SITUACIÓN DE HLB EN LA REGIÓN Y EN URUGUAY

MGAP-DGSA
Salto, setiembre2015

Que se va a presentar:

- Situación del HLB en la Región.
- Situación del HLB en Uruguay.
  - ✓ *Prospección*
  - ✓ *Vigilancia del vector*
  - ✓ *Diagnóstico*
- Desafío

Detección y diseminación del HLB a nivel mundial

- Fue detectado por primera vez en **Asia (China)**, a finales del siglo XIX.
- Posteriormente se reportó en el sur de **África** a principios del siglo XX.
- En el año **2004** se confirma la presencia de la enfermedad en el **continente Americano:**
  - 2005, se detecta en **Estados Unidos** en el estado de Florida, y según la EPPO actualmente estaría en 6 estados.
  - 2007 se reporta en **Cuba** y comienza a reportarse en varios países de América Latina y el Caribe

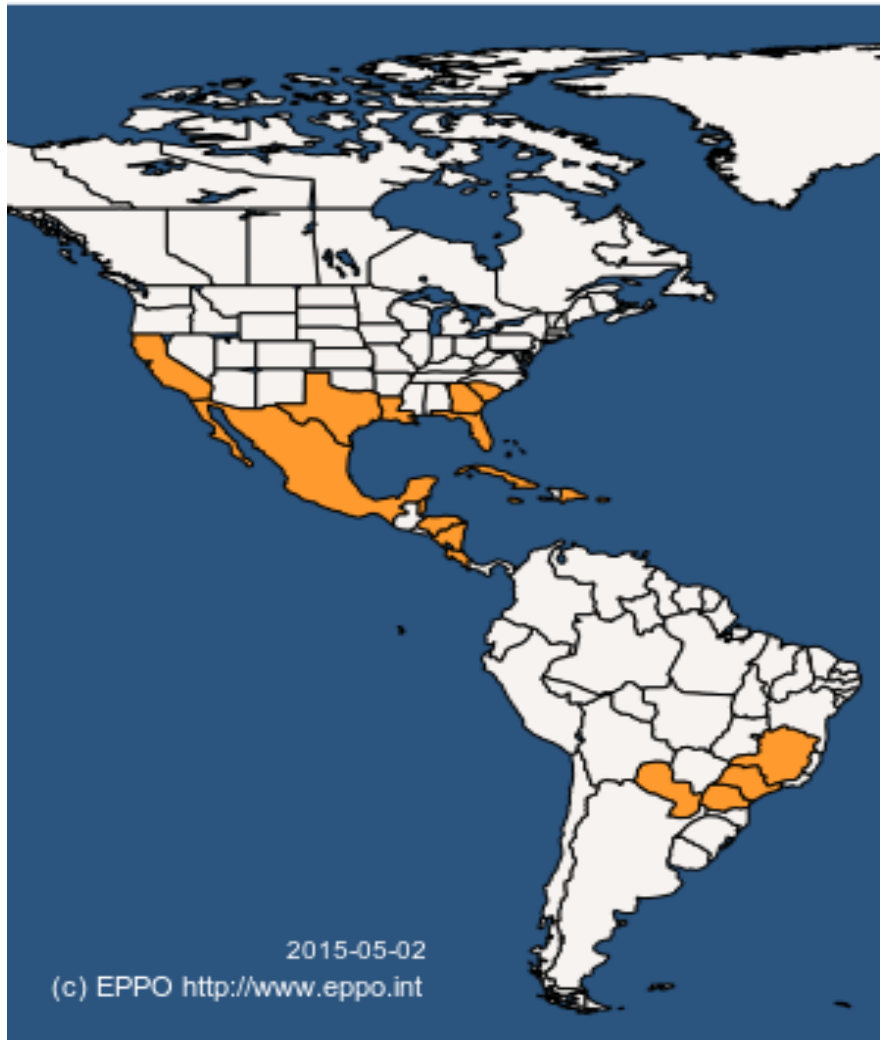
https://gd.eppo.int/taxon/LIBEAS/distribution

Detección y diseminación del HLB en América del Sur

- Los primeros focos se constatan en **Brasil (2004)** , en el estado de San Pablo, extendiéndose luego a otros estados (Paraná y Minas Gerais).

- **Paraguay (2013)** Departamentos de Amambay, Alto Paraná, Canindeyú, Cordillera, Itapuá.

- **Argentina (2012) Ausente** (Erradicada)



Estatus del HLB y su vector en los países de América Latina y el Caribe

Escenario I

(sin reporte de HLB ni su vector)

Chile

Perú

Santa Lucia

San Vicente y las Granadinas

Suriname

Escenario II

(con reporte de su vector)

Uruguay

Bolivia

Colombia

Panamá

Ecuador

El Salvador

Trinidad y Tobago

Grenada

Escenario III

(con reporte de HLB y su vector)

Argentina

Belize

Costa Rica

Cuba

Brasil

Dominica

Guatemala

Haití

Honduras

Jamaica

México

Paraguay

República Dominicana

Bahamas

San Cristóbal y Nieves

Barbados

(Reportes oficiales; Encuesta FAO, 2015)

SITUACIÓN EN URUGUAY

Plaga cuarentenaria ausente con presencia del vector *Diaphorina citri* desde el año 1991 en la zona Norte del país

PREVENCIÓN

Ejes de trabajo

INIA-INASE-FAGRO-MGAP

- Capacitación y difusión.
- ***Monitoreo del vector.***
- ***Prospección.***
- ***Diagnóstico.***
- Programa Nacional de Certificación de Plantas Cítricas.
- Investigación y Desarrollo.

Estrategia del MGAP

Acciones

- **Plan de Acción:** Programa Nacional de Vigilancia y Plan de contingencia
- **Programa de Vigilancia para el Psílido Asiático de los Cítricos (PAC)**
- **Programa Nacional de Saneamiento y Certificación de Materiales de Propagación de Cítricos**
- **Fortalecimiento de las acciones fitosanitarias a nivel de Frontera**

Monitoreo Nacional de *Diaphorina citri*

- Marzo 2014 – Marzo 2015.
- Sector-INIA-FAGRO-MGAP.
- Metodología: protocolo por golpeteo de ramas.
- Capacitación: a cargo de INIA SG.
- Monitoreos: empresas citrícolas y MGAP.
- Procesamiento y análisis de la información: DGSA-INIA.

Descripción

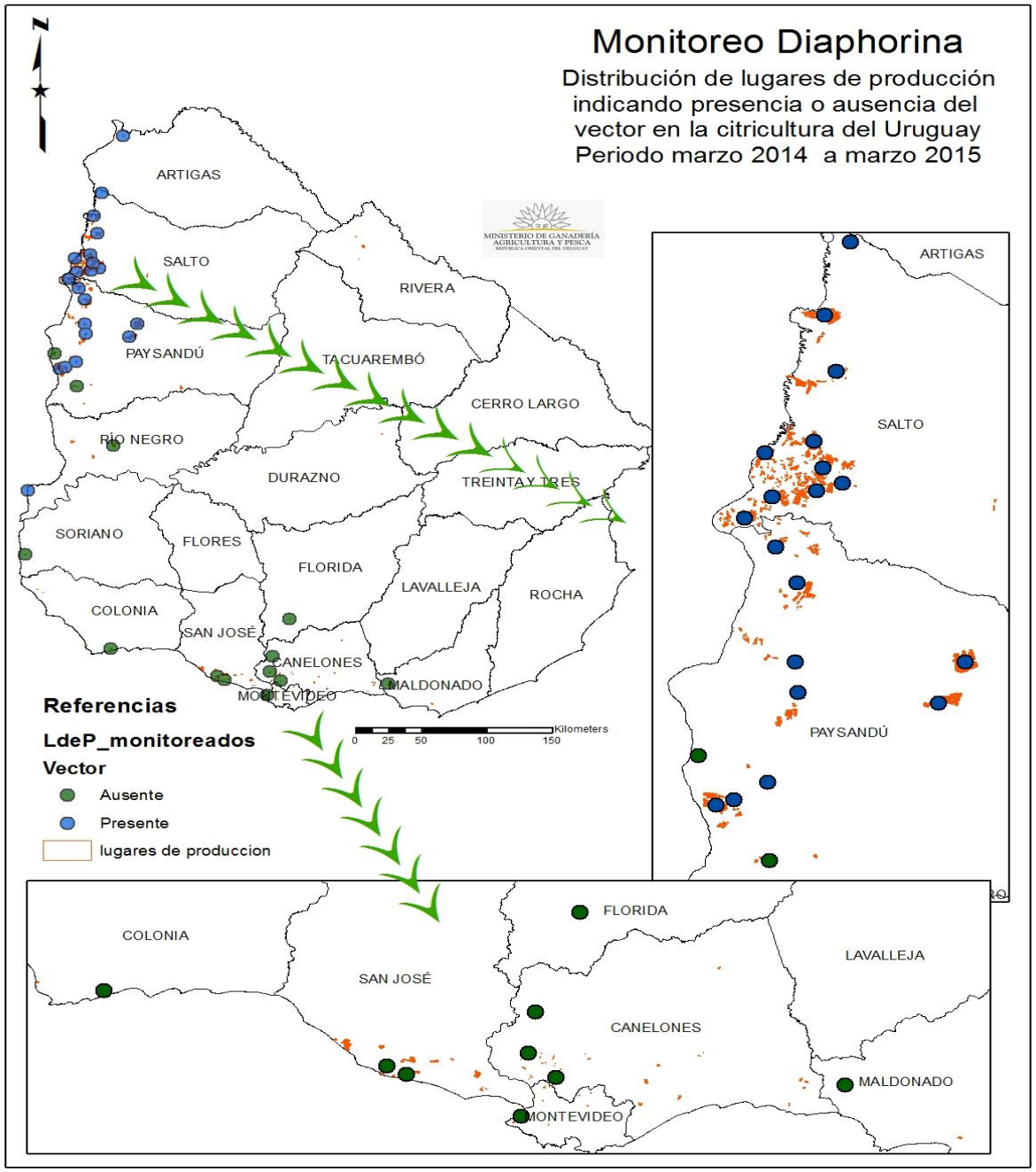
- **34 lugares de producción (LdeP)**:
  - 10 zona Sur
  - 24 zona Norte

  Representan un área de *6100 ha efectivas*: **36% de la superficie citrícola comercial**
- **134 cuadros**: **26** zona Sur y **108** zona Norte.
- **26** variedad cítricas.
- En cada cuadro se definieron estaciones de monitoreo de 10 plantas (5 o 10 por cuadro según tamaño del mismo): **793** en total, donde se realizó el conteo de adultos de *D. citri.*
- Nº de evaluaciones previstas: 12 por cada lugar: no se cumplió por lo cual para el resultado se tiene en cuenta el Nº de observaciones por cuadro individual.

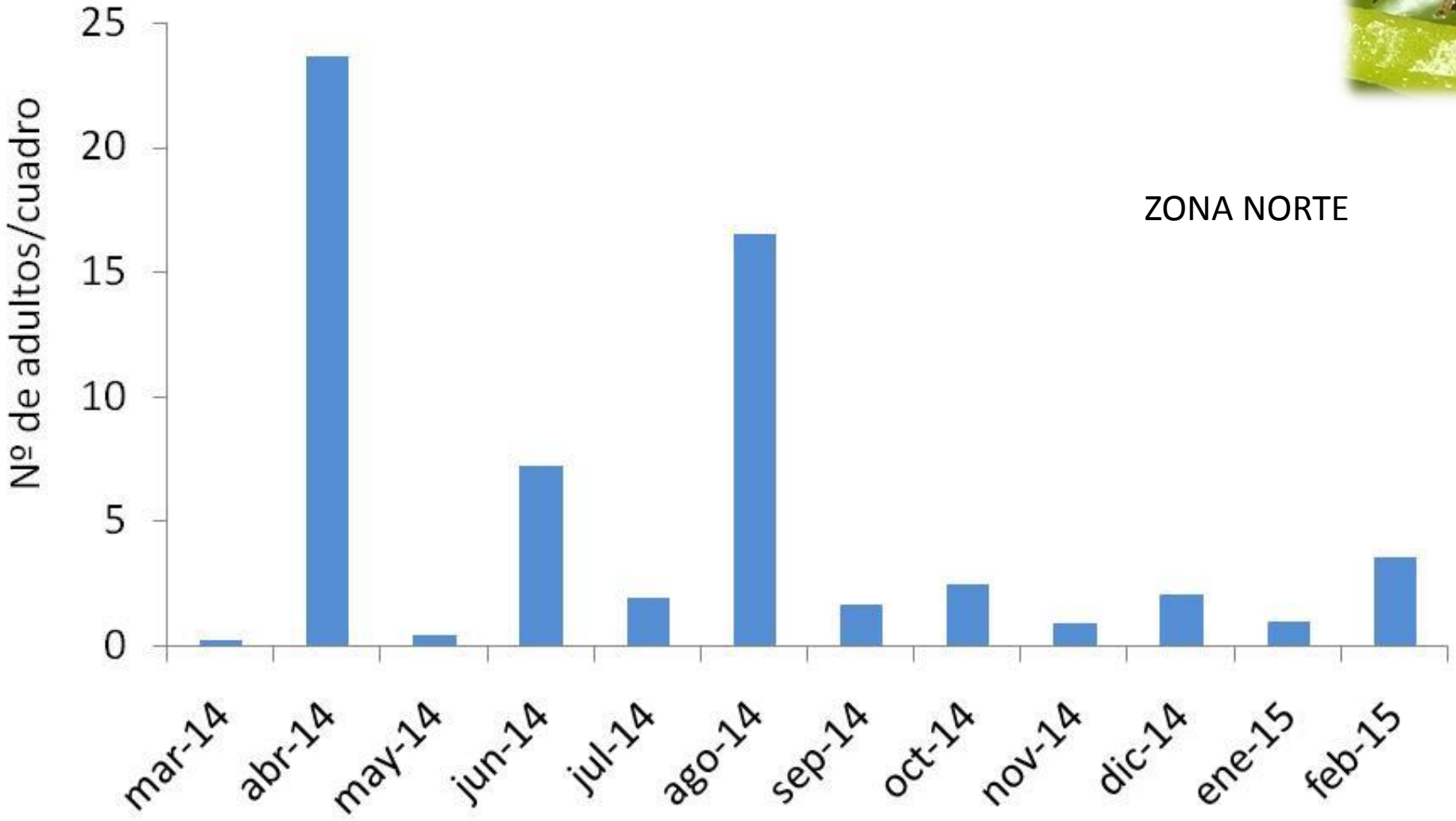
Análisis de datos y Resultados

- Para comparar variedades y LdeP entre sí: Variable de trabajo: ***Nº de adultos capturados por cuadro:*** suma de todos los adultos capturados en las 5 estaciones (50 plantas).

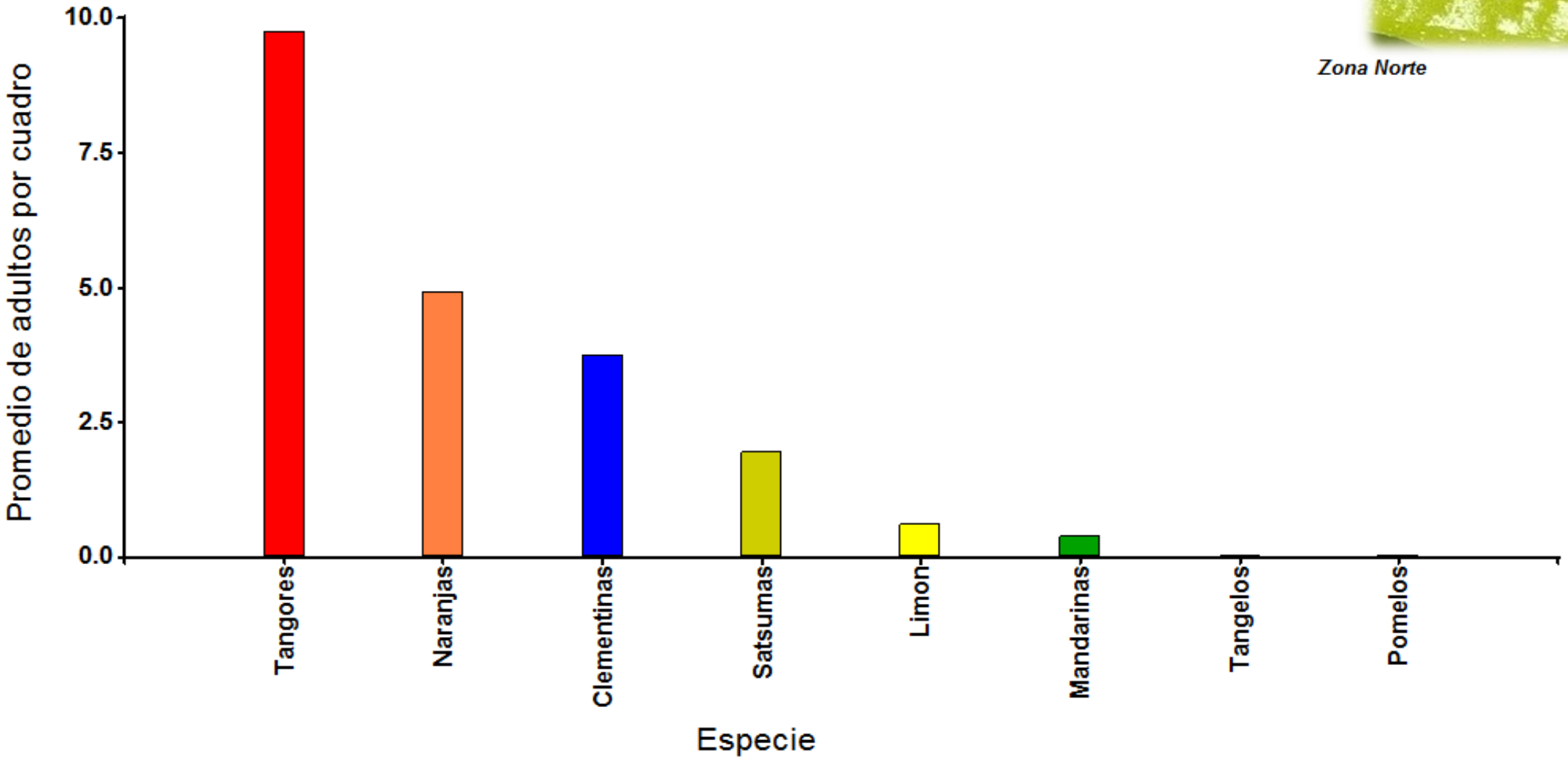
- Solo se constató presencia en los LdeP de la zona Norte: análisis de datos de los 24 LdeP y 108 cuadros.



Número promedio de adultos de *Diaphorina citri*, según cuadro evaluado



Número promedio de adultos de *Diaphorina citri por* cuadro evaluado, según especie



Conclusiones

- La presencia de adultos de *Diaphorina citri* solo se constató en los predios citrícolas de la zona norte del país.

- La mayor cantidad de adultos capturados fue encontrada en los tangores y dentro de ellos en el cultivar Ortanique y en segundo lugar, las naranjas y dentro de ellas el cultivar Navel.

- La mayor frecuencia de adultos capturados promedio por cuadro (suma de las 5 estaciones en el cuadro) es menor a 25 ejemplares.

- Se evidencia una variabilidad importante de la captura de *D. citri* entre lugares de producción cercanos entre sí.

Prospección

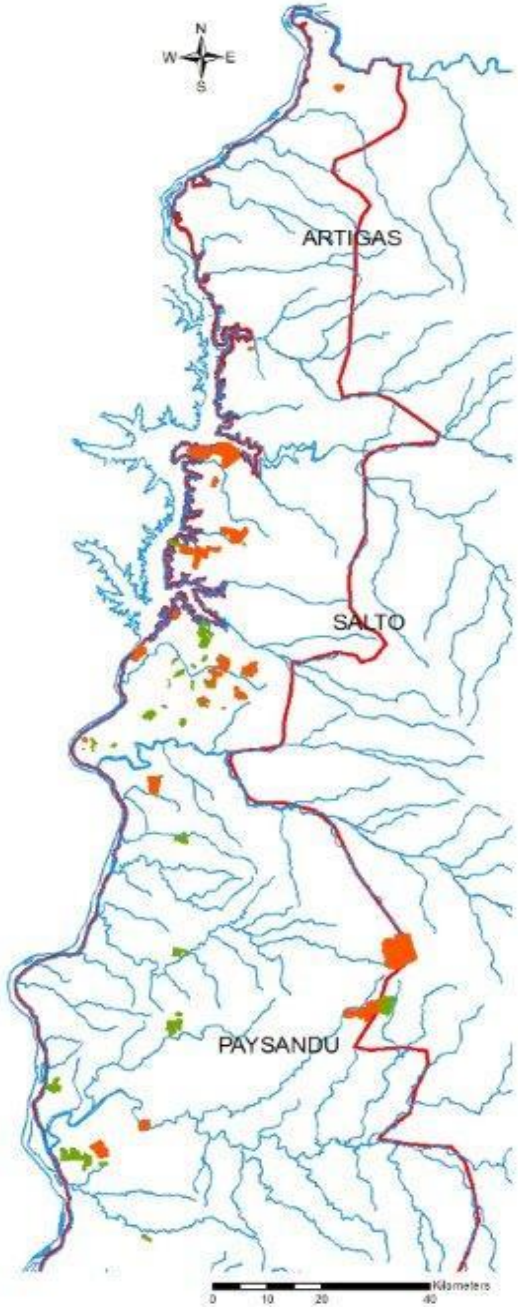
Estrategia:

Criterios

- Plantaciones de cítricos próximas a zonas fronterizas.
- Cuadros o LdeP en los cuales la presencia del PAC sea superior a 10 adultos.
- Plantaciones menores a 10 años y/o con cambios de copa.

Área de trabajo:

Ubicada en el área de mayor producción citrícola del país, comprendida al oeste de los departamentos de Salto y Paysandú y la inclusión del departamento de Artigas, no por número de plantas de cítricos, sino por su estratégica ubicación fronteriza con Argentina y Brasil.

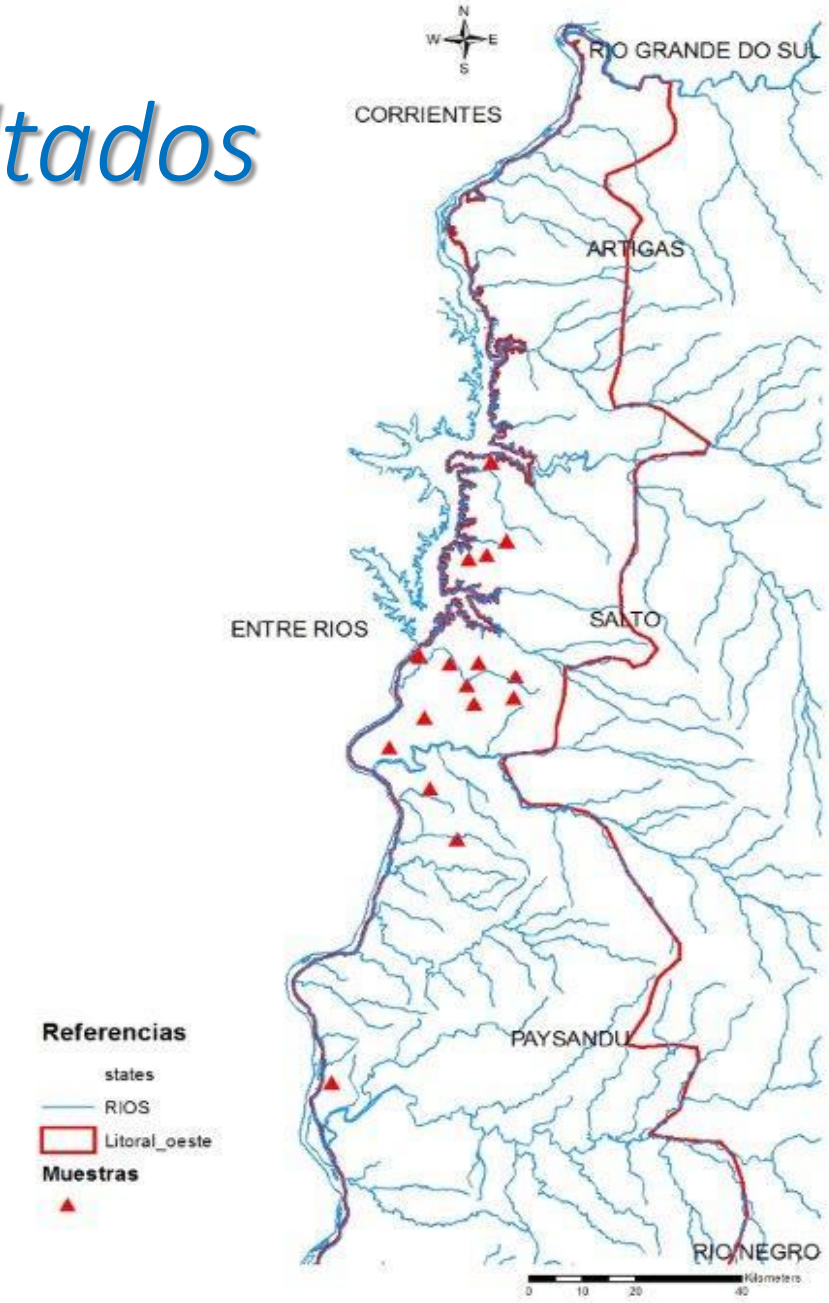


Resultados

Número de lugares de producción	inspeccionados con presencia del vector con síntomas sospechosos de HLB con muestras enviadas	**74** 35 7 6
Número de plantas	inspeccionadas totales > 10 años < 10 años	**1.677.075** 515,953 1.161.122
Número de cuadros	totales con síntomas sospechosos de HLB	**1528** 39
Número de muestras extraídas	totales de material vegetal con síntomas similares a HLB descarte primario de brotes con *D. citri* enviadas al laboratorio	**47** 43 6 4 **37**

Extracción de muestras y resultados

Especie cítrica	Muestras	Resultado
Mandarinas	1	Negativo
Naranjas	30	Negativo
Satsumas	1	Negativo
Tangores	5	Negativo
Total	**37**	



Consideraciones generales

- En base a la información relevada y disponible en la “geodatabase de cítricos”:
  - Solo un 20% de los LdeP del área de trabajo presentaban algunas de las prioridades fijadas para la prospección.
  - Se seleccionaron 74 LdeP incluidos suman **8.178 ha** lo que representa el **50% del total del área citrícola efectiva del país.**
  - En **48%** de los mismos, (35 de 74), **se constató la presencia del vector.**

GENÉTICA
SANIDAD
PRODUCTIVIDAD

Diagnóstico de HLB por PCR

MGAP
Servicios Agrícolas
DIVISIÓN ANÁLISIS Y DIAGNÓSTICO

JOSÉ ARTIGAS
UNIÓN DE LOS PUEBLOS LIBRES
BICENTENARIO.UY

Lic. Mariana Richero

Unidad de Biología Molecular
Laboratorios Biológicos
DGSA-MGAP

¿PCR?

Objetivo:
Obtener un gran número de copias de un fragmento particular de ADN a partir de una cantidad mínima original.

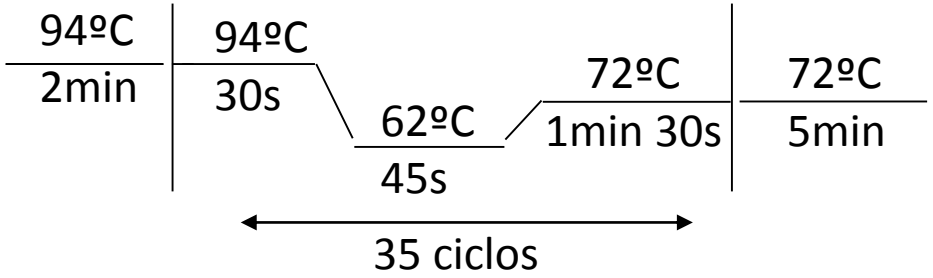
¿PCR en el diagnóstico?

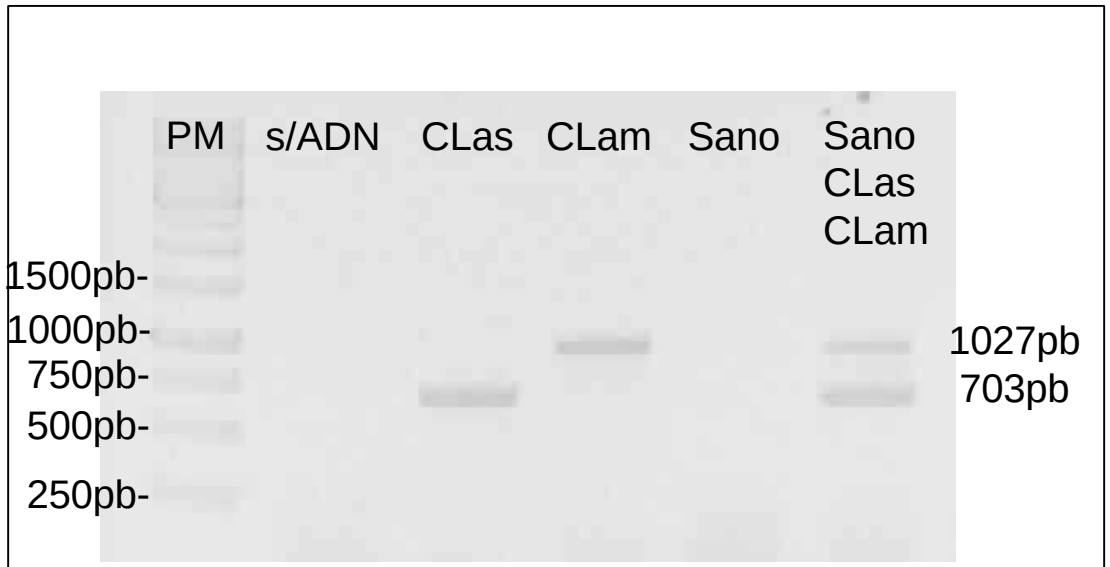
A partir de una mezcla compleja de ADN,
se puede realizar la amplificación con *primers* específicos de un fragmento dado de ADN de una bacteria y luego visualizar el amplicón en un gel de agarosa

Multiplex PCR para HLB

- Procesamiento del material vegetal
- Extracción de ADN (CTAB, Murray & Thompson, 1980)
- Multiplex PCR

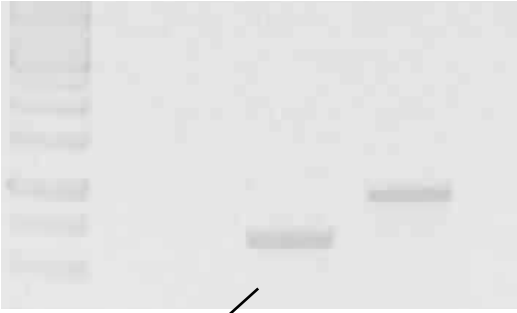
Primers	Secuencia (5'-3')	Tamaño	Referencia
RPLA2	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT	Clas: 703bp Claf: 669bp	Hocquellet *et al.*, 1999
RPLJ5	CAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA		
GB1	AAGTCGAGCGAGTACGCAAGTACT	1027bp	Teixeira *et al.*, 2005a, b
GB3c	CCAACTTAATGATGGCAAATATAG		



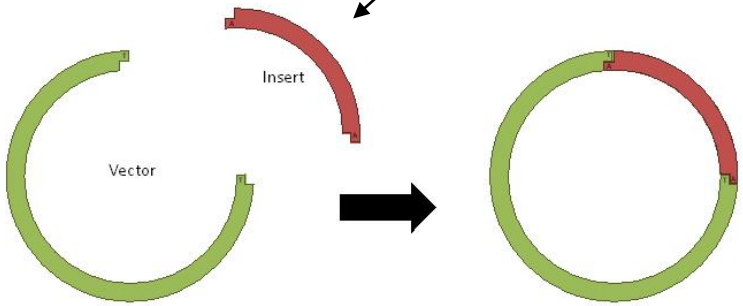


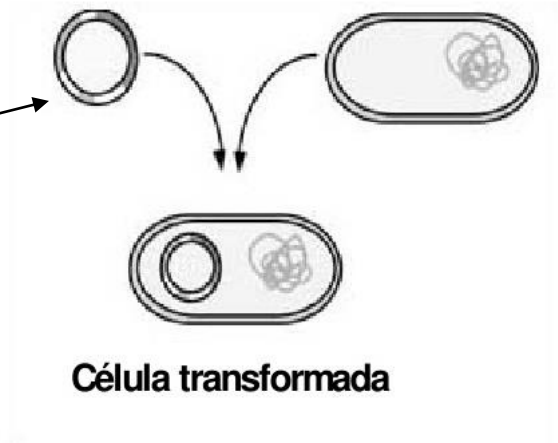
Controles positivos

-ADN plantas infectadas con CLam y CLas (FUNDECITRUS, Brasil)
-ADN planta infectada con CLas (SENASICA, México)



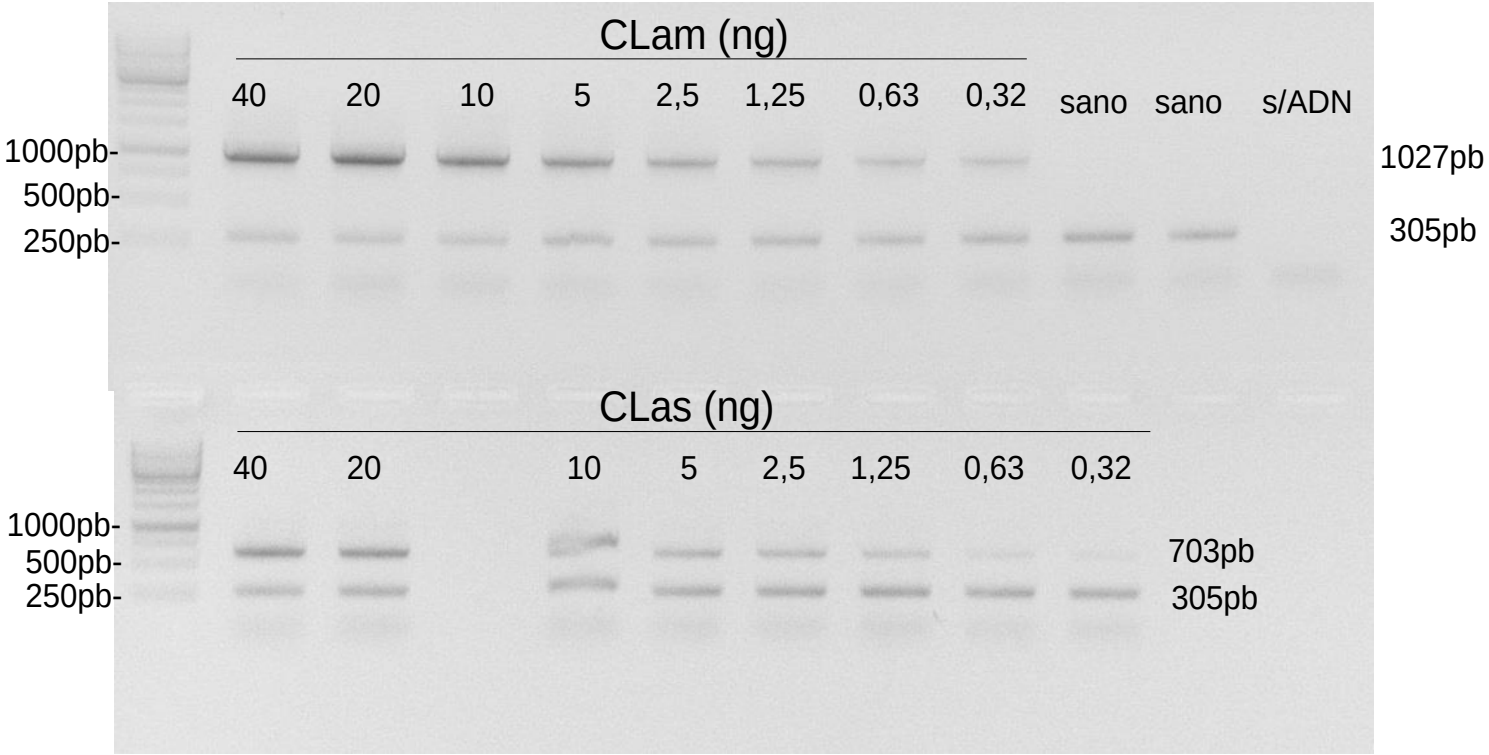
C. Liberibacter spp. no es cultivable!!





Cepas de *E. coli* productoras de plásmidos
Controles positivos de forma ilimitada

¿Cómo identificar Falsos negativos?

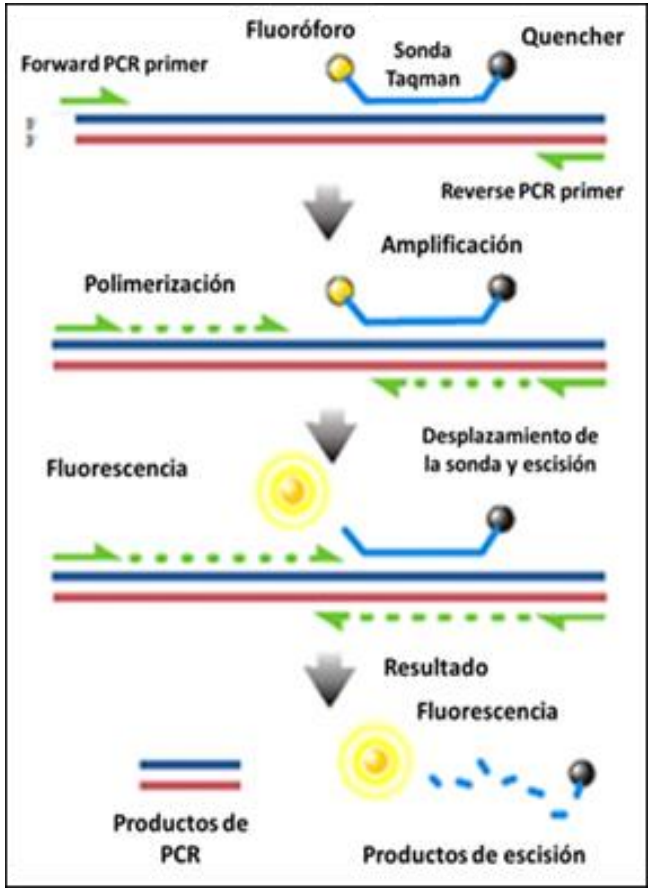


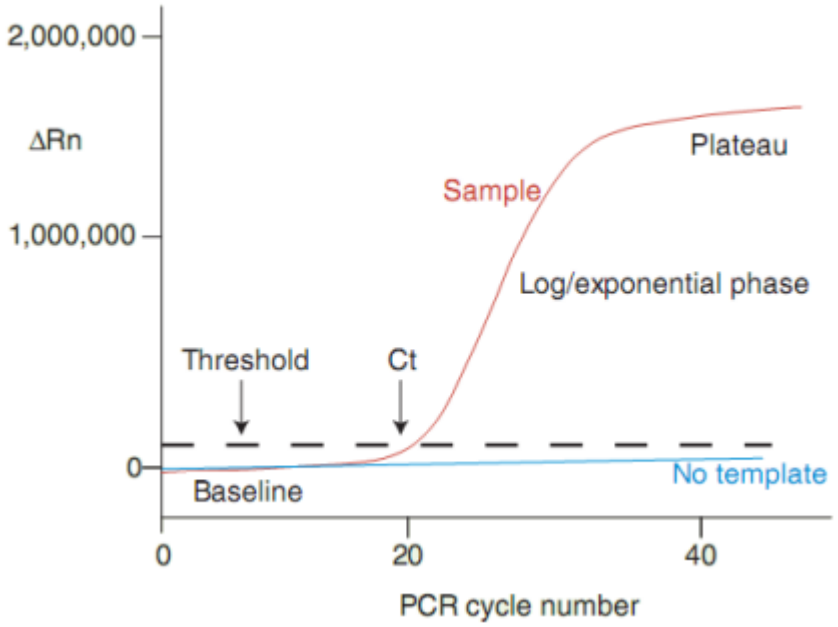
Control interno:
Un fragmento de ADN que se amplifica simultáneamente con el ADN blanco en el mismo tubo de reacción.

Primers	Secuencia (5'-3')	Referencia
28C	GCTATCCTGAGGGAAACTTC	Cullings, 1992
28new	TCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	Richero, 2012

¿PCR Real Time?

Permite amplificar y simultáneamente cuantificar el ADN amplificado.
Se emplean sondas marcadas con fluorocromos.





Ct: el número de ciclo de la PCR donde la emisión de fluorescencia es mayor que el nivel mínimo de detección (umbral).

PCR Real Time	PCR convencional
Amplificación y detección simultanea	Amplificación y detección en dos etapas separadas
Detección durante la fase exponencial temprana (máxima eficiencia)	Detección en punto final (efecto *plateau*)
Mayor especificidad con el uso de sondas	Menor especificidad
Equipamiento e insumos muy costosos	Equipamiento y reactivos de menor costo

HLB por PCR Real Time

- Basado en protocolo USDA (WI-B-T-D-2)

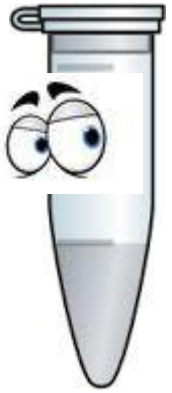
Un par de *primers* y sonda marcada con FAM

específicos para *Ca.* Liberibacter spp.

Un par de *primers* y sonda marcada con TET

específicos para citocromo oxidasa de plantas

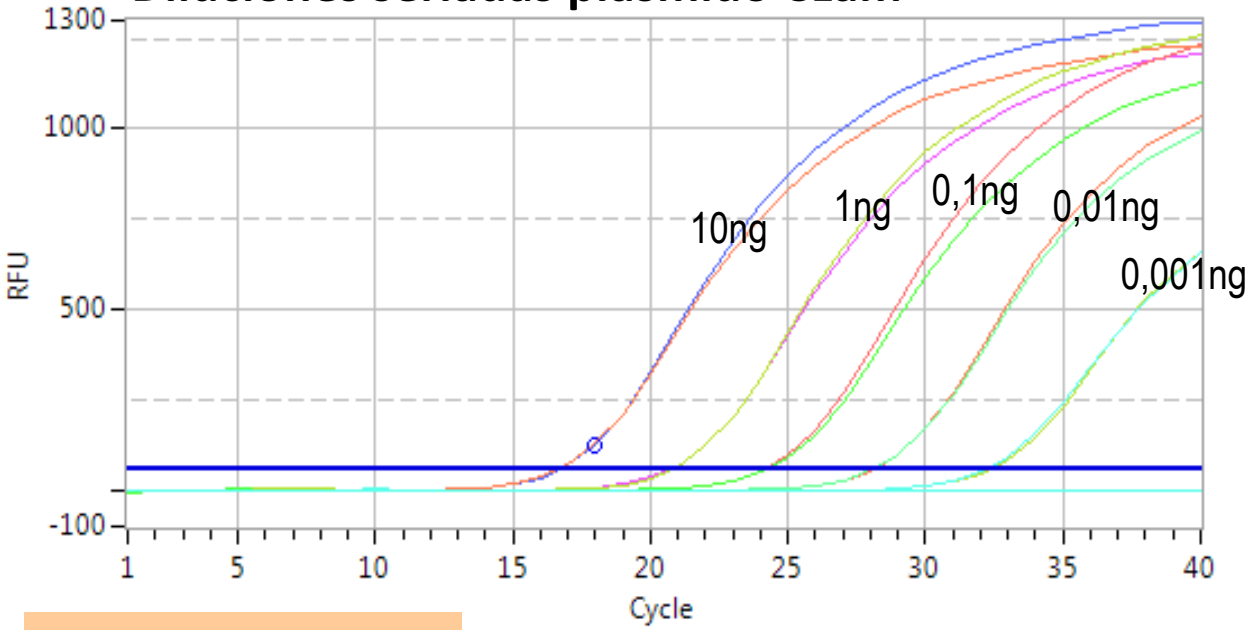
Control negativo: $Ct_{FAM}=0$ y $Ct_{TET}=0$
Control interno: $0 < Ct_{TET} < 38$
Control positivo: $0 < Ct_{FAM} < 32$



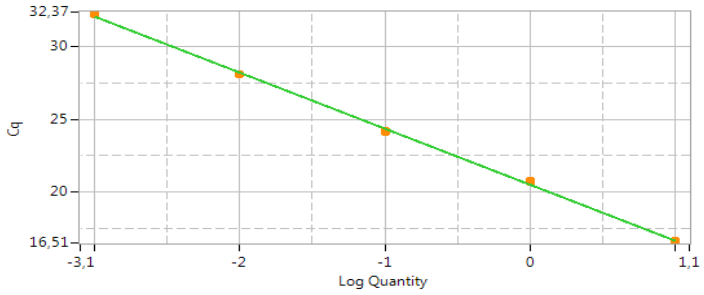
Modificaciones

- Volumen de reacción 25/12,5
- TET/HEX

Diluciones seriadas plásmido CLam



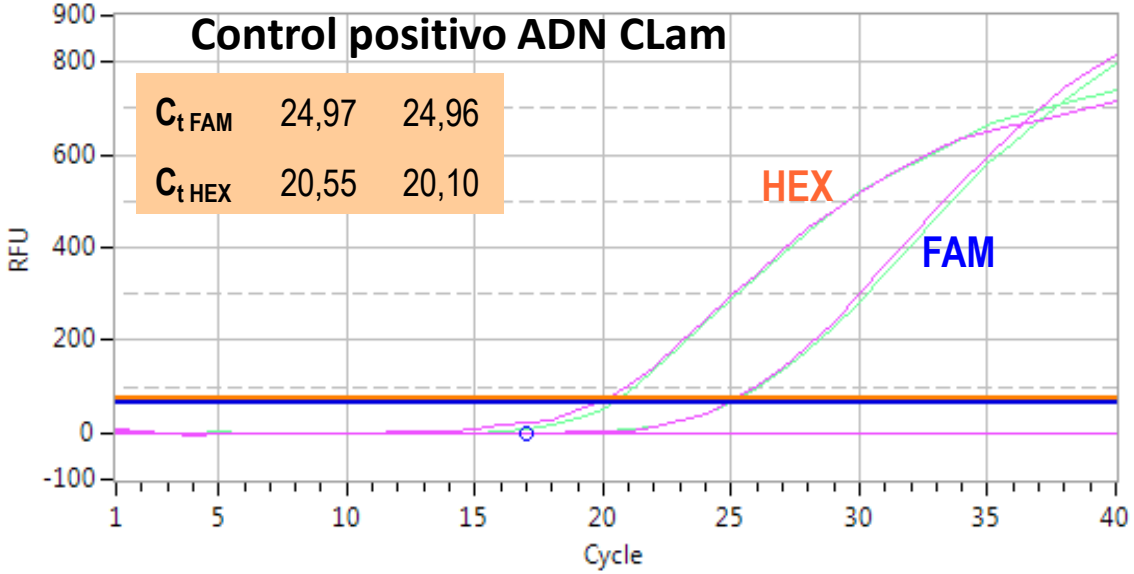
Conc.	C_t	C_t
10ng	16,68	16,61
1ng	20,71	20,76
0,1ng	24,17	24,24
0,01ng	28,09	28,07
0,001ng	32,27	32,19



Efficiency = 81,819%;
y = -3,851x + 20,528; R2 = 0,9992

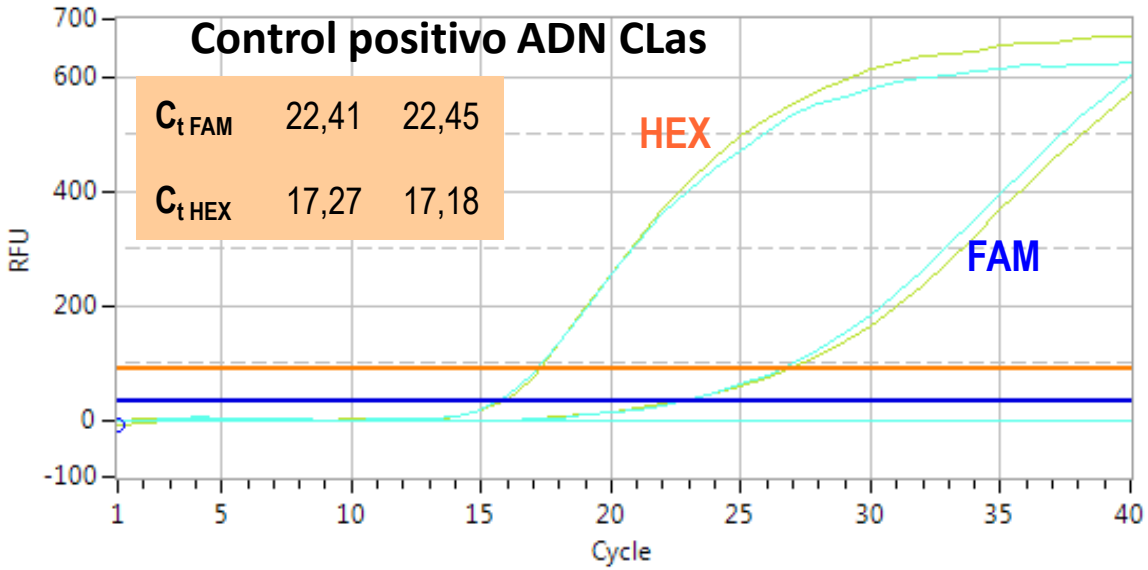
Control positivo ADN CLam

$C_{t\ FAM}$	24,97	24,96
$C_{t\ HEX}$	20,55	20,10



Control positivo ADN CLas

$C_{t\ FAM}$	22,41	22,45
$C_{t\ HEX}$	17,27	17,18



Perspectivas:

Validación de la detección de HLB en tejido vegetal por PCR en tiempo real (Sensibilidad, Repetibilidad y Reproducibilidad)

Optimización de la extracción de ADN del vector

Puesta a punto de la detección de HLB en el vector por PCR en tiempo real.

Referencias:

Teixeira, D. C., Danet, J. L., Eveillard, S. & 8 other authors (2005). Citrus huanglongbing in Sa˜o Paulo State, Brazil: PCR detection of the '*Candidatus* Liberibacter' species associated with the disease. *Mol Cell Probes* 19, 173–179.

Hocquellet, A., Toorawa, P., Bové, J.-M., 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 β operon. *Mol Cell Probes* 5, 373-9

Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of highmolecular weight plantDNA. *Nucleic Acids Res* 239,487-91

Diseño del primer 28new

Alineamiento de secuencias
del gen de la ARN 28S (Clustal W)

99 pertenecientes a plantas
(las más similares a *Citrus*)
50 pertenecientes a hongo

	Número de acceso	secuencia	
PLANTAS	gi|30230581|gb|AY260012.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	400
	gi|57340754|gb|AY727939.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|19919600|gb|AF479159.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|57340755|gb|AY727940.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|57340767|gb|AY727952.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|57340769|gb|AY727954.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	401
	gi|188526360|gb|EU544383.1|	GACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	401
	gi|19919631|gb|AF479190.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	400
	gi|9799449|gb|AF274651.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	400
	gi|9799444|gb|AF274646.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	413
	gi|19919568|gb|AF479127.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	399
	gi|133918089|emb|AM235557.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTGACATGTGTGCGAGTCAAC	400
HONGOS	gi|425905829|gb|KC015062.1|	GACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	434
	gi|425905828|gb|KC015061.1|	GACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	365
	gi|291170420|gb|GU250924.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	437
	gi|296905299|gb|GQ254672.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATTCGTGCGAGTGTTC	455
	gi|219960795|gb|FJ568335.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960610|gb|FJ568150.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960783|gb|FJ568323.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960608|gb|FJ568148.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960792|gb|FJ568332.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960786|gb|FJ568326.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960782|gb|FJ568322.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960777|gb|FJ568317.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279
	gi|219960760|gb|FJ568300.1|	GGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTGTGCGAGTGTTT	279

Zona a 305pb *downstream* del primer 28C existe una secuencia altamente conservada en plantas que difiere claramente de la secuencia conservada en hongos

DESAFÍO

Mantener la citricultura libre de HLB

- *Evitando el ingreso ilegal de material vegetal (cítricos y otros hospedantes), fortaleciendo los controles fronterizos.*
- *Consolidando el Programa de Certificación de Plantas Cítricas.*
- *Contando con normas legales que respalden las acciones de gestión del HLB.*
- *Aumentando las acciones de Vigilancia del Vector y Prospección de montes.*
- *Mejorando la capacidad de diagnóstico.*

Para prevenir el ingreso y diseminación de la enfermedad la DGSSAA recomienda que se realicen las siguientes acciones:

Utilizar yemas, plantines o plantas provenientes de viveros certificados.

No ingresar ilegalmente material vegetal (yemas, injertos, plantines, etc.) de cítricos u otras plantas hospedantes de la bacteria.

Inspeccionar frecuentemente sus montes comerciales para detectar tempranamente síntomas de la enfermedad.

Monitorear la presencia Diaphorina citri en los montes comerciales a través de la utilización de golpeo de ramas, trampas adhesivas amarillas e inspección de brotes en crecimiento .

Por consultas o ante la sospecha de síntomas comunicarse al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección General de Servicios Agrícolas.

Montevideo: Avda. Millán 4703. Mdeo. Uruguay. Tel: 23098410.

Salto: Julio Delgado 35. Salto, Uruguay. Tel: 47328054.

Paysandú: 18 de julio 888. Paysandú, Uruguay. Tel: 47226126

TODOS JUNTOS PODEMOS PREVENIR EL INGRESO DE ESTA AMENAZA PARA LA CITRICULTURA

Agradecimientos: Por las imágenes al Dr. Silvio Lopes, Fundecitrus, Brasil, Lic. Carlos Bentancur de Facultad de Agronomía, Uruguay.

INIA Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria URUGUAY · MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA · FACULTAD DE AGRONOMIA · INASE URUGUAY

Año 2014

Boletín informativo sobre Plagas Cuarentenarias

Huanglongbing

Huanglongbing (ex Greening) o HLB

Es considerada la enfermedad más grave que afecta a los cítricos en el mundo. En Uruguay la enfermedad no ha sido reportada. No obstante ya se encuentra en el sur de Brasil (Sao Pablo, 2004), Argentina (Misiones, 2012) y Paraguay (2013).

Agente causal y daños

Es una bacteria llamada Candidatus Liberibacter spp. Los hospederos del patógeno están restringidos a la familia de las Rutáceas, en especial a las especies de cítricos. Las plantas jóvenes que se encuentran infectadas nunca llegan a producir y las plantas adultas se tornan improductivas a los 4 años de infectadas.

Vector y transmisión

En Uruguay se encuentra presente el psílido asiático de los cítricos, Diaphorina citri, el más eficiente transmisor de la bacteria. Prefiere oviponer y alimentarse sobre brotes en crecimiento. Una vez que el psílido adquiere la bacteria al alimentarse de plantas contaminadas, nunca más pierde la capacidad de transmitirla.

Formas de ingreso

La bacteria podría ingresar a Uruguay a través de material vegetativo de cítricos, otras plantas hospedantes, como Murraya spp. que se encuentren contaminadas. También a través del insecto vector, Diaphorina citri, que se encuentre infestado.

Síntomas

El moteado difuso irregular en hoja es el síntoma típico de la enfermedad, sin embargo, puede confundirse con otros problemas. En general, los síntomas iniciales aparecen en una rama que se destaca del resto por su coloración más amarilla en contraste con el verde de las ramas no afectadas. A medida que la enfermedad avanza, los síntomas comienzan a aparecer en otras ramas.

Adultos de D. citri

Ninfa 5º estadio

Grupo de ninfas

En algunos casos se observa engrosamiento y aclaramiento de las nervaduras de las hojas, con aspecto corchoso.

La sintomatología de HLB podría confundirse con síntomas de deficiencias nutricionales, clorosis variegada de los cítricos (CVC) y gomosis.

HLB · Zinc · Magnesio · Hierro · Manganeso

En los frutos se observa asimetría con respecto al eje longitudinal, reducción del tamaño, manchas de coloración verde pálido sobre la superficie e inversión del color próximo a la maduración. También es común el aborto de semillas y coloraciones amarronadas en los haces vasculares.

MGAP
Servicios Agrícolas

URUGUAY LIBRE DE HLB

El HLB es una enfermedad que destruye los cítricos. Una vez infectada, la planta no tiene cura.

Se transmite por un insecto que está en nuestro país.

No está presente en Uruguay, pero sí en muchos países incluidos Argentina, Brasil y Paraguay.

Contamos contigo para que no ingrese al país.

No ingreses plantas o yemas provenientes de otros países.

Utiliza plantas certificadas para tus montes, casa o comercio. La etiqueta de INASE garantiza que son materiales sanos.

Consulta a técnicos del MGAP ante cualquier duda:
DGSA Salto: Julio Delgado 35 | 473 28054
DGSA Paysandú: 18 de Julio 888 | 472 26126
DGSA Montevideo: Av. Millán 4703 | 2309 84 10 int. 116

MANTENER LIBRE DE HLB NUESTRA CITRICULTURA ES TAREA DE TODOS

MANTENER LIBRE DE HLB NUESTRA CITRICULTURA ES TAREA DE TODOS