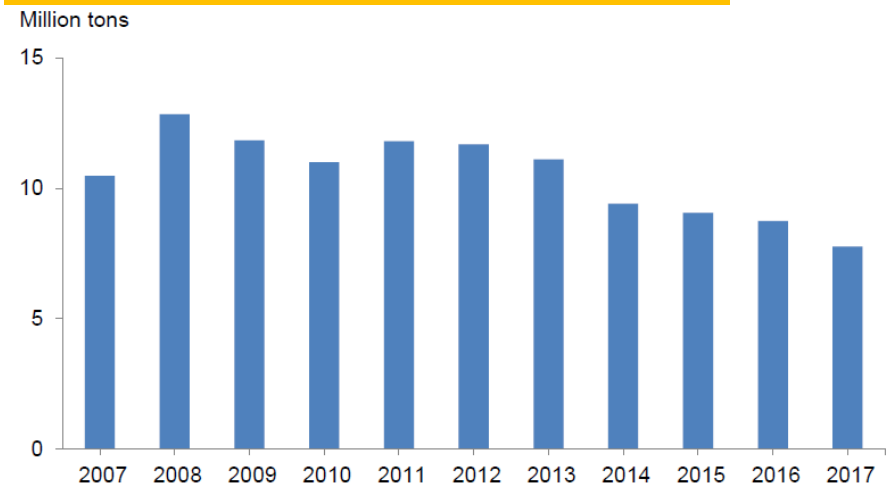
Fig. 1 Current global distribution of citrus Huanglonbing, HLB, caused by *C*Las (**a**) and Asian Citrus Psyllid, ACP (**b**). Occurrence of HLB and ACP in the USA were not included in the models

Fuente: Hossein et al., 2016.

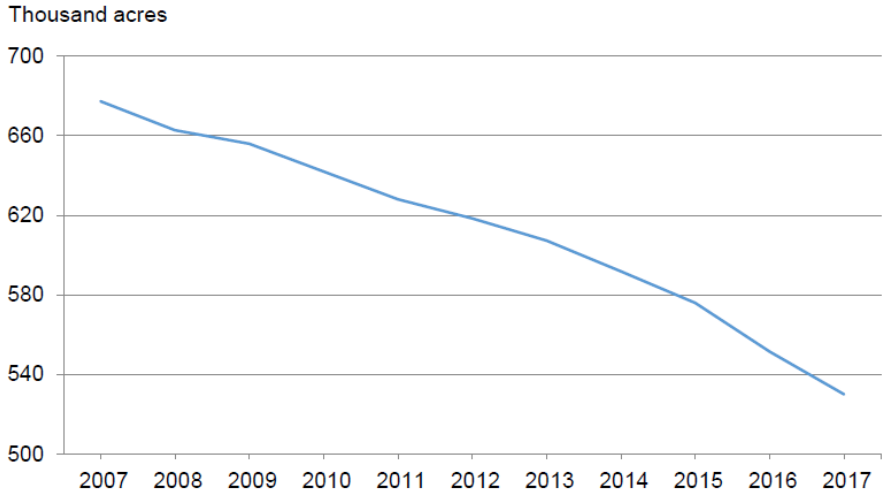
Escenario mundial

- USA

Producción de Cítricos USA



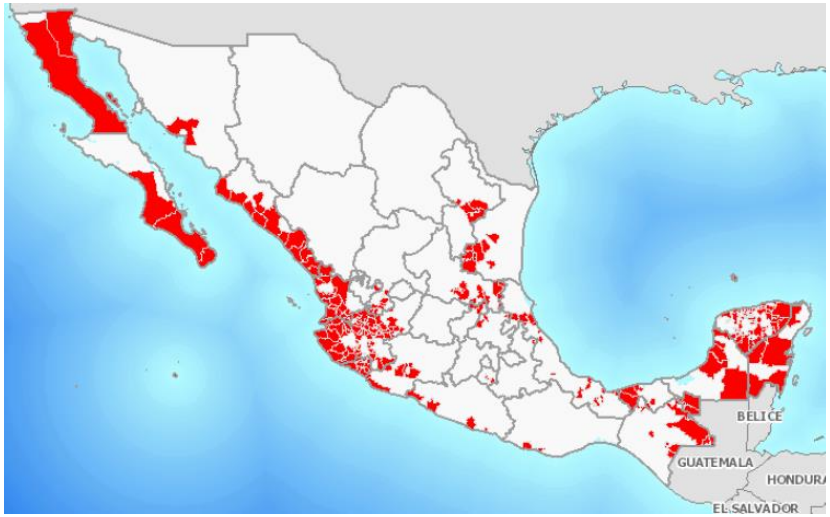
Superficie de naranjas (acres) USA



Fuente: **Citrus Fruits 2017 Summary (August 2017)** USDA, National Agricultural Statistics Service

Escenario mundial

- México



Escenario fitosanitario de HLB en México

Bloque de plantación erradicado por presencia de HLB.

Fuente: Sexto Informe Mensual Nacional Huanglongbing de los cítricos, 2017.

Escenario Mundial

- Brasil

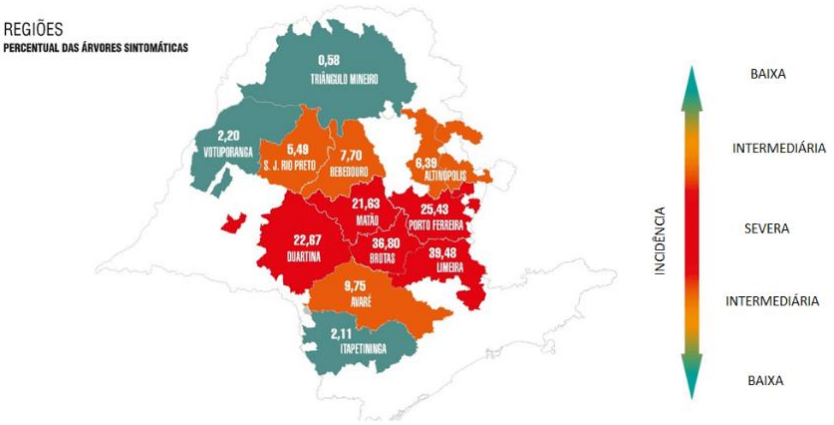
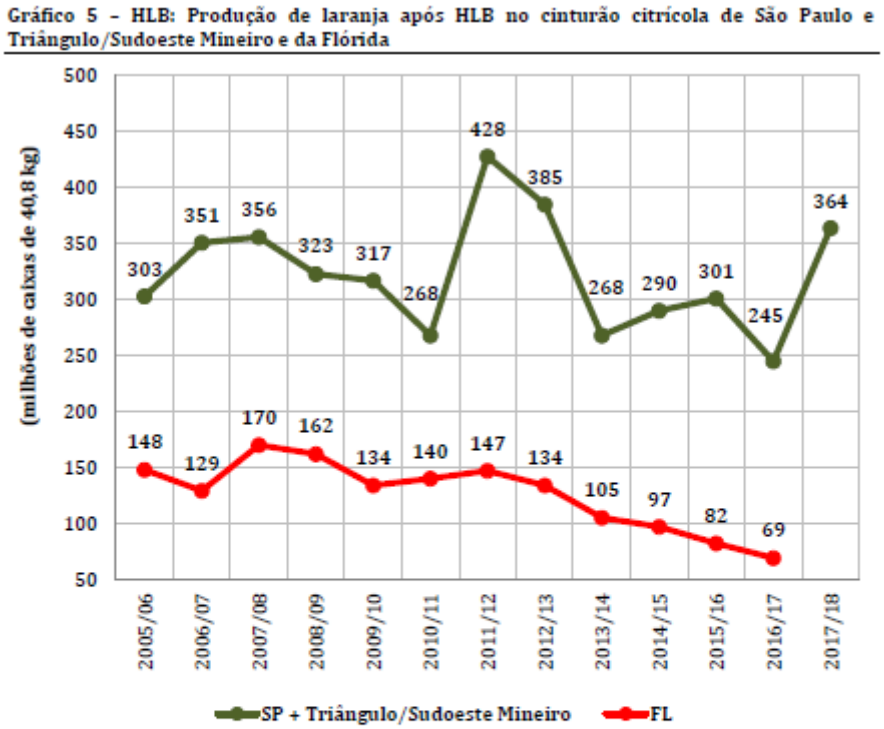


Fig. Porcentaje de Arboles sintomáticos e incidencia.



São Paulo e Triângulo/Sudoeste de Minas Gerais	Flórida
• Erradicação • Controle do psilídeo como vetor • 17% de plantas com HLB • Produtividade subiu de 539 para 931 caixas/hectare	• Ausência de erradicação • Controle do psilídeo como praga • Coquetéis, termoterapia, antibióticos • Acima de 90% de plantas com HLB • Produtividade caiu de 980 para 564 caixas/hectare

Fuente: Fundecitrus.

Escenario Mundial

- Argentina

Australasian Plant Pathol. (2017) 46:171–175
DOI 10.1007/s13313-017-0473-4

ORIGINAL PAPER

Citrus huanglongbing in Argentina: detection and phylogenetic studies of *Candidatus* Liberibacter asiaticus

Alejandra Badaracco[1] · Franco J. Redes[1] · César A. Preussler[1] · Juan P. Agostini[1]

Pruebas biológicas o indexaje

Tristeza

Psorosis

Cachexia

Exocortis

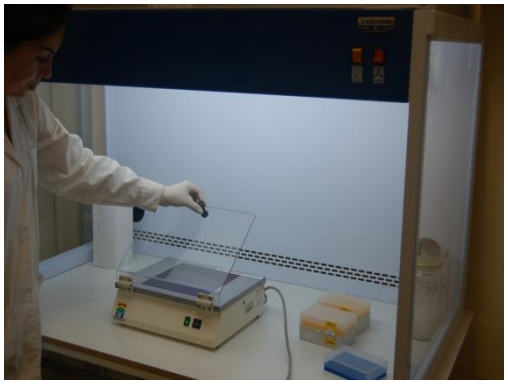
Fuente: Besoain, X. Programa de Certificación de Cítricos de la PUCV

Infraestructura y equipamiento de Laboratorio

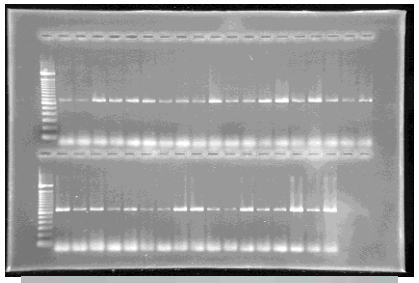
Termocilcador y centrífuga refrigerada

Centrífuga

Transiluminador



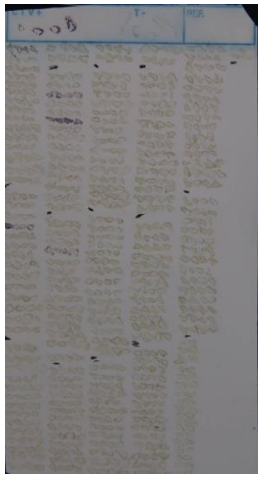
Bandas en Gel de agarosa



Microplaca-Elisa

Electroforesis

Homogenizador



IIP-Elisa

Fuente: Besoain, X. Programa de Certificación de Cítricos de la PUCV

Poster presentado en IOCV, China 2016

False positives in molecular detection of *Candidatus* Liberibacter in *Citrus* associated to endophytic bacteria

Rocio Camps and **Ximena Besoain**

Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Casilla 4-D, Quillota, Chile.

INTRODUCTION

Citriculture is severely affected by Huanglongbing (HLB) a disease that has been rapidly expanded through South, Central and North America. The disease is caused by three *Candidatus* Liberibacter. In Chile the pathogen or disease has not been detected, but it is necessary to provide high reproducible methods for the early detection of the pathogen. By the other hand, these bacteria require specific temperatures for their development. This work have the objective to verify and validate the absence of HLB in plants of Citrus Germplasm of the Experimental Station La Palma.

METHODOLOGY 1

Species	Variety
Lemon	Fino 49
Lemon	Eureka
Lemon	Messina
Orange	Fukumoto
Orange	Navelina
Orange	Lane Late
Clementine	Clemenules
Mandarine	W. Murcott
Clementine	Clemenules
Grapefruit	Star Ruby

- 10 accessions of Citrus
- Incubation of plants for 6 months under 20-25°C and 25-30°C.

- 6 shoots per plant were taken and of each 10 petioles were press in Whatman® 3 MM paper

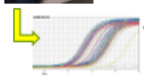
Methodology consist in the employ of a commercial kit for HLB (Kit Plant Print® HLB)

METHODOLOGY 2

- Patches from positive symptomless plants* were inoculated by grafting to: 7 Newhall orange and to 7 Eureka lemon plants
- Incubation for 10 months at 20-30°C

*positive to the commercial Kit Plant Print qPCR HLB

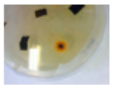
- 6 shoots per plant were taken and of each 10 petioles were press in Whatman® 3 MM paper



- qPCR results employing the methodology of the Kit Plant Print® HLB

METHODOLOGY 3

From positive plants endophytic bacteria were isolated and cultivated for 20 days at 30°C in TSA and MBK medium



Endophytic bacteria Development in a petiole cut

qPCR HLB Plant Print® Methodology

RESULTS 1

Sample	Real-time PCR (Ct)			
	HLB Universal	Juan	Juan	Luis
Fu 1	34,66	Undet.	Undet.	Undet.
Fu 2	Undet.	Nd	Nd	Nd
Fu 3	Undet.	Nd	Nd	Nd
Fu 4	36,47	Undet.	Undet.	Undet.
Fu 5	Undet.	Nd	Nd	Nd
Fu 6	Undet.	Nd	Nd	Nd
Fu 7	Undet.	Nd	Nd	Nd
N w1	Undet.	Nd	Nd	Nd
N w2	Undet.	Nd	Nd	Nd
N w3	Undet.	Nd	Nd	Nd
N w4	Undet.	Nd	Nd	Nd
N w5	Undet.	Nd	Nd	Nd
N w6	Undet.	Nd	Nd	Nd
N w7	Undet.	Nd	Nd	Nd
C-	Undet.	Nd	Nd	Nd
C-	Undet.	Nd	Nd	Nd
C+	30,08	Nd	Nd	Nd
C+	30,08	Nd	Nd	Nd

KIT comercial Plant Print® HLB

Li *et al.*, 2006

RESULTS 2

Sample	Real-time PCR HLB Universal	
	Ct before inoculation	Ct after inoculation
Fu 1	Undet.	Undet.
Fu 2	Undet.	36,74
Fu 3	Undet.	Undet.
Fu 4	Undet.	Undet.
Fu 5	Undet.	Undet.
Fu 6	Undet.	Undet.
Fu 7	Undet.	35,88
N w1	Undet.	37,70
N w2	Undet.	Undet.
N w3	Undet.	33,98
N w4	Undet.	36,78
N w5	Undet.	37,71
N w6	Undet.	Undet.
N w7	Undet.	Undet.
C-	Undet.	Undet.
C-	Undet.	Undet.
C+	32,94	29,89

RESULTS 3

Bacteria	Ct Mean	Ct SD	Plant
B7	32,56	0,22	Bu7
B13	32,43	0,28	NW1
B26	33,74	0,07	Bu7
C-	Undet.	-	-
C+	29,78	0,20	-
H2O	Undet.	-	-

- 35 endophytic bacteria were isolated
- 3 of them gave positive results for HLB

No. Isolate	Results	ID%
B7	*Acinetobacter johnsonii**	98
B13	*Ochrobactrum pseudogrignonense**	99
B20	*Acinetobacter johnsonii*	99
B22	*Acinetobacter johnsonii*	99
B26	*Sphingomonas paucimobilis**	98
B29	*Bacillus subtilis*	99
B30	*Bacillus subtilis*	99
B31	*Pseudomonas sp.*	99
B32	*Acinetobacter johnsonii*	98

Amplification of gen 16S rRNA, ID % according to Blast NCBI

* Positive to employing HLB detection kit

DISCUSSION

- The three bacteria detected with this methodology were previously identify as endophytic bacteria for other crops (Shi *et al.*, 2011; Gerbeva *et al.*, 2001).
- It seems that the design primers employed in the commercial kit are not highly specific for *Ca.* Liberibacter.

CONCLUSIONS

- The 10 *Citrus* accessions employed here, representative for the main citrus varieties employed for the Citrus Industry in Chile, gave no positive results from *Candidatus* Liberibacter.
- Three endophytic bacteria belonging to *Acinetobacter*, *Ochrobactrum* and *Sphingomonas* genera, were positively detected by a commercial kit for HLB. The results were considered as false positives.

Financial support: Vicerrectoría de Investigación y Estudios Avanzados, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso VIREA-PUCV. Project DI 037.450/2013.

Propuesta

HLB es considerada como una enfermedad grave y un factor limitante en la producción de cítricos.

Por lo tanto, mantener material resguardado, libre de virus, viroides y HLB, permitirá contar con medidas para la contención de esta enfermedad y otras.

Considerando estos aspectos, esta propuesta contempla:

- Reingeniería al germoplasma clonal de cítricos de las principales variedades actualmente comercializadas en Chile, propuesta de comprobación de estar libre de las enfermedades transmisibles por injerto y bacterias endófitas similares a HLB.

Hipótesis

- Mediante la técnica combinada Prueba Biológica (Cidro Arizona 861 S)-qPCR es posible detectar de manera eficiente viruses, viroides y bacterias tipo HLB, para formar germoplasma de cítricos libre de enfermedades transmisibles por injerto.

Objetivos Específicos

- Realizar una reingeniería al sistema de detección tradicional de patógenos transmisibles por injerto de los cítricos (pruebas biológicas y serológicas), mediante tecnología que emplea bio-amplificación en Cidro Arizona 861 S y PCR a tiempo real (qPCR).

- Desarrollo de un Banco de Germoplasma de Cítricos libre de enfermedades transmisibles por injerto de las principales variedades que se comercializan actualmente en Chile y proyectar la introducción de material de cítrico protegido a futuro.

Metodología

- Producción de plantas indicadoras de Cidro Arizona 861 S injertadas sobre limón rugoso.

- Ensayo con técnica combinada Cidro Arizona 861 S, inoculación de ETI mediante diferentes concentraciones de inóculo.

- Detección en material sano e inoculado mediante pruebas moleculares, análisis y selección del tratamiento óptimo.

Objetivo Específico 1: Realizar una reingenería al sistema de detección tradicional de patógenos trasnmisibles por injerto de los cítricos mediante técnica combinada de bio-amplificación y qPCR

Metodología

- Habilitar recinto enmallado para conservar germoplasma de cítricos.
- Análisis de Germoplasma de Cítricos mediante técnica de Bio-amplificación y qPCR (primera etapa 10 variedades)
- Banco de Germoplasma de Cítricos.

Objetivo Específico 2: Desarrollo de Banco de Germoplasma de Cítricos libre de ETI de variedades que actualmente se comercializan en Chile y proyección a futuro

Metodología basada en :

Ciencia e Investigación AGRARIA

Cien. Inv. Agr. 41(2):255-261. 2014
www.rcia.uc.cl

CROP PROTECTION

DOI: 10.4067/S0718-16202014000200012

RESEARCH NOTE

Simultaneous detection of CTV, CEVd and HSVd using Arizona 861 S1 Citron and RT-PCR

Rocío Camps, Mónica Castro, and Ximena Besoain
Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Casilla 4-D, Quillota, Chile.

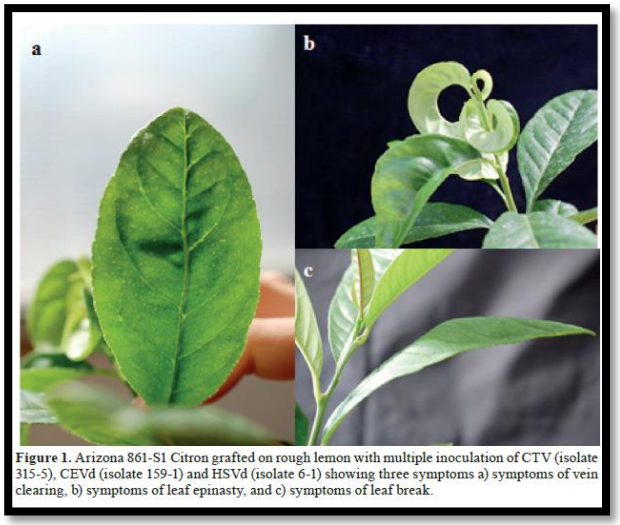


Figure 1. Arizona 861-S1 Citron grafted on rough lemon with multiple inoculation of CTV (isolate 315-5), CEVd (isolate 159-1) and HSVd (isolate 6-1) showing three symptoms a) symptoms of vein clearing, b) symptoms of leaf epinasty, and c) symptoms of leaf break.

Bio-amplificación

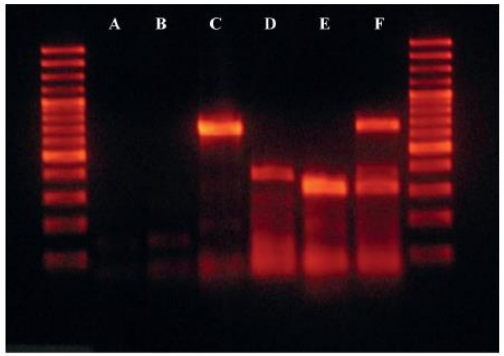


Figure 2. Agarose gel electrophoresis with products of RT-PCR. Lane A: control with water; B: Healthy plant; C: Citron inoculated with CTV (672 pb); D: Citron inoculated with CEVd (371 pb); E: Citron inoculated with HSVd (269 pb); and F: Citron with multiple inoculation.

RT-PCR

Propuesta

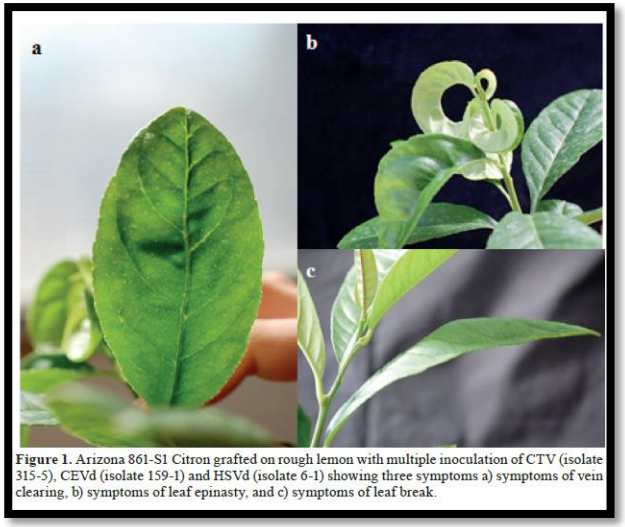
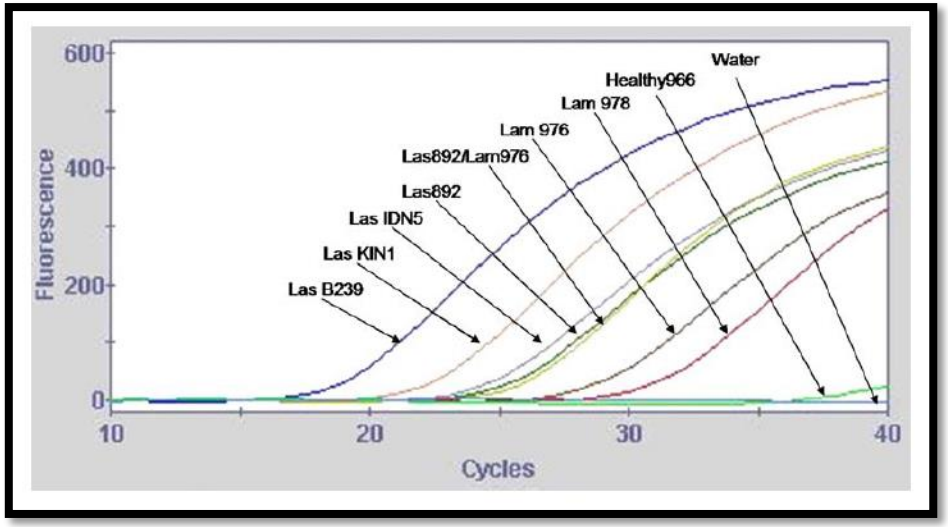


Figure 1. Arizona 861-S1 Citron grafted on rough lemon with multiple inoculation of CTV (isolate 315-5), CEVd (isolate 159-1) and HSVd (isolate 6-1) showing three symptoms a) symptoms of vein clearing, b) symptoms of leaf epinasty, and c) symptoms of leaf break.

Bio-amplificación



qPCR

La técnica combinada Cidro Arizona 861 S y qPCR es posible detectar de manera eficiente viruses, viroides y bacterias tipo HLB.

Esta tecnología, permitirá una detección más rápida, sensible y a un menor costo que asegure mantener los estándares requeridos para los cítricos.

Gracias por su atención