



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria
Argentina

PROBLEMÁTICAS DE ALTO IMPACTO REGIONAL

HLB DE LOS CITRICOS

Alberto M. Gochez

VIRUS RUGOSO DEL TOMATE (ToBRFV)

Veronica Obregon

INTA EEA Bella Vista
Corrientes, Argentina

CONSEJO FEDERAL AGROPECUARIO
1era REUNIÓN REGIONAL NEA 2024
22/octubre/2024

HLB: HuangLongBing. Nombre propuesto por el Prof Kong Xian Lin
(Guangdong)





Los síntomas del HLB en citrus son: clorosis difusas en ramas, clorosis asimétrica en hojas, nervaduras engrosadas de color amarillento o marrón con caída temprana, deformidad y maduración invertida de frutos.



FONTAGRO

Proyecto Fontagro ATN/RF- 17232 – RG

**Control sustentable del vector del HLB
en la Agricultura Familiar en Argentina,
Uruguay, Paraguay y Bolivia**



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria

Secretaría de Agricultura,
Ganadería y Pesca



Ministerio de Economía
Argentina

El HLB es el mayor riesgo para la citricultura argentina (y mundial)

El 90% de la producción cítrica en Florida se ve comprometida por el HLB y las condiciones agrometeorológicas

<https://citrusforum.es/el-90-de-la-produccion-citricola-en-florida-se-ve-comprometida-por-el-hlb-y-las-condiciones-agrometeorologicas/>

Los expertos advierten de que la situación del HLB en Brasil es alarmante

<https://www.fecier.org.ar/public/noticias/5959-los-expertos-advierten-de-que-la-situacion-del-hlb-en-brasil-es-alarmante.html>



<http://www.newyorker.com/online/blogs/elements/2013/04/the-green-death.html>



FONTAGRO

Proyecto Fontagro ATN/RF- 17232 – RG

Control sustentable del vector del HLB
en la Agricultura Familiar en Argentina,
Uruguay, Paraguay y Bolivia



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria

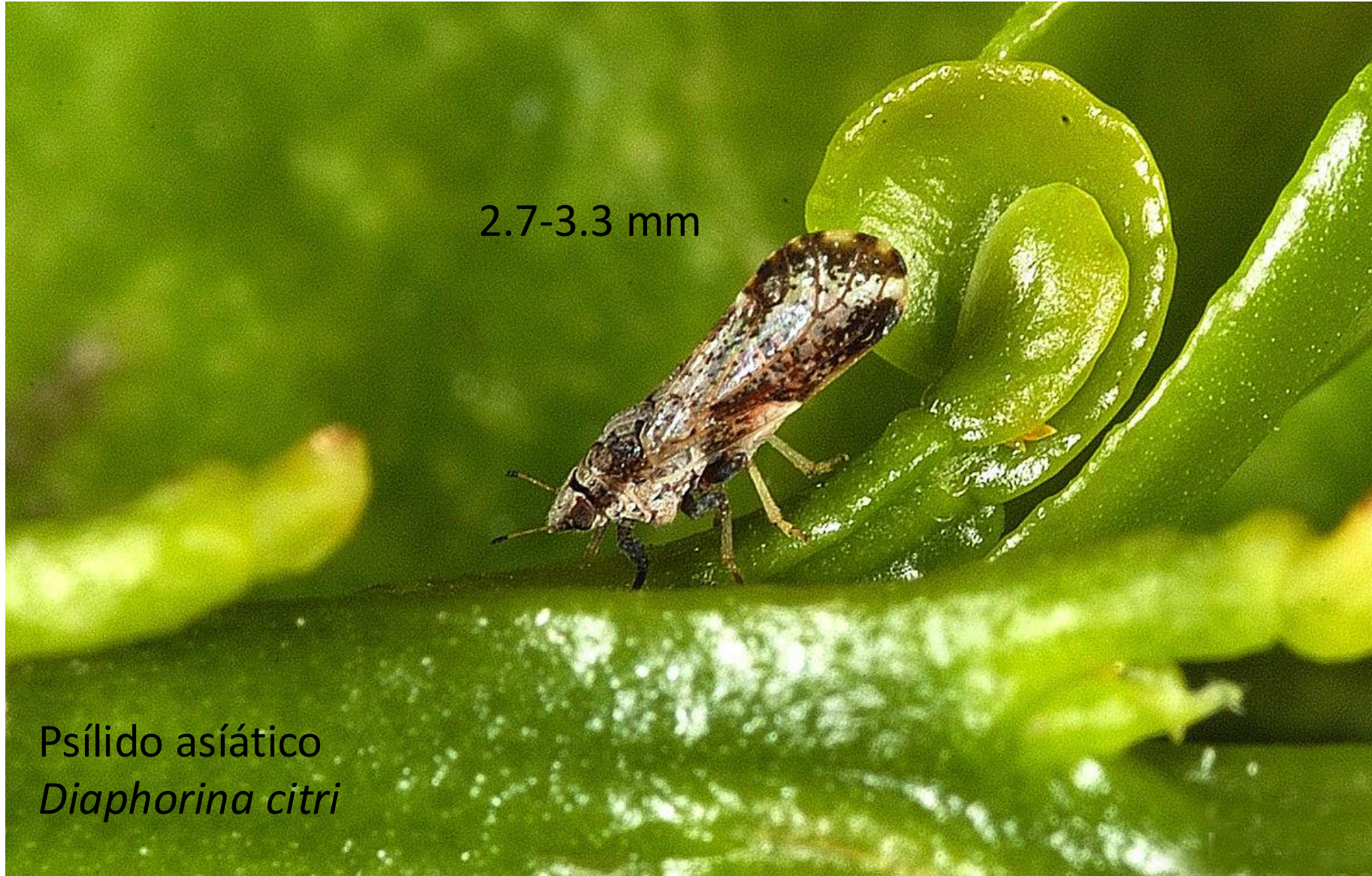
Secretaría de Agricultura,
Ganadería y Pesca



Ministerio de Economía
Argentina

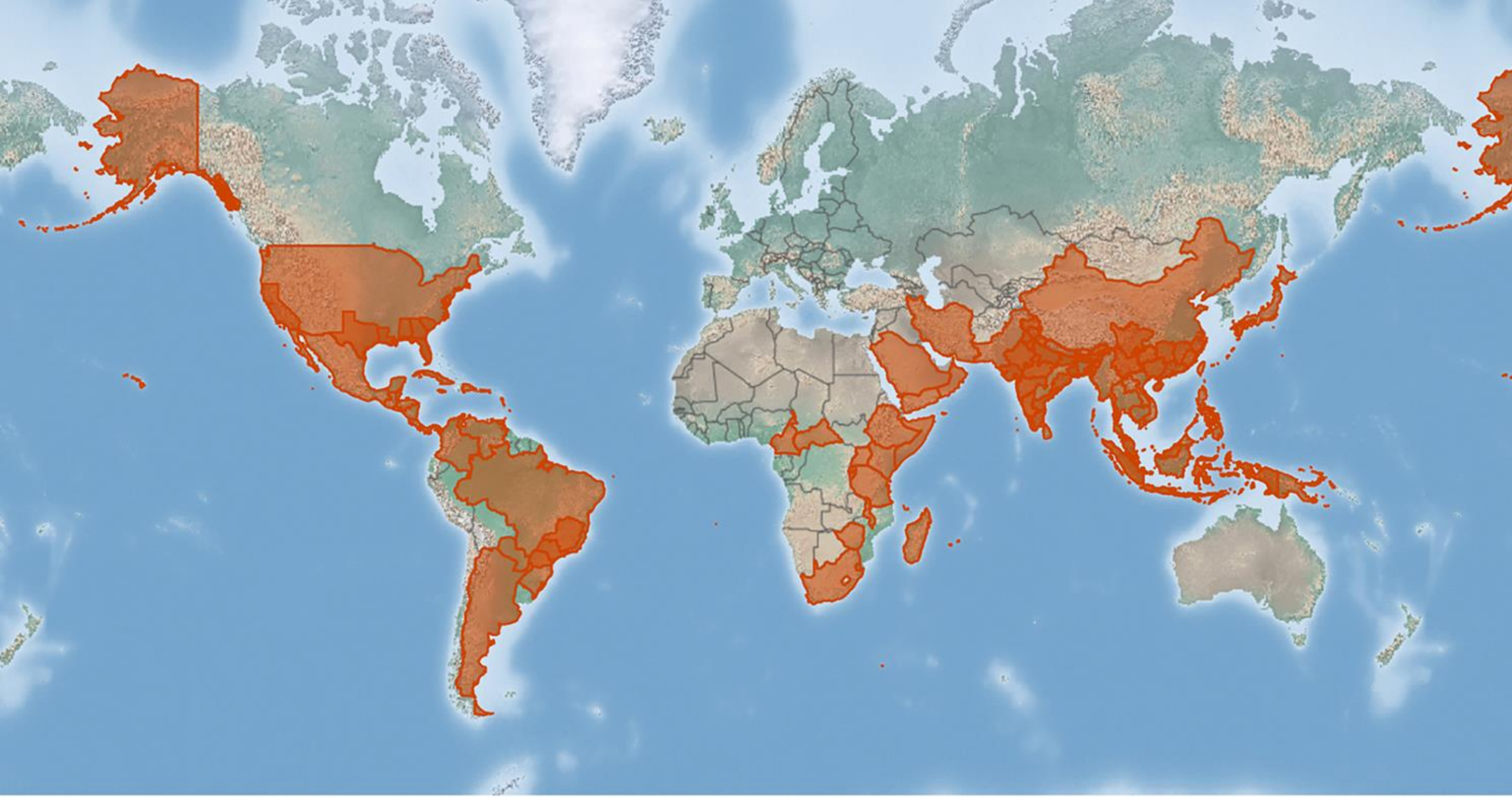
Diaphorina citri

Trasmisor de la bacteria causal de HLB

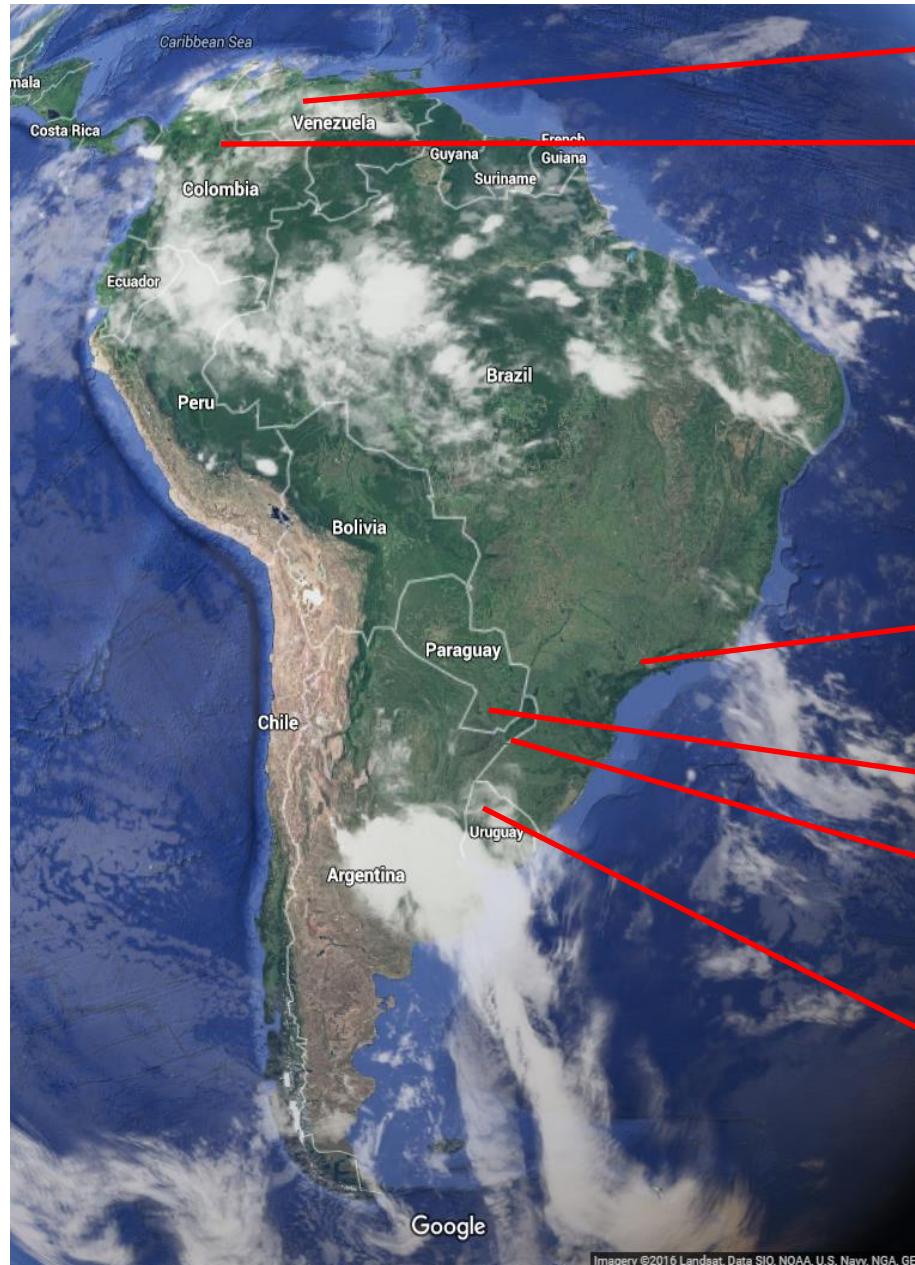


2.7-3.3 mm

Psílido asiático
Diaphorina citri



Situación del HLB en el hemisferio sur



2018
CLas

2017
CLas

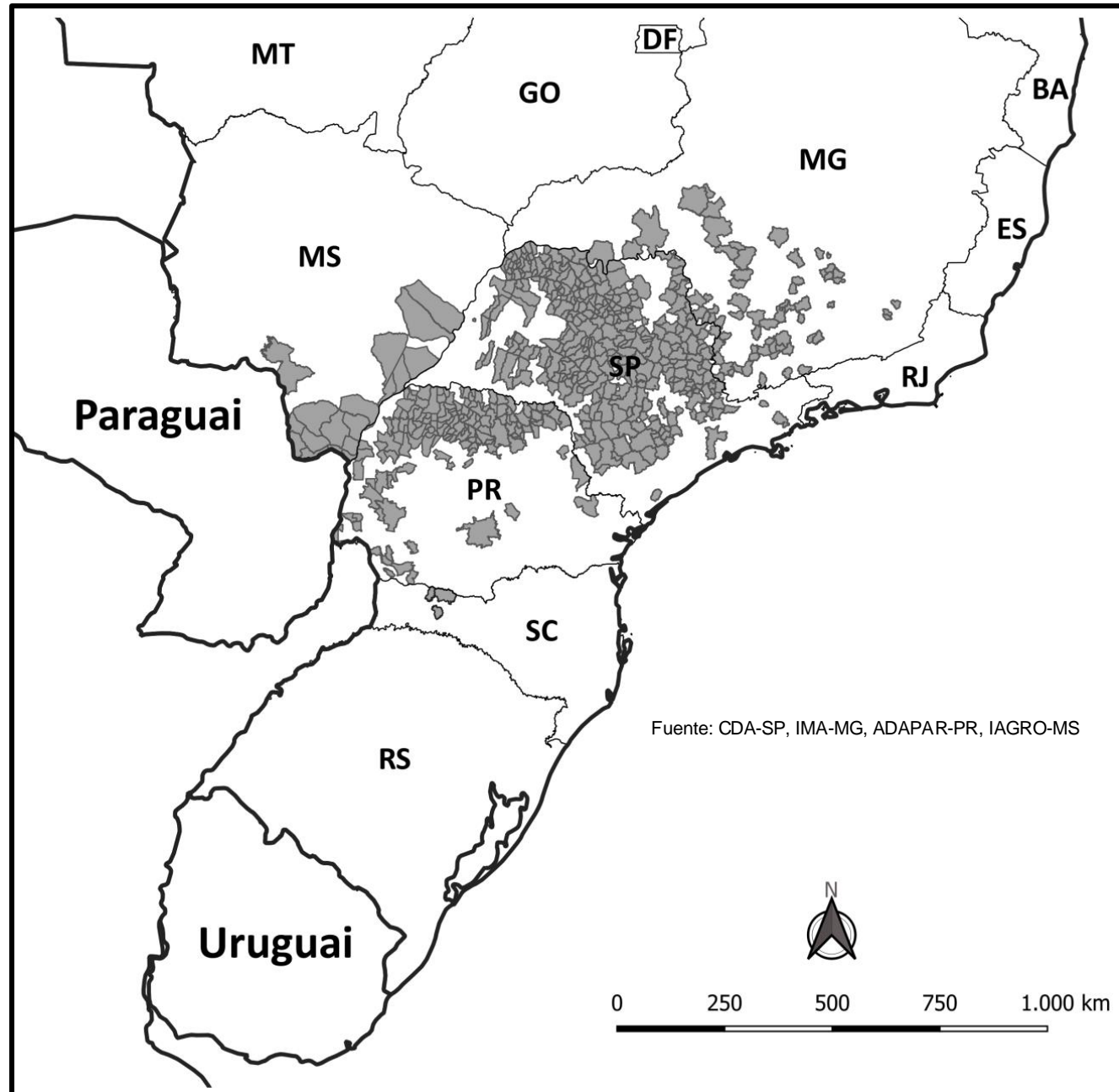
2004
Candidatus Liberibacter asiaticus
CL americanus

2013
CLas

2012
CLas

2022
CLas

HLB en Brasil



HLB

Distribucion en Paraguay

SITUACIÓN ACTUAL DEL HLB EN PARAGUAY.
2016. Ing. Agr. María José Britos



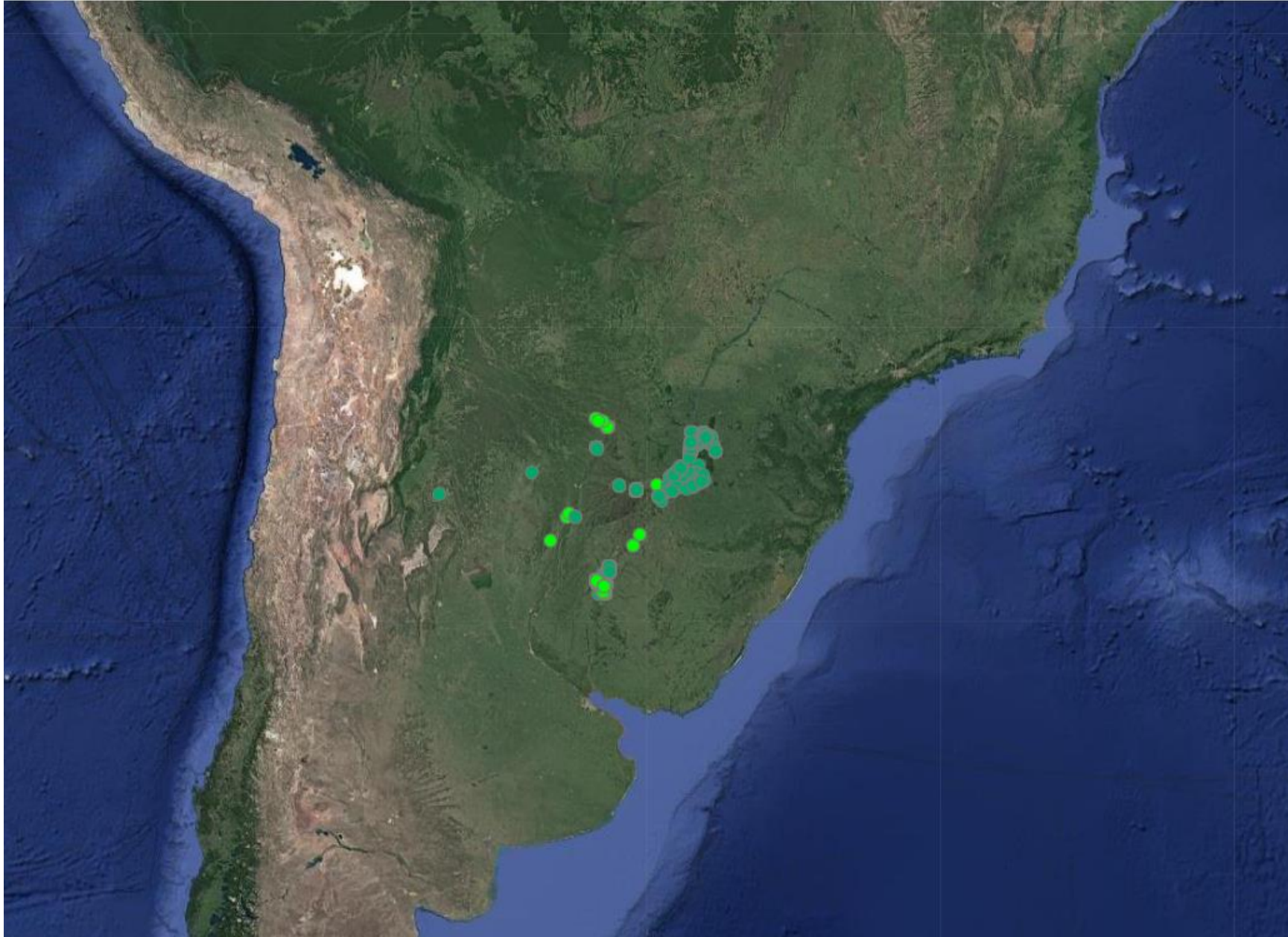
SERVICIO NACIONAL DE CALIDAD Y SANIDAD VEGETAL Y DE SEMILLAS



MUESTRAS DE HLB AÑO 2013 AL 2016



HLB: detecciones confirmadas por SENASA (Positivos 2012 a Set 2024)



Desde el año 2017 se encontraron los primeros casos positivos de HLB en plantas de veredas y traspatios de las localidades de:

Clorinda y Formosa (Formosa),

Campo Largo (Chaco),
La Banda (Santiago del Estero)

Ituzaingó, Alvear, Yapeyu,
Mocoreta y Montecaseros (Corrientes)

Chajarí, Federación y Villa del Rosario (Entre Ríos)
y finalmente en Malabrigo (2024), Santa Fe.

Programa Nacional de Prevención de Huanglongbing (PNPHLB)

Programa en actividad desde 2009

Red de laboratorios de diagnóstico de HLB por métodos moleculares:

EEA INTA-Montecarlo (Misiones)

EEA INTA-Bella Vista (Corrientes)

EEA INTA-Concordia (Entre Ríos)

EE de Cultivos Tropicales INTA-Yuto (Jujuy)

EE Agroindustrial Obispo Colombres (Tucumán)

Instituto Nacional de Semillas (INASE)

SENASA Central

Muestras (y remuestreos solo en caso de primer positivo para un laboratorio)

Colaboración en capacitaciones y toma de decisiones a nivel productivo y nacional.

<https://www.argentina.gob.ar/senasa/micrositios/hlb>

HLB

Compartir en redes sociales



El HLB (Huanglongbing) es la enfermedad más grave de los cítricos a nivel mundial. **Hasta el momento no tiene cura pero sí prevención.** Está presente en Argentina, por eso en este apartado te acercamos la información que lleva adelante el Programa Nacional de Prevención del HLB.

Programa Nacional de Prevención del HLB

Acciones de INTA desde su cartera de Proyectos

Uso del método CRISPR para el diagnóstico rápido, específico y en el terreno del HLB de los cítricos.

Se están probando primers que permitan una validación efectiva del método de diagnóstico de HLB. Se continúan los trabajos de desarrollo de un kit de diagnóstico que utilice el método RPA (amplificación isotérmica con recombinasa y polimerasa).

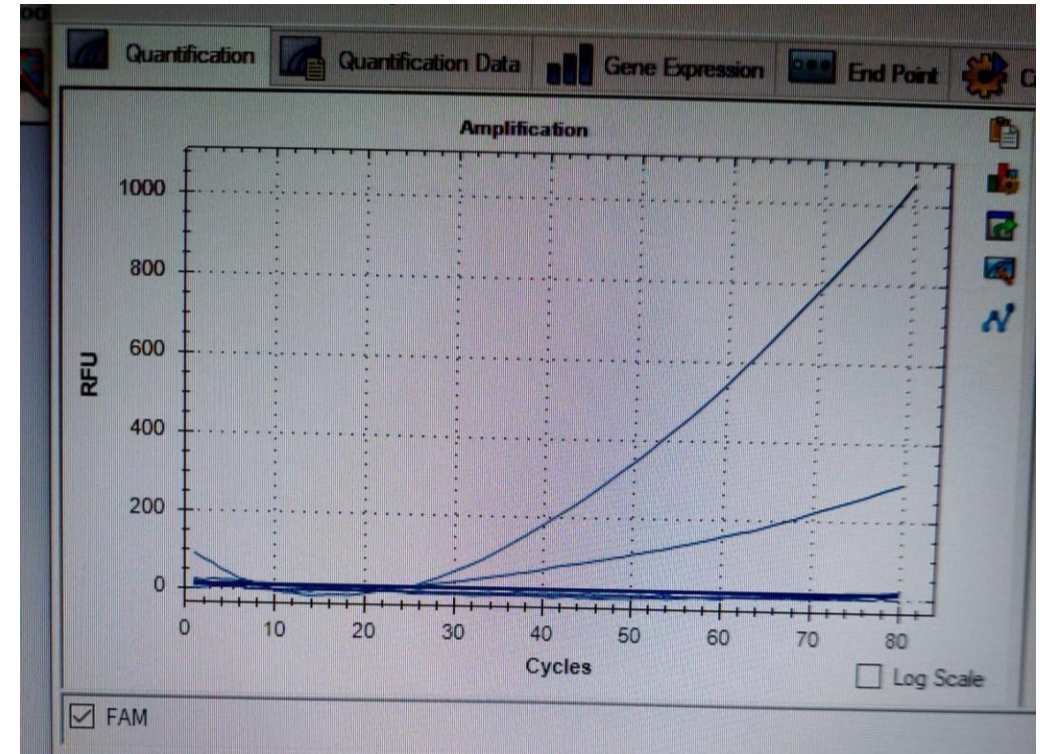
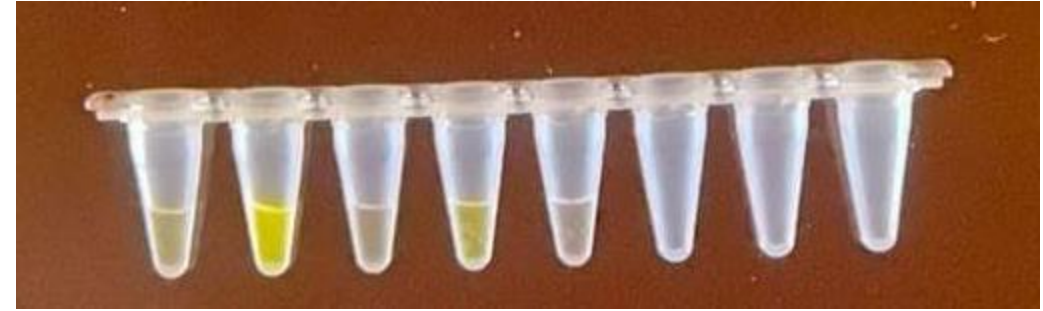
Este método de diagnóstico de HLB por medio de CRISPR-Cas12, se complementará con un test de diagnóstico mediante la utilización del método RPA. La amplificación isotérmica con recombinasa y polimerasa (RPA) es una técnica recientemente desarrollada que se utiliza para la detección de patógenos.

Costo qPCR convencional:

U\$S 30/muestra

Costo kit CRISPR:

U\$S 5/muestra



Relevamiento de firmas espectrales en Argentina y generación de un modelo de monitoreo

Proyecto IICA: Desarrollo de un módulo de análisis de criterios múltiples para la gestión de riesgos fitosanitarios: estudio de caso de países HLB y COSAVE.

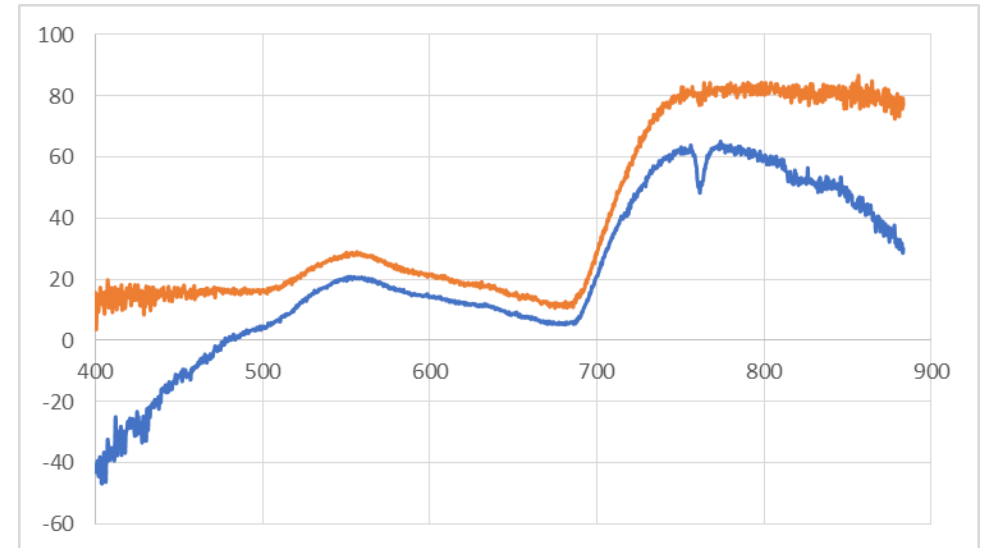
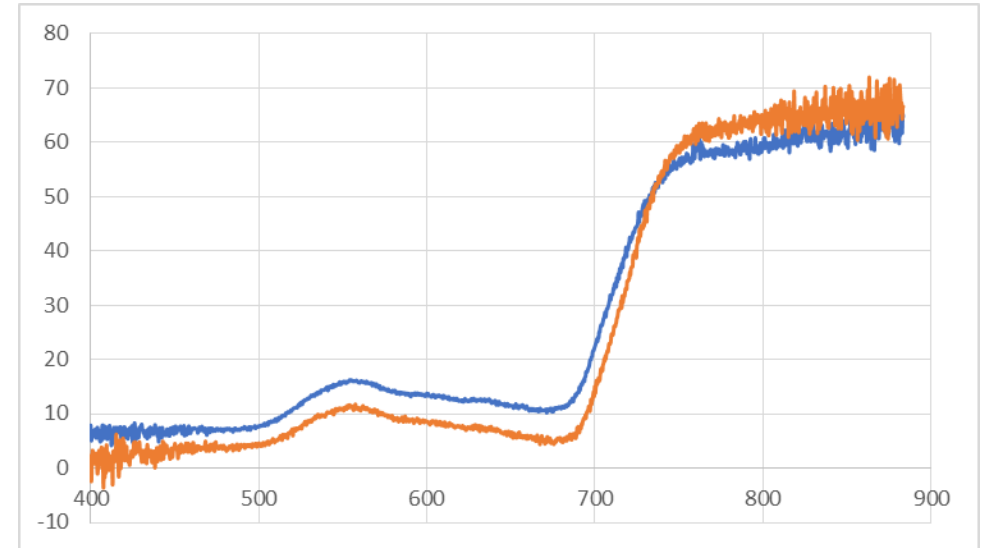
Colaboración CONAE INTA COSAVE.

Calibración y validación de un modelo remoto para generar alertas de presencia de HLB mediante el uso de imágenes espectrales y generación de un modelo de monitoreo.

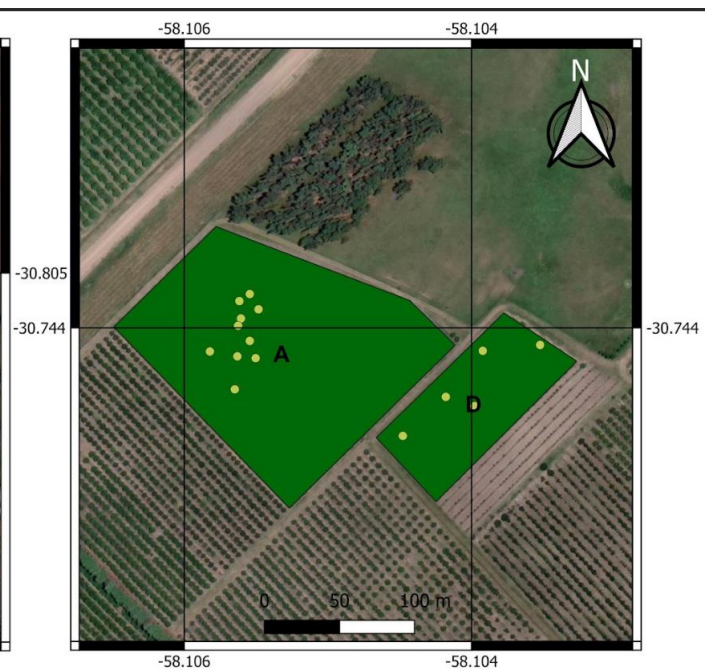
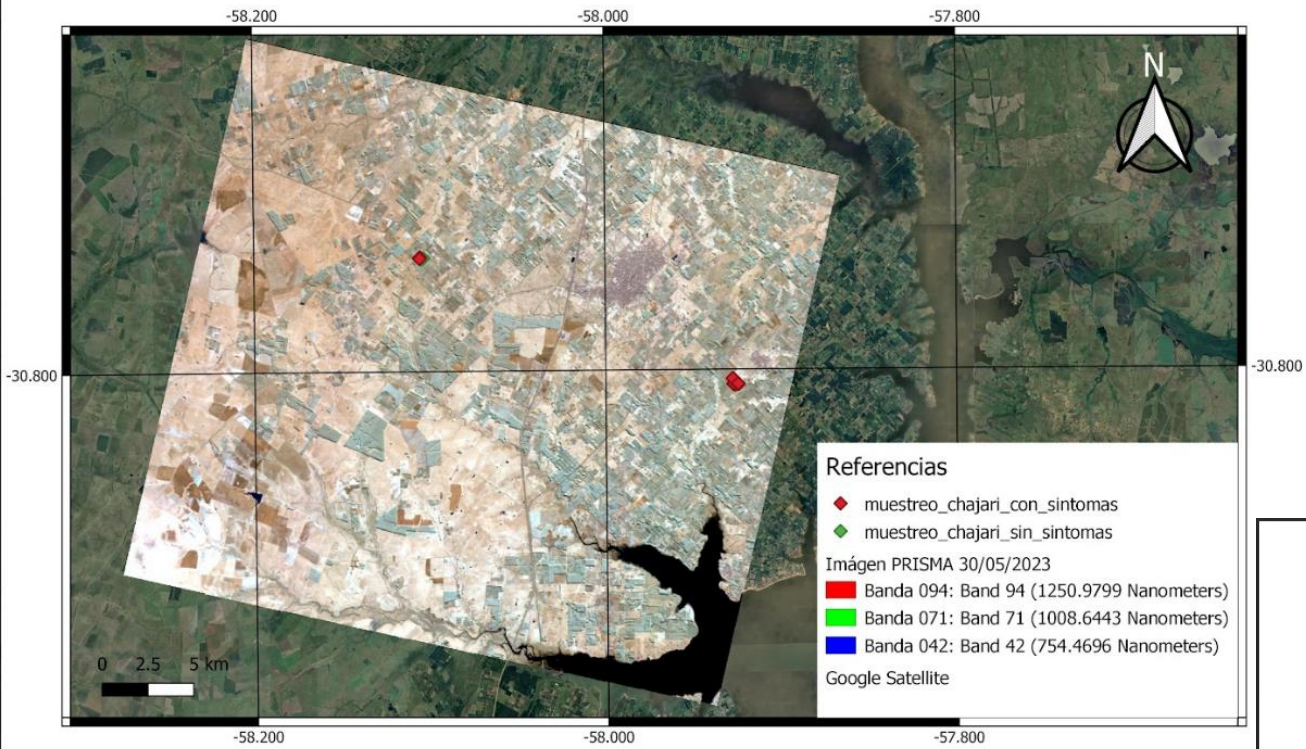
(Datos preliminares)

Arriba: espectro radiométrico de muestras tomadas de plantas HLB positivas (sintomáticas y asintomáticas).

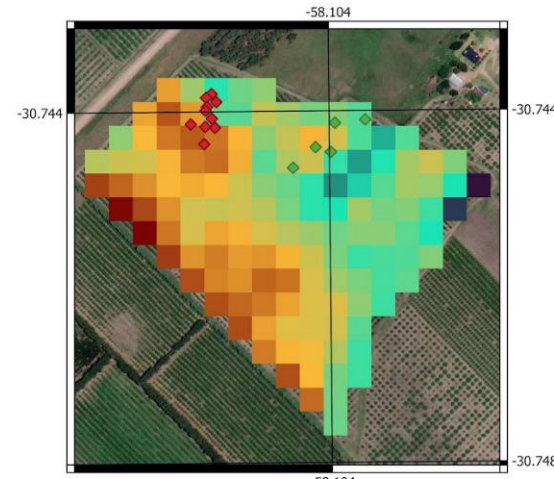
Abajo: espectro radiométrico de muestras tomadas de plantas HLB negativas (plantas deficientes o sanas).



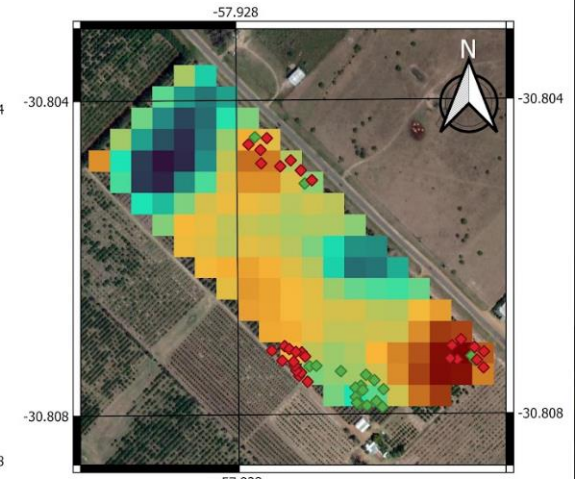
Relevamiento de firmas espectrales en Argentina y generación de un modelo de monitoreo



Relevamiento de firmas espectrales en Argentina y generación de un modelo de monitoreo

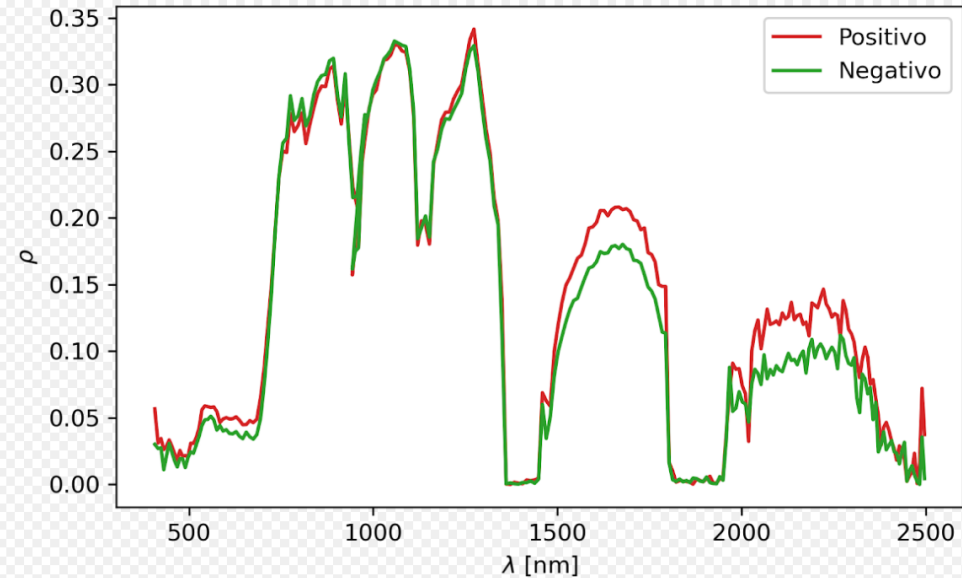


Zona de estudio LOTES A,D
 0 50 100 m
 ◆ Muestras con síntomas de HLB
 ◆ Muestras sin síntomas de HLB
 Componente 1
 48,596.410156
 -35,512.515625
 Google Satellite



Zona de estudio LOTES C,E y B
 0 50 100 m
 ◆ Muestras con síntomas de HLB
 ◆ Muestras sin síntomas de HLB
 Componente 2
 30,920.392578
 -27,253.445312
 Google Satellite

Firmas espectrales PRISMA 2023 sobre 1 pixel con casos positivos (LOTE A) y otro con casos negativos (LOTE D)



Evaluar metodologías de transformación genética, como herramientas de mejoramiento, en las variedades de portainjertos de interés para la producción de Argentina (citrango Troyer, limón Rugoso, lima Rangpur) utilizando genes que codifican para proteínas que confieren protección contra enfermedades bacterianas.





Short communication

A simple and efficient *in planta* transformation method for pomelo (*Citrus maxima*) using *Agrobacterium tumefaciens*



Yong-yan Zhang^a, Dong-min Zhang^a, Yun Zhong^b, Xiao-jun Chang^a, Min-lun Hu^b, Chun-zhen Cheng^{a,*}

^a College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

^b Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 December 2015
Received in revised form 14 October 2016
Accepted 28 November 2016
Available online 1 December 2016

Keywords:
Agrobacterium-mediated transformation
Citrus maxima
Dark incubation
in planta transformation

ABSTRACT

A simple and efficient transformation method is important for plant genetic breeding and gene function analysis. In this study, we developed a *in planta* transformation approach for pomelo (*Citrus maxima*), which includes seed germination, seedling decapitation, Parafilm tumsel-type-winding, *Agrobacterium* infection, co-culture, selective-culture, dark treatment for buds induction, transgene integration confirmation and transgenic plant propagation. The highest transformation efficiency (20.41%) was obtained when using hygromycin as selection marker, followed by Basta (19.37%) and Kanamycin (3.21%). Transgenic plants obtained using this method could be graft-propagated in 3 months post transformation, which is shorter than the tissue-culture-dependent transformation. The transformation protocol presented here has great potential to be used for citrus genetic breeding and improvement.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Citrus species, the most widely grown fruit crops, are important commodities consumed both fresh and processed worldwide. Citrus cultivars were mainly originated over time from hybridization between the three parental cultivars (citron, mandarin and pomelo) and from bud spots, chance seedlings or grafting chimeras (Dutt and Grosser, 2009). New varieties can be developed by citrus breeder by introducing genetic variability into selected individuals generally through controlled hybridization (Marutani-Hert et al., 2012). However, due to the biological characteristics limitations of long juvenile period, nucellar polyembryony, autoincompatibility and high level of heterozygosity and so on, the development of new and improved cultivars of citrus is slow and costly (Grosser and Gmitter, 1990). In other instances, citrus also processes several undesirable traits including sensitivity to abiotic stresses such as salt and cold and biotic diseases caused by bacteria, fungi and viruses (Donmez et al., 2013). Therefore, citrus improvement is of vital importance and has stimulated worldwide interest as com-

petitions from international citrus market and biotic and abiotic stresses (Donmez et al., 2013).

Currently, genetic transformation has gained more and more popularity for citrus improvement, and provided new solutions for solving specific needs as well as for studying gene function and identifying genes responsible for relevant agronomic characteristics (Rao et al., 2009; Febres et al., 2011; Agüero et al., 2012).

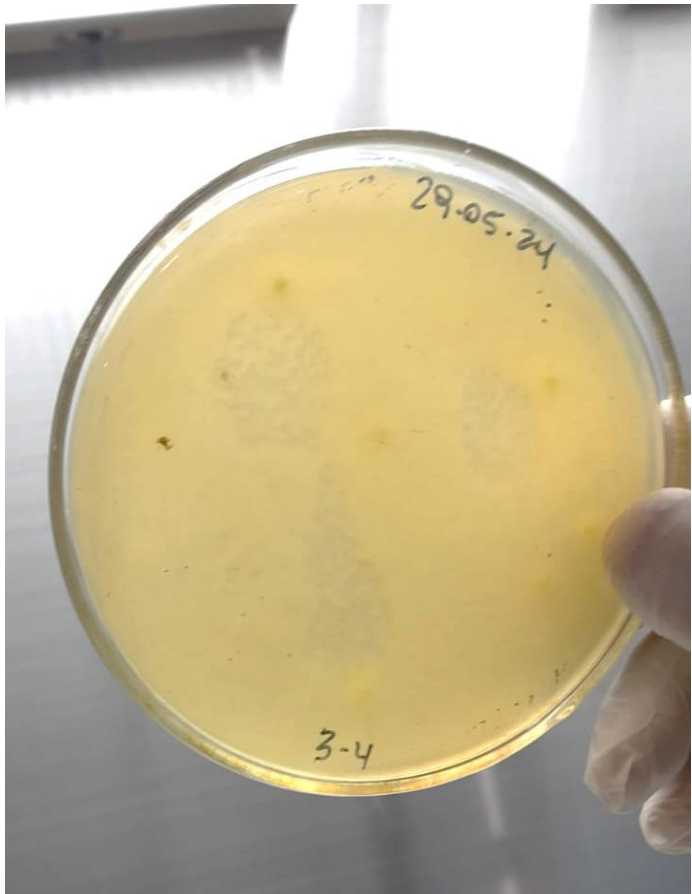
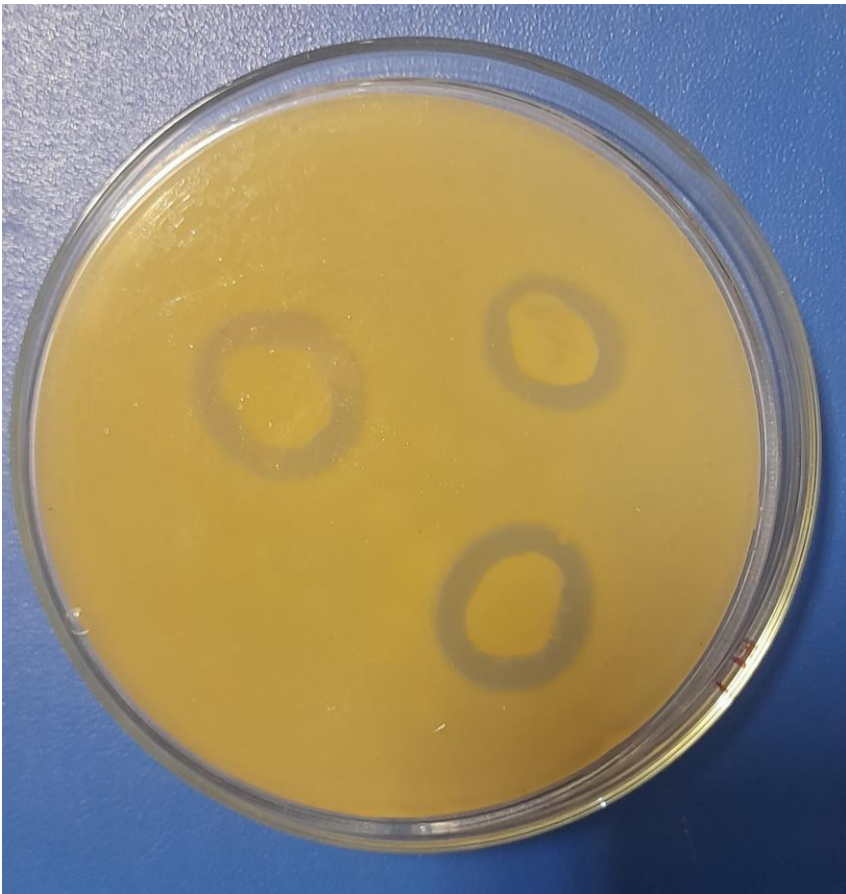
Genetic transformation methods can be divided into direct gene transfer methods and indirect gene transfer methods according to the transferring procedure. Direct transformation systems were usually performed through physical or chemical method without vectors, while the indirect transformation systems transfer the target gene in to recipient cells through virus or *Agrobacterium* vectors. Polyethylene glycol (PEG)-mediated direct uptake of DNA by protoplast was first applied in the acquisition for transgenic sweet orange in 1989 (Kobayashi and Uchimiyama, 1989) and later for rough lemon in 1990 (Vardi et al., 1990). Direct incorporation of gene into citrus protoplasts using electroporation (Hidaka and Omura, 1993; Niedz et al., 2003), liposome (Wang et al., 1998) and particle bombardment (Yao et al., 1996) have also been reported. Virus-based vectors are important tools in plant molecular biology and plant genomics. Citrus tristeza virus (CTV)-based vector (Folimonov et al., 2007), Citrus leaf blotch virus (CLBV)-based vector (Agüero et al., 2012, 2014) and Citrus Tatter leaf virus (CTLV)-based vector (Song 2013) have been constructed and used for citrus transient expression analysis or virus induced gene silencing (VIGS) in

* Corresponding author at: College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Cangshan, Fuzhou, 350002, China.

E-mail addresses: 100532cheng@126.com, chengchunzhen2012@163.com (C.-z. Cheng).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scihorti.2016.11.033>
0168-4238/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.





<https://6caf2024.com/>



CARACTERIZACION DE BACTERIOCINAS INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO DE XATHOMONAS FITOPATOGENAS

Lattar, T., Hermosis, F., Soliz, J., Lezcano C. C., Ibañez, J. M., Obregon, V., Canteros, B. I, Gochez, A. M.



Virus rugoso del tomate

Tomato brown rugose fruit virus

Ing. Agr. M. Sc. Verónica Obregón

Laboratorio de Fitopatología Hortícola
EEA INTA Bella Vista

ToBRFV - Virosis Emergentes

...que está cambiando la producción de tomate en el mundo



Familia: Virgaviridae

✓ Género: Tobamovirus

Especie: *Tobamovirus fructirugoso* (TBRFV)

Ej: *Tobacco mosaic virus* (TMV); *Tomato mosaic virus* (ToMV); Tomato mottle mosaic virus (ToMoMV).

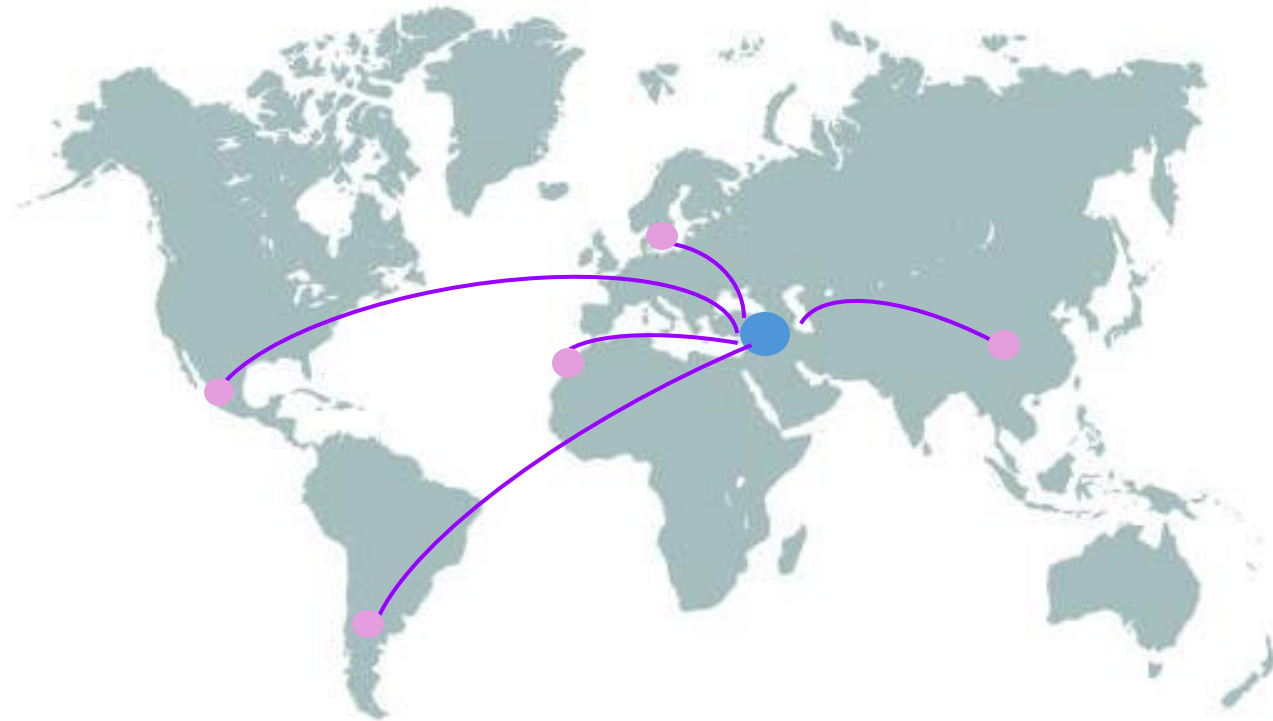
✓ Su genoma consiste un ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 6,4 kpb y codifican para cuatro proteínas.

✓ El tomate y el pimiento son las dos principales especies conocidas por ser huéspedes naturales de ToBRFV.

✓ Puede infectar tomates que tengan el gen de resistencia *Tm-1*, *Tm-2* y *Tm-2²*.

✓ Genera severas pérdidas económica.

Distribución geográfica



-
- ✓ 2014 Israel
 - ✓ 2015 Jordania

Primer Reporte mundial

Organizacion Europea y Mediterranea para la
Protección de las Plantas

<https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution>

Distribución geográfica

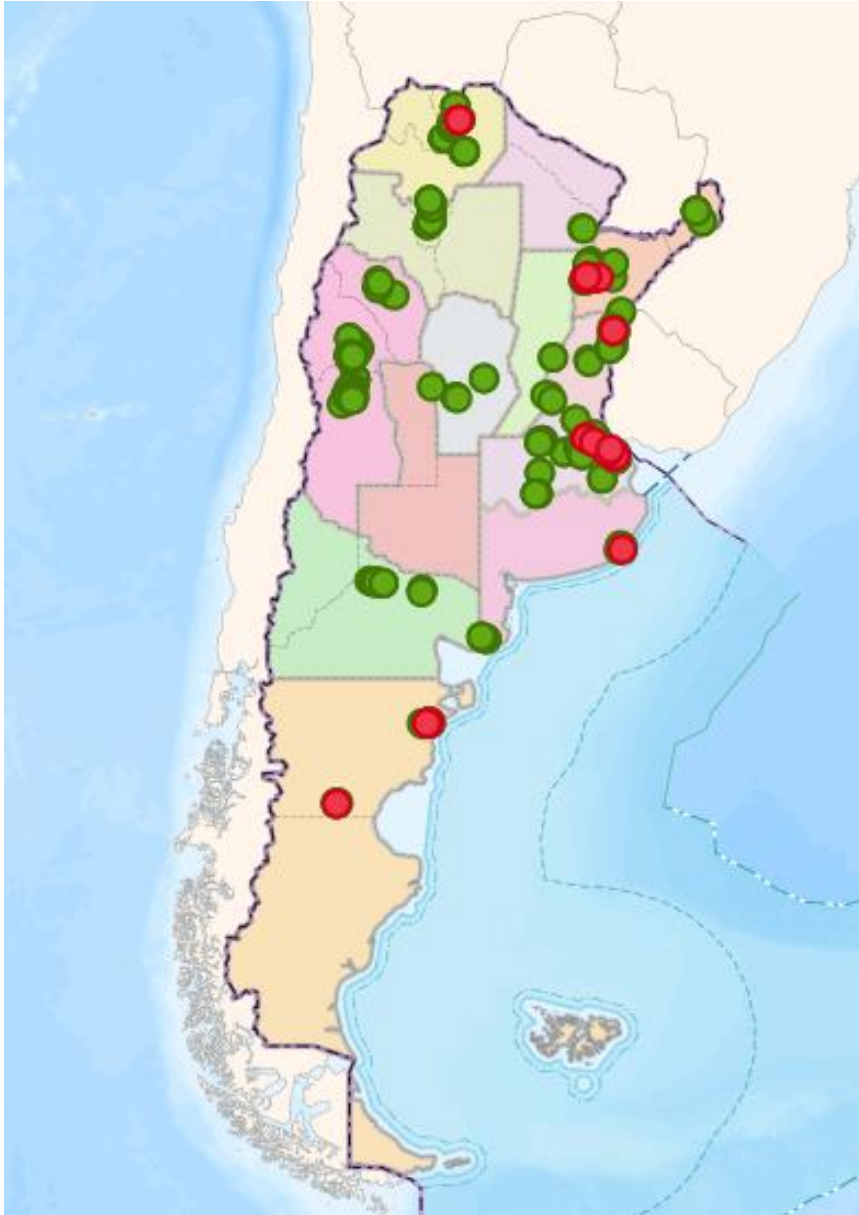


Primer reporte en
Argentina 2023

- ★ El tomate es una de las hortalizas más importantes en Argentina.
- ★ La producción promedio anual de los últimos años se ubica en torno a 1.100.000 toneladas y 17.000 hectáreas productivas.
- ★ 60-70 % se destina a mercado para consumo en fresco (16kg/persona/Año)
30-40 % para industria

<https://www.argentina.gob.ar/se-nasa/virus-rugoso-del-tomate>

Distribución geográfica



Primer reporte en
Argentina 2023

- ★ El tomate es una de las hortalizas más importantes en Argentina.
- ★ La producción promedio anual de los últimos años se ubica en torno a 1.100.000 toneladas y 17.000 hectáreas productivas.
- ★ 60-70 % se destina a mercado para consumo en fresco (16kg/persona/Año)
30-40 % para industria



Infecciones mixtas

Son comunes en la naturaleza y la interacción puede incrementar la severidad de los síntomas.

*Pepino mosaic virus (PepMV),
Tomato spotted wilt virus (TSWW),
Tomato yellow leaf curl virus
(TYLCV).*

En Argentina, *Tomato chlorosis virus (ToCV)*, un Crinivirus transmitido por mosca blanca

Detección



Diagnóstico por
síntomas
no es confiable

- ★ Varían según estado fenológico
- ★ Varían de acuerdo con las condiciones climáticas
- ★ Varían de acuerdo con los híbridos comerciales con o sin resistencia
- ★ Varían si hay infecciones mixtas que tienden a confundir síntomas

Detección

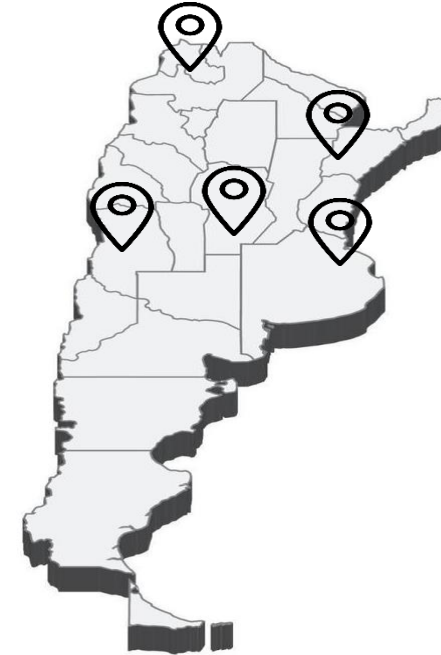


Protocolos de diagnóstico publicados en la EPPO (Org. Europea y Mediterránea para la Protec. Vegetal.) y validados por SENASA

DAS-ELISA
RT-PCR
RT-qPCR



Red de laboratorios INTA para el diagnóstico en 5 zonas importantes de producción



Permite analizar muchas muestras

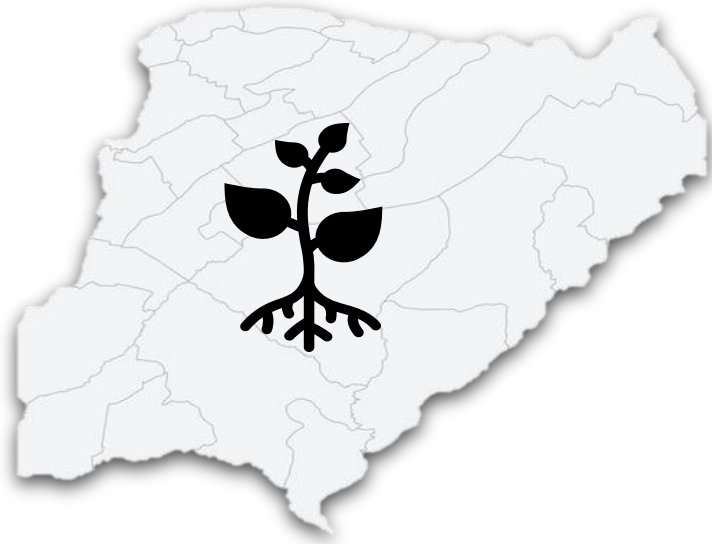
Genoma completo del ToBRFV





Escasa disponibilidad de cultivares R

(Escasa información agronómica y de comportamiento frente a ToBRFV)



★ PREVENCIÓN ★







Detección
temprana

Manejo de cultivo
(Medidas fitosanitarias)

DISMINUIR EL IMPACTO
ECONÓMICO



Viveros

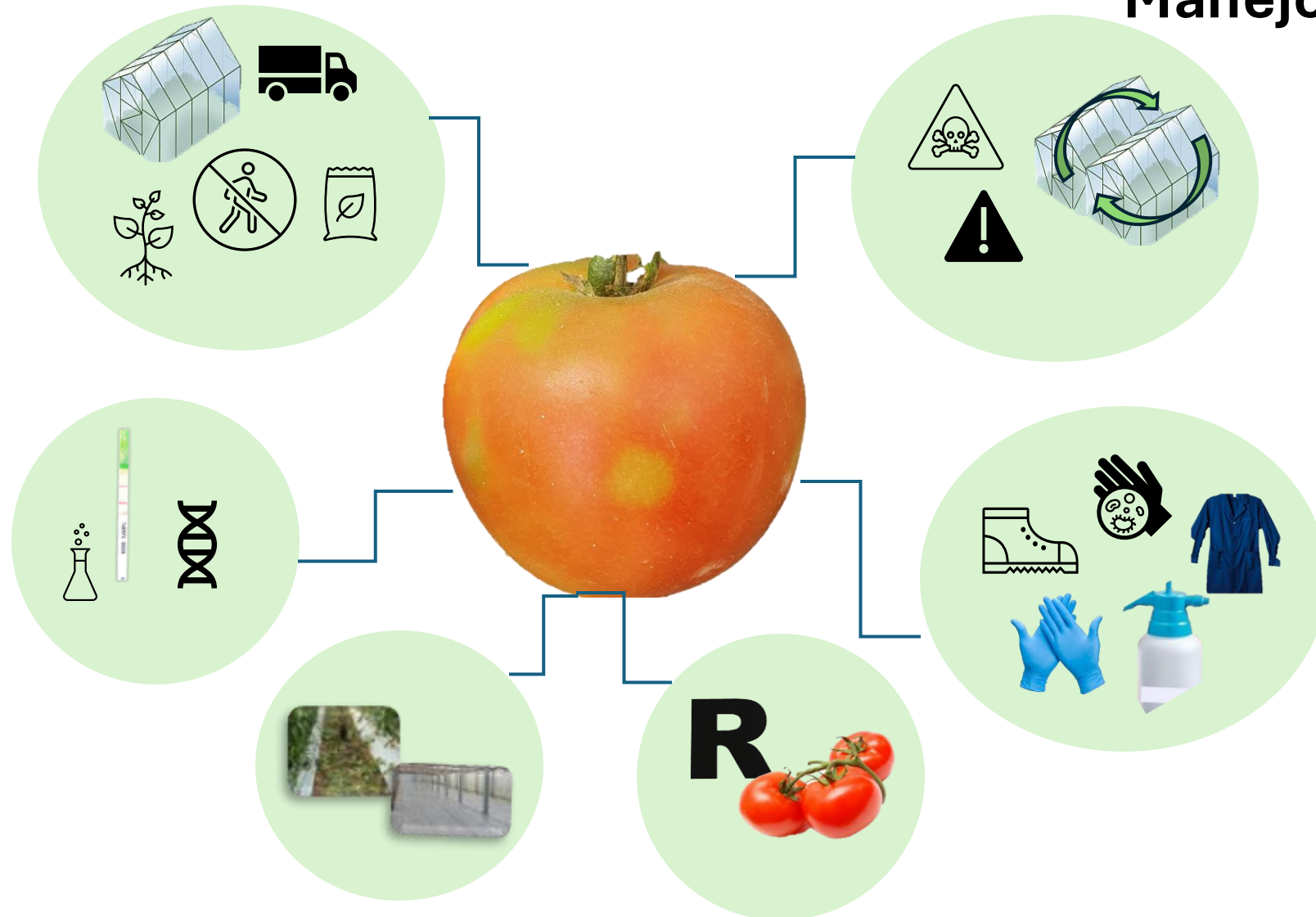
-  Implementación de protocolos y medidas fitosanitarias preventivas para el ToBRFV
-  Reducir o evitar el ingreso de personal de visita
-  Alfombras desinfectantes en la entrada de los invernaderos, desinfectantes para vehículo.
-  Lavarse y desinfectarse las manos, diseñar recintos antecámara para limpieza del personal, antes de ingresar a los invernaderos de producción
-  Utilizar ropa adecuada lavable y para cada personal
-  Cartelerías informativas



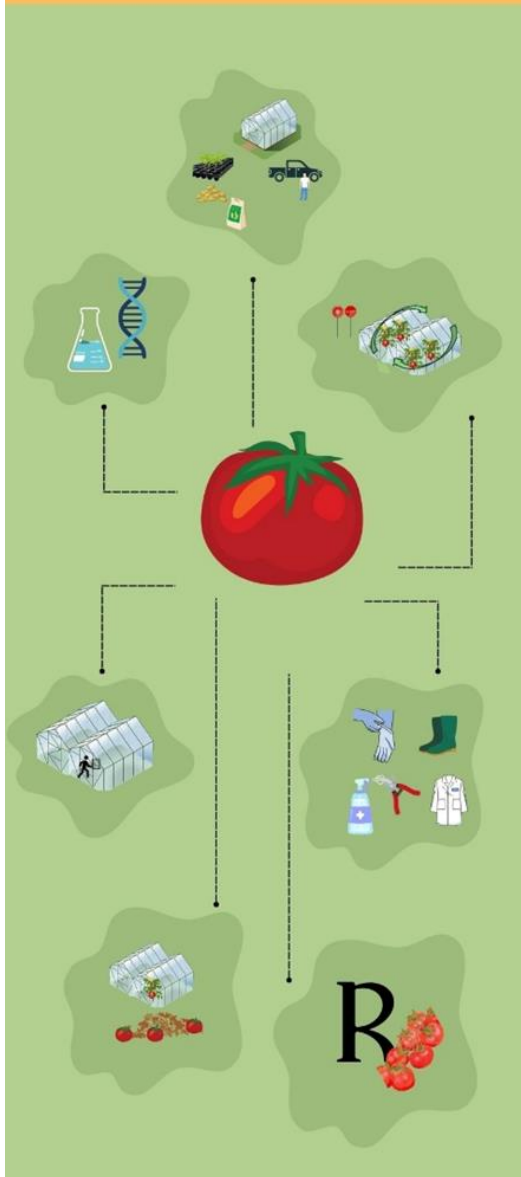
MEDIDAS FITOSANITARIAS

contra el ToBRFV

Manejo de la virosis



BUENAS PRACTICAS de higiene contra ToBRFV



Difusión

El virus rugoso del tomate se previene en toda la cadena productiva
¡Evitemos que se propague!

INTA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Argentina



INIASE



senasa



Recomendaciones para huertas familiares y distribuidores



inta.argentina  Seguir Enviar mensaje

1640 publicaciones 114 mil seguidores 212 seguidos

INTA Argentina
Organización gubernamental
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria SA
bit.ly/m/inta
Le sigue miguelortman

- Chicharita
- Ediciones INTA
- Virus Rugoso
- Guía HLB
- 100 logos

PUBLICACIONES REELS ETIQUETADAS

Importancia del servicio de diagnóstico que ofrece el laboratorio de fitopatología hortícola de la EEA Bella Vista.

En los últimos 10 años se detectaron y caracterizaron patógenos que provocan enfermedades importantes de los cultivos hortícolas: (*Neopestalotiopsis clavispora* en frutilla), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raza 3 (Fol), *Stemphylium lycopersici* y *Ralstonia solanacearum* en tomate y recientemente, ToBRFV y ToCV.

En el cultivo de pimiento estamos en vías de identificar un nuevo género de virus que afecta seriamente la producción.

La EEA del INTA Bella Vista, contribuyó con otros organismos como INASE y SENASA en la elaboración de nuevas normativas vigentes : Disposición 2021/165-166 para viveros de frutillas (INASE 2021), Resolución 569/2023, la alerta fitosanitaria ToBRFV (SENASA, 2023).

También se aportó al sector privado (semilleros) para el desarrollo de portainjertos con resistencia a Fol raza 3, *R. solanacearum*, Tomato brown rugose fruit virus para el cultivo de tomate y resistencia genética a Pepper mild mottle virus en pimiento.



Diagnostico Express: App para teléfonos móviles con sistema operativo de Android, para el reconocimiento de enfermedades en cultivos de tomate y pimiento,

EEA INTA Bella Vista



EEA INTA Bella Vista

Ruta Prov. 27 km 38.3 | Tres de Abril / Corrientes

<https://www.argentina.gob.ar/inta/cr-corrientes/eea-bella-vista>