ATN-RF-19885-RG FONDO SEMILLA

Producto 2 y 4:Memoria del webinar “Detección temprana del Huanglongbing Citrus greening: Herramientas y estrategias para el diagnóstico en cítricos”

Secretaría Técnica Administrativa

2024

FONTAGRO

Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Secretaría Técnica Administrativa.

Copyright © 2024 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Índice de Contenido

Instituciones participantes 5

Agenda 6

Introducción 7

Bienvenida. 8

Dra. Eugenia Saini, Secretaria Ejecutiva de FONTAGRO 8

Dr. Alberto Gochez, Representante por Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina en la Comisión de Trabajo Interinstitucional de HLB 8

Presentación: "Situación del HLB y tareas de diagnóstico en el Sureste de México". 9

Ing. Emiliano Loeza Kuk, responsable de Laboratorio de Fitopatología y Biotecnología en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias de México 9

Presentación: "Diagnóstico de HLB: Desafíos y Soluciones para la Detección del Greening en Cítricos" 11

Dra. Elaine Cristina Martins, Analista de Investigación en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades de los Cítricos en Fundecitrus 11

Presentación: Desarrollo de Kit Portable para el Diagnóstico de HLB Basado en el sistema CRISPR-Cas12. 13

Dra. María José Blariza, Investigadora del Laboratorio GIGA y del Instituto de Biología Subtropical 13

Presentación: "Avances en Diagnóstico Molecular de Huanglongbing (HLB): Nuevas Alternativas a las Técnicas de PCR Convencional". 15

Dr. Félix Morán Villamizar, Investigador de Laboratorios Nacionales de Referencia en Bacterias Fitopatógenas y en Virus, Viroides y Fitoplasmas de Frutales 15

Presentación: "Uso de un método Molecular simplificado para la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal del Huanglongbing" 18

Dra. Fabiana Stolowicz, Investigadora del CONICET en el ICT-Milstein *18*
Preguntas y respuestas 20
Conclusiones 22
Estadísticas 23
Estadísticas de YouTube al 13/12/2024 23
Anexo. Imagen del evento 24
Referencias 25
Biografías de los participantes 26

Instituciones participantes

Agenda

Hora	Actividad	Responsable
10:00 - 10:05	Apertura y Bienvenida.	Eugenia Saini y Alberto Gochez.
10:05 - 10:20	Presentación: “Situación del HLB y tareas de diagnóstico en el Sureste de México”.	Emiliano Loeza Kuk
10:20 - 10:35	Presentación: “Diagnóstico de HLB: Desafíos y Soluciones para la Detección del Greening en Cítricos”.	Elaine Cristina Martins
10:35 – 10:50	Presentación: Desarrollo de Kit Portable para el Diagnóstico de HLB Basado en el sistema CRISPR-Cas12.	María José Blariza
10:50 – 11:05	Presentación: “Avances en Diagnóstico Molecular de Huanglongbing (HLB): Nuevas Alternativas a las Técnicas de PCR Convencional”.	Félix Morán Villamizar
11:05 – 11:20	Presentación: “Uso de un método Molecular simplificado para la detección de Candidatus Liberibacter asiaticus, agente causal del Huanglongbing”.	Fabiana Stolowicz
11:20 – 11:25	Preguntas y respuestas	
11:25 – 11:30	Conclusiones y Cierre	Alberto Gochez

Introducción

El Huanglongbing (HLB), conocido como *Citrus Greening*, es una de las enfermedades más devastadoras para los cítricos a nivel mundial, con un impacto significativo en las regiones productoras de Latinoamérica y el Caribe. Este padecimiento, causado por bacterias del género *Candidatus* Liberibacter spp. y transmitido principalmente por el insecto vector *Diaphorina citri*, ha transformado las estrategias de manejo en el sector citrícola. La importancia económica de los cítricos, especialmente especies como la naranja dulce y la lima persa, resalta la urgencia de desarrollar métodos eficientes para la detección temprana y el control de la enfermedad.

En este webinar, destacados investigadores comentaron las experiencias de diversas regiones productoras, señalando que existe una distribución heterogénea del HLB, lo cual evidencia la necesidad de enfoques regionales diferenciados. Se comentó que, en América, la enfermedad se registró por primera vez en Sao Paulo, Brasil, en 2004, y luego en Florida, EEUU en 2005, extendiéndose gradualmente hacia otras áreas del país. El desconocimiento de los síntomas y la escasa reglamentación para el transporte y multiplicación de plantas favoreció su diseminación hacia múltiples países de todo el continente. Asimismo, se hizo referencia a estudios que revelaron la incidencia de la enfermedad varía significativamente incluso dentro de una misma región, con huertos que presentan diferentes niveles de infestación y poblaciones de insectos portadores de la bacteria. Estos hallazgos destacan la importancia del monitoreo constante y el desarrollo de herramientas diagnósticas más económicas y accesibles.

Grabación del webinar: haga clic *aquí*.

Bienvenida.

Dra. Eugenia Saini, Secretaria Ejecutiva de FONTAGRO

Dr. Alberto Gochez, Representante por Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina en la Comisión de Trabajo Interinstitucional de HLB

La Dra. Saini realizó la apertura del webinar comentando que el HLB o *Citrus Greening* es uno de los mayores desafíos que tiene la citricultura de la región y del mundo debido a la rápida propagación que tiene y al impacto devastador que tiene en la productividad de las plantaciones. En FONTAGRO, se reconoce la urgencia de desarrollar y de compartir soluciones innovadoras que mitiguen y prevengan los efectos de esta enfermedad, y que protejan a los productores y a los ecosistemas. Planteó que el objetivo de FONTAGRO es promover la transferencia de conocimientos y la colaboración entre instituciones, científicos y otros profesionales de la región, tanto del sector público como privado.

El Dr. Gochez, planteó que la detección temprana del HLB es de vital importancia para las zonas que no tienen presencia de la enfermedad o en aquellos casos en los cuales la enfermedad aún no está diseminada. Los métodos de diagnóstico temprano son fundamentales para empezar a hacer frente a la enfermedad.

Presentación: “Situación del HLB y tareas de diagnóstico en el Sureste de México”.

Ing. Emiliano Loeza Kuk, responsable de Laboratorio de Fitopatología y Biotecnología en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias de México

El Ing. Loeza Kuk comentó que los cítricos son de gran importancia para esa región de Latinoamérica y el Caribe. Abarcando su cultivo una gran cantidad de especies, de las cuales las más importantes para México son la naranja dulce y la lima persa. Sostuvo que el HLB se encuentran disperso de forma heterogénea en la región siendo el único vector del HLB presente el psílido *Diaphorina citri*. Algunos estados llevan aproximadamente 15 años conviviendo con la bacteria, pero la dispersión ha sido un poco más lenta que en otras regiones. Hizo mención al caso de Yucatán, en la cual los primeros reportes de presencia de la bacteria se remontan a 2009, para posteriormente expandirse al centro del país.

Mencionó que, en el pasado, han utilizado prácticas de diagnóstico molecular para determinar cuál es la importancia potencial en especies como *Murraya* y en *Zanthoxylom*. Para ello, implementaron diferentes métodos de diagnóstico por medio de PCR convencional y qPCR, con primers de Li et al (2006) y Morgan et al (2012), el cual es más preciso, para casos de *Murraya*. Planteó que, en los estudios realizados, revisaron 840 unidades productivas en donde se realizaron muestreos, y tuvieron como resultado plantas con sintomatologías muy evidentes, hasta otras en las que prácticamente no encontraron síntomas de plantas infectadas. Mencionó que en el Sureste de México existen huertos que, por edad o por la condición del manejo, son más inductivas y presentan mayores poblaciones de *Diaphorina citri*. Con el objetivo de cuantificar el incremento de la intensidad del HLB en esa región, entre 2017 y 2020 se tomaron muestras de diferentes lugares. Se trataron de colectar en cada punto de muestreo material vegetal y psílidos, los que se sometieron a la extracción del ADN y cuantificación de la concentración de bacteria y diagnóstico en laboratorio, utilizando el procedimiento de qPCR de Li et al (2006).

En 2017, en aquellas áreas donde no se encontraron síntomas de HLB, varias de las poblaciones de insectos ya eran portadoras de la bacteria, y esto se fue incrementando con el paso de los años, aunque no se podían detectar síntomas en plantas. Dentro de cada región, se tomaron puntos en los cuales hubo una mayor presencia de la bacteria, en términos de unidades muestrales, que en otros. Sin embargo, el diagnóstico ha permitido mejorar el control regional. Se resalta que hay momentos en los cuales las actividades de control regional fueron eficientes en términos de disminución de la cantidad de bacteria que poseen esas poblaciones.

De esta forma, se redujeron los períodos de muestreo y las revisiones, que se hacían cada 15 días. Durante las épocas con menores temperaturas, la concentración de bacteria en los insectos se incrementó y se mantiene alta hasta que regresan las temperaturas elevadas. Por lo que si bien, durante el verano, se presenta una mayor población de insectos, la difusión de la bacteria es significativamente menor en comparación a las épocas más frías. En tal sentido, mencionó

que, para reducir la velocidad de dispersión de la enfermedad en la región, es necesario ser más eficientes en las aplicaciones regionales para control del vector durante las épocas frías. Asimismo, es fundamental reforzar las aplicaciones regionales mediante la aplicación coordinada con los productores. Planteándose que es necesario encontrar nuevas metodologías de detección temprana que sean más económicas y eficientes.

Presentación: "Diagnóstico de HLB: Desafíos y Soluciones para la Detección del Greening en Cítricos"

Dra. Elaine Cristina Martins, Analista de Investigación en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades de los Cítricos en Fundecitrus

La Dra. Martins comentó las actividades desarrolladas por FUNDECITRUS en relación al diagnóstico de HLB. En principio, señaló que Brasil es el mayor productor mundial de naranjas y el principal exportador de jugos, siendo los principales destinos de exportación Estados Unidos, la Unión Europea y Japón. También se exportan aceites esenciales. La producción de jugos brasileños es muy importante: cada cinco vasos de jugo de naranja consumido en el mundo, tres provienen de Brasil. La principal región de producción de naranjas es denominada el "cinturón de cítricos". La misma abarca los estados de São Paulo y Minas Gerais. Además, la cítricultura se ha expandido a otras áreas, como Mato Grosso, Mato Grosso do Sul y Goiás. La citricultura tiene un papel importante en la economía brasileña, generando más de 200.000 empleos directos o indirectos. Sin embargo, la cosecha de este año fue considerada la segunda más baja de todos los tiempos debido a los cambios climáticos y al avance del HLB. Según las estimaciones de cosecha de 2024, la incidencia alcanzó cerca del 44% de la producción.

Explicó que el HLB es causado por las bacterias *Ca.* Liberibacter spp*., principalmente C. L. asiaticus, p*ero también identificaron otro grupo de bacterias que causan los mismos síntomas, *y C. L. americanus, y tambien* fitoplasmas. La bacteria del HLB no está presente en todas las partes de la planta, principalmente en la infección inicial. El diagnóstico precoz es muy difícil. En la planta, la bacteria puede ser encontrada en los frutos, en las hojas, en los tallos y en las raíces, y para ser eficientes, es necesario determinar qué muestra analizar.

Comentó que, en 2008, equipos de FUNDECITRUS y la Universidad de Bourdeaux, decidieron avanzar en dichos estudios. Colectaron 822 muestras de hojas de sólo una planta. De esta planta, hicieron los test de PCR, PCR en tiempo real y PCR convencional, a fines de probar en qué tipo de hoja se podía comprobar mejor la presencia de la bacteria. Los resultados determinaron que el PCR en tiempo real llegó a ser 100 veces más sensible que una PCR convencional. Además, concluyeron que, para hacer una muestra representativa y útil, es necesario recolectar las hojas con presencia de síntomas.

En el momento en el cual se detectó la presencia de la enfermedad por primera vez en Brasil, se tenían que llevar a cabo alrededor de seis reacciones por muestra para asegurar la detección de la presencia de *Ca*. L. asiaticus. Se trataba de un test muy costoso y que demandaba mucho tiempo. Es por eso que desarrollaron nuevas PCR, la denominada multiplex qPCR. El multiplex permite determinar la detección del patógeno en una única reacción. Esta reacción puede ser aplicada tanto para análisis cualitativos, cuantitativos y en la detección de bacterias en *Diaphorina citri*. Cuando desarrollaron esta nueva PCR, compararon con los métodos más empleados, que son los desarrollados por Li, Hartung y Levy (2006) y por Zheng, Xu, Bao, Wu,

Chen y Den (2016). De esta forma, comprobaron que el test desarrollado, mostró una sensibilidad muy similar al test de Zheng et al (2016). Asimismo, cuando evaluaron los efectos, mostró una sensibilidad similar al evidenciado por Li *et al* (2006), que es un método de referencia.

También evaluaron si el método sería útil para el diagnóstico en el campo. Para ello, utilizaron más de 500 muestras reales de campo y aplicaron el método multiplex qPCR. Con esto, verificaron que todas las muestras quedaron con un valor de Cq muy bajo con respecto a su límite de corte, que es 35. Verificándose que las hojas con síntomas típicos fueran 100% positivas en este nuevo PCR. En dicho análisis, observaron que las muestras con deficiencia mineral fueron positivas en más del 50%. De esta forma, verificaron que este método es muy sensible.

Se comentó que, a la fecha, en Brasil presentan una predominancia de *Ca*. L. asiaticus, y que es muy raro encontrar una muestra en el laboratorio de FUNDECITRUS que sea positiva para *Ca.* L. americanus. Hay muchas hipótesis que pueden explicar esta situación. Una de ellas refiere a la temperatura, porque *Ca.* L. americanus son considerados más sensibles que *Ca*. L. asiaticus.

Desde FUNDECITRUS, prepararon una cartilla de recomendaciones para recolectar muestras y enviarlas al laboratorio. Después de desarrollar el diagnóstico, las reacciones y confirmar los tests, se envían los resultados al productor. Considerando que desde hace 20 años conviven con la enfermedad en Brasil, los productores reconocen mejor los síntomas en campo y eso favorece la erradicación directa de plantas enfermas. Indicándose que el servicio de diagnóstico es una herramienta más en la lucha contra el HLB. El test de HLB ayuda a la prevención de la diseminación de la enfermedad en el campo, porque el productor puede sacar la planta afectada y disminuir la fuente de inóculo. Todo esto, permite a los productores a tomar decisiones más acertadas sobre las aplicaciones de insecticidas. Además, el servicio de diagnóstico sirve de apoyo a la investigación y desarrollo de nuevas tecnologías.

Presentación: Desarrollo de Kit Portable para el Diagnóstico de HLB Basado en el sistema CRISPR-Cas12.

Dra. María José Blariza, Investigadora del Laboratorio GIGA y del Instituto de Biología Subtropical

La Dra. Blariza comentó que, junto con el Dr. Marcos Miretti, lideran un proyecto de desarrollo de un *kit* portable para el diagnóstico de HLB, basado en el sistema de CRISPR-Cas12. Este proyecto se desarrolla en el Laboratorio GIGA, que pertenece al Instituto de Biología Subtropical que es un instituto del CONICET y la Universidad Nacional de Misiones, y le EEA INTA Bella Vista, la cual forma parte de una tesis de Maestría a cargo de la becaria de formación de INTA, la Ing. Paula Aranda.

La detección temprana del HLB representa un gran desafío, ya que, en las etapas iniciales de la infección, la planta no muestra síntomas visibles. Esto facilita la acumulación de un reservorio significativo de la bacteria, que posteriormente prolifera por toda la planta debido a la elevada carga bacteriana inicial, la cual es muy difícil de detectar, incluso utilizando métodos altamente sensibles como el PCR en tiempo real. Además, el patógeno se distribuye de manera desigual dentro de la planta, confinándose a partes específicas, lo que dificulta la obtención de muestras representativas para un diagnóstico preciso. A esto se suma que los síntomas del HLB son similares a los provocados por deficiencias nutricionales o condiciones de estrés abiótico, lo que complica aún más su identificación temprana.

Los métodos actuales para la detección del HLB son sumamente costosos, requieren infraestructura, equipamiento y personal altamente calificado. Actualmente, el método *gold standard* para la detección de HLB es el PCR en tiempo real, o qPCR, el cual es costoso, no permite un monitoreo a escala ni llevar a cabo el diagnóstico *in situ,* sino que requiere equipamientos y laboratorios. Esto hace que, frente a una gran demanda de estudios de muestras, esto se centralice en puntos muy específicos y genere demora a la hora de realizar un diagnóstico. Por lo que la solución propuesta por su equipo, consiste en el desarrollo de un *kit* de diagnóstico basado en la tecnología de CRISPR-Cas12. Las características principales que tiene este *kit* es su portabilidad, no requiere de insumos y equipamientos costosos, es escalable, es rápido y más económico que el test *gold standard* actual. La tecnología CRISPR-Cas12 es una herramienta molecular basada en el sistema inmunológico natural que presentan las bacterias. Consiste en una proteína que tiene una actividad nucleasa que corta ambas hebras del ADN. Además, contiene una actividad colateral que, una vez que detecta la secuencia específica, corta secuencias de ADN de cadena simple y esto permite incorporar un reportero, que tiene un fluoróforo. También cuenta con un puencher, que, al ser cortado, emite fluorescencia y permite ser detectado por diversos sistemas.

La Dra. Blariza señaló que diseñaron una guía de crRNA, para la cual formaron un complejo con la proteína Cas12, colocan dentro de ese reactivo un producto de PCR, se coloca este amplicón y, una vez que la guía reconoce a esta secuencia altamente específica, la proteína Cas12 activada

por PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), corta esta secuencia específica y como actividad colateral, rompe todos los oligonucleótidos que actúan como reportero. Luego, comentó que se dedicaron a buscar el gen hipotético, analizaron la secuencia de variaciones, realizaron un estudio de esta secuencia y procedieron a diseñar la guía. Este último es el paso crítico porque es la secuencia complementaria al blanco que se quiere detectar. Se aseguran que sea una región altamente repetitiva en el genoma, de tal manera que, con baja carga de la bacteria, se tenga una buena sensibilidad y pueda ser detectado.

Se indicó que, para estas tecnologías, hay muchos programas de software desarrollados, pero ellos utilizan CRISPR Scan. Una vez diseñadas varias guías, se realizó la síntesis de las cuatro guías de DNA más precisas, y se procedió a una transcripción *in vitro*. Para ello, se agregó el promotor T7, transcripción, y obtención de las guías en ARN para formar el complejo con la CAS12, la guía que mostró una mejor *performance*. De esta forma, formaron el complejo y añadieron el producto de PCR.

Actualmente cuentan con productos de PCR de muestras positivas y negativas confirmadas previamente por otros métodos, que sirven para verificar su eficacia por lo que se encuentran en etapas de validación de la técnica y obtener la máxima seguridad y fidelidad de este método con los resultados de los métodos convencionales. Una vez que se ven los resultados de amplificación en termociclador, se puede visualizar esta fluorescencia sobre cualquier transiluminador. De esta forma, se puede observar la presencia de la fluorescencia en los casos positivos con respecto a los negativos. El desafío, en el que se encuentran actualmente, es llevar a hacer este *kit* portable, para realizar estudios de campo que garanticen la robustez en el escenario real. Es interesante destacar que, dentro de las primeras 30 compañías que trabajan con la metodología CRISPR, aproximadamente el 90% se dedica a la edición génica y menos del 10% utiliza esta tecnología como método de diagnóstico, principalmente para enfermedades humanas. Pero, para enfermedades vinculadas a la agricultura, no hay nada desarrollado hasta el momento.

Presentación: “Avances en Diagnóstico Molecular de Huanglongbing (HLB): Nuevas Alternativas a las Técnicas de PCR Convencional”.

Dr. Félix Morán Villamizar, Investigador de Laboratorios Nacionales de Referencia en Bacterias Fitopatógenas y en Virus, Viroides y Fitoplasmas de Frutales

El Dr. Villamizar abordó una metodología alternativa a las técnicas de PCR, que pueden ser suplementarias. Sostuvo que las principales especies que se asocian al HLB son las especies del género *Ca.* L. africanus, *Ca.* L. americanus y *Ca.* L. asiaticus., pero el principal protagonista es la especie de *Ca.* L. asiaticus. Aunque son especies ampliamente distribuidas en el continente africano, americano y asiático, también hay regiones que, por el momento, se encuentran libres de la enfermedad, como puede ser Europa o Australia. Sin embargo, estos ecosistemas libres de HLB se encuentran amenazados por la presencia de vectores de transmisión de estas bacterias.

Se sabe que el HLB no tiene cura, por tanto, la única estrategia efectiva es la prevención. En tal sentido, el objetivo en las zonas libres de HLB es evitar la introducción de esta enfermedad. Para evitar la introducción, se debe contar con herramientas que sean capaces de detectar la bacteria, que sean precisas, sensibles y permitan a los equipos técnicos reaccionar de forma rápida ante un posible evento de detección. El Dr. Villamizar mencionó que el PCR *Gold standard*, es la herramienta utilizada por excelencia en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico fitopatológico en todo el mundo. Esto se debe a que son técnicas muy específicas, es decir, son capaces de detectar la especie y las cepas. Además, son muy sensibles y permiten detectar las bacterias en diferentes tipos de matrices, diferentes tejidos de la planta o incluso otros ecosistemas. También permiten obtener resultados en cuestión de horas, si hay un protocolo estandarizado en el laboratorio. Otro punto positivo que presentan la técnica del PCR estándar es que permite cuantificar la carga patogénica que se tiene en la muestra. Asimismo, en los últimos años, se está observando que se pueden detectar varios patógenos a la vez.

Entre sus limitaciones, se resalta que para la determinación molecular del HLB existe la necesidad de equipamientos costosos y personal capacitado para que desarrollen las técnicas. Además, generalmente se requiere una previa purificación de ácidos nucleicos para que funcione adecuadamente. Aunque en los últimos años los reactivos se han abaratado, el método sigue siendo costoso, si se lo compara con otras técnicas tradicionales como pueden ser las serológicas. Con respecto a la especificidad dinámica del PCR standard, resaltó que son protocolos que deben de ser constantemente revisados. Asimismo, son técnicas sensibles a inhibidores, principalmente a metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas, como pueden ser los polifenoles. Se trata de una técnica que detecta la carga genética y no es capaz de discriminar si la bacteria está viva o muerta, a menos que se empleen otras técnicas acopladas. Por tanto, existen al día de hoy alternativas a los test PCR standard. Una de las más conocidas son las técnicas serológicas. Cada vez se utilizan menos por su baja sensibilidad, en comparación a las técnicas moleculares, aunque, principalmente en laboratorios que no tienen recursos económicos suficientes. Asimismo, se indicó que, también para el caso del HLB, hay una alternativa a la PCR que fue

bastante prometedora, mediante la detección olfativa canina. Pero si se observan los estudios realizados, es una metodología de difícil implementación.

Sobre los métodos de CRISPR-Cas mencionó que son métodos específicos por el RNA guía que se utiliza acoplado a las proteínas CRISPR-Cas. Además, son métodos rápidos porque suelen asociarse a amplificaciones isotérmicas. Son métodos que suelen ser muy sensibles, aunque esta sensibilidad normalmente dependa del proceso de preamplificación que se utilice para obtener el ADN que las proteínas CRISPR-Cas van a detectar. Del mismo modo, hizo mención a los métodos de amplificación basados en la creación de *loops* o de estructuras secundarias de ADN. Sostuvo que se trata de un método isotérmico rápido porque se emplean proteínas termoestables, son bastante sencillos y se basan en el empleo de una DNA polimerasa termoestable. Se emplea una estrategia de diseño para que se produzcan estos *loops* que luego son detectados mediante diferentes métodos de detección como podrían ser los CRISPR-Cas o un agente intercalante.

Por otra parte, se centró en el método de amplificación isotérmica (RPA) basado en el empleo de de tres enzimas mediante recombinación y amplificación. Se trata de un método bastante rápido, sencillo, tolera los inhibidores y, hasta hace unos años, era un método que no presentaba una alta sensibilidad y especificidad. Con el paso de los años, cuando se desarrolló la versión de tiempo real, en la cual se empleaban sondas, estos criterios de sensibilidad y especificidad mejoraron significativamente. Continuó planteando que diseñaron un método capaz de detectar a las tres especies de HLB a la vez, basándose en un RPA, pero de tiempo real. Es decir que emplearon sondas capaces de observar en tiempo real la presencia de la bacteria en un tiempo de reacción es de 35 minutos, aunque a partir de los 5 minutos ya se puede apreciar la detección de la bacteria, en el caso de una muestra que tenga alta carga bacteriana.

Aprovechando estas ventajas, se validaron estos métodos siguiendo los criterios de la *European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO rules).* Mediante los mismos, evaluaron en detalle la especificidad y la elección del DNA. Con respecto a la elección del gen amplificado, comentó que no fue una elección al azar, sino que evaluaron todos los genomas disponibles de los Liberibacter asociados al HLB. Buscaron genes de mantenimiento celular candidatos que puedan ser útiles para la detección simultánea de las tres especies y dieron con uno que es el gen *fus*-A. En base a ese gen, diseñaron los iniciadores. Se evaluó la sensibilidad analítica de dos formas, tanto con ADN sintético como con muestras naturalmente infectadas, tanto en cítricos como en vectores. Lo que observaron fue que, en comparación al PCR en tiempo real, su método poseía mayor sensibilidad. De esta forma, comentó que fueron capaces de detectar hasta cuatro copias de bacteria por microlitro. Evaluaron la sensibilidad diagnóstica comparándola con una PCR en tiempo real y la especificidad diagnóstica fue mucho mayor, obteniendo niveles de sensibilidad de una PCR convencional sin problemas y en solo unos minutos. Además de evaluar la sensibilidad y especificidad, consideraron evaluar la reproducibilidad y la repetitividad del método. Para ello emplearon las muestras que estaban en los límites de detección y lo probaron en diferentes laboratorios con diferentes fluorímetros y operadores. Los resultados fueron

bastante buenos porque en todos los casos fueron capaces de detectar la bacteria en ambos laboratorios. Planteó que es un método útil para que pueda ser utilizado por muchos otros laboratorios.

Por último, se comentaron otras técnicas alternativas que están siendo trabajadas en su laboratorio, como por ejemplo las técnicas de secuenciación masiva en el diagnóstico, que se basan en la secuenciación masiva del ADN total o del RNA total de la muestra, en la que a partir de esta secuenciación y mediante análisis bioinformático, son capaces de detectar y de identificar a la bacteria. Incluso, se puede llegar a recuperar genomas completos o genes de mantenimiento celular. En los últimos años, han aparecido estas técnicas de tercera generación, basadas en la secuenciación mediante tecnología Nanopore. Se trata de una técnica de secuenciación isotérmica, lo cual ha simplificado los requerimientos sobre el equipamiento para desarrollarla. Hasta el momento esta parece ser una herramienta bastante prometedora para que pueda ser implementada en laboratorios de diagnóstico de forma rutinaria.

Comentó que, en el IVIA, junto a otro laboratorio de Francia, están explorando todas estas posibilidades, con resultados aún muy preliminares, observándose que la secuenciación total con Ilumina funciona muy bien, porque permite detectar hasta el 78% de la información genética del *Ca.* L. asiaticus. Además, estos equipos de investigación son capaces de detectar otros organismos que puedan estar asociados al HLB pero que sean desconocidos hasta el momento, mediante análisis bioinformáticos.

A modo de conclusión, planteó que existen alternativas prometedoras a las técnicas de PCR para la detección que amplían las posibilidades de diagnóstico. Asimismo, los métodos moleculares isotérmicos destacan por su alta sensibilidad, especificidad y precisión, siendo especialmente útiles para los análisis rápidos en campo. Del mismo modo, las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento permiten identificar con precisión tanto agentes patógenos conocidos como nuevos que puedan estar asociados al HLB. Igualmente, estas alternativas no reemplazan completamente a la técnica standard, su uso puede mejorar la velocidad de respuesta y la eficacia ante amenazas importantes de la enfermedad.

Presentación: "Uso de un método Molecular simplificado para la detección de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, agente causal del Huanglongbing".

Dra. Fabiana Stolowicz, Investigadora del CONICET en el ICT-Milstein

La Dra. Stolowicz sostuvo que el HLB es la enfermedad más devastadora de los cítricos a nivel mundial. Se genera mediante una bacteria que, ante la imposibilidad de ser cultivada en el laboratorio, lleva el nombre de *Candidatus Liberibacter*. La misma se ha transmitido al resto del mundo y, en América principalmente, está presente el *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Mencionó que, en Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) controla el HLB mediante el Programa Nacional de Prevención de HLB.

Para su manejo, los programas de control de HLB deben cumplir los siguientes requisitos:

- Las plantas que se utilicen estén certificadas como libres de enfermedad.
- Controlar a la población del psílido vector *Diaphorina citri*.
- Remover todos los árboles infectados que puedan servir de inóculo para la adquisición de la bacteria por parte del insecto vector.

Comentó que en Argentina el Programa Nacional de Prevención de HLB (coordinado por el SENASA) realiza inspecciones visuales en plantaciones citrícolas y arbolado urbano y toma muestras del insecto vector y del material vegetal con síntomas. Con eso, se hace un diagnóstico de plantas e insectos por métodos moleculares (qPCR). Junto al SENASA, una red de laboratorios trabaja para recibir estas muestras en diversas partes del país y hacer la detección de la bacteria mediante PCR cuantitativa o *Real Time* PCR. El PCR es una técnica muy sensible, específica, requiere mucha infraestructura costosa y recursos humanos altamente calificados.

Frente a estas propuestas, se realizó una descripción del desarrollo del NEOKIT HLB, que se basa en una amplificación molecular isotérmica por LAMP. En este kit, la lectura es directa, por viraje de color. Puede utilizarse, al igual que para la PCR cuantitativa, ADN purificado. Sin embargo, también puede utilizarse directamente en nervaduras de cítricos, con un análisis muy sencillo y con mucha rapidez. Este método no requiere un equipamiento sofisticado, ni requiere personal altamente calificado. El kit descrito requiere de la enzima *Bst* que tiene actividad de DNA helicasa y polimerasa, es decir puede abrir las cadenas del DNA y polimerizar. Es muy resistente a la inhibición de distintos metabolitos.

Además, esta técnica utiliza seis juegos de *primers* que hibridizan en distintos lugares del ADN genómico de la bacteria, lo que la hace muy específica y sensible. Esta técnica es isotérmica, con lo cual no se requiere equipamiento sofisticado, solamente un simple calentador que puede costar 100 veces menos que un termociclador debido a que el requerimiento es que la temperatura durante el proceso sea constante.

El segundo punto interesante de la técnica es su lectura simplificada. Esto quiere decir que, dentro del buffer de reacción, se coloca un colorante azul de hidroxinaftol que, sin reaccionar, tiene una coloración violeta. Luego de la amplificación isotérmica vira hacia un color azul-celeste. Esto quiere decir que no requiere un equipo para su revelado. Esto lo hace más económica y más simple de realizar. La técnica implica la utilización de tubos de reacción, a los que solo hay que agregarle el templado de ADN genómico de las plantas. Luego de la incubación, se observa que los tubos negativos permanecen violeta, mientras que los positivos para CLas viran al color azul.

Se explicó que, como esta bacteria no es cultivable *in vitro*, la sensibilidad se determina mediante dos aproximaciones. La primera consiste en utilizar un fragmento clonado en un plásmido, haciendo diluciones de ese fragmento, incubándose la muestra, y observándose su coloración para cuantificar la sensibilidad.

Otra aproximación para determinar la sensibilidad fue hacer un test comparativo entre el NEOKIT HLB y la qPCR. Con un ADN genómico de una planta que ya había sido chequeada como positiva por qPCR, se realizaron diluciones seriadas de ese ADN genómico y la misma dilución fue utilizada para realizar una qPCR. Para esta planta, observaron el producto amplificado que se correlaciona con la técnica *Gold Standard,* visualizando además la electroforesis en un gel de agarosa. Con estos resultados prometedores, se hicieron un ensayo con muestras reales desde el campo. Lo primero que hicieron fue utilizar muestras de ADN genómico purificado. Las muestras provinieron de cinco laboratorios. En todas las muestras se observó una precisión y sensibilidad diagnóstica muy altas, y una especificidad poco variable. Para ir un paso más allá de estos resultados, se quiere llevar a cabo una validación con muestras directas de nervadura. Se ha realizado una primera validación con 20 muestras con diagnóstico emitido por laboratorios miembros del Programa Nacional de Prevención de HLB, observándose sensibilidad diagnóstica y precisión del 100%. En base a esto, se señala que se espera ahora validar esta técnica con extractos de muestras directas.

Este laboratorio, tiempos de pandemia, ha logrado desarrollar el NEOKIT COVID-19, que es un diagnóstico molecular simplificado, simple, rápido, asequible y útil de coronavirus. Ahora, este nuevo kit se ha podido utilizar ya en algunas provincias para pruebas en terreno. Actualmente, el área de producción del laboratorio presenta una sección de fraccionamiento, de preparación de soluciones, de preparación de positivos, de acondicionamiento, control de procesos y de control de calidad, por lo que este desarrollo se encuentra en un período de finalización antes de su comercialización.

Preguntas y respuestas

1- **Para el Ing. Loeza Kuk, ¿Es consistente la ausencia de *Candidatus* Liberibacter en psílidos en los meses de junio y julio? Por otro lado, ¿El muestreo de los psílidos se hace en individuos adultos? ¿En el caso de ciudades no productoras, se hacen muestreos en zonas urbanas?**

Ing. Loeza Kuk: El muestreo se hace en individuos adultos, que son los que tienen capacidad de movilizarse. El mismo se hace a fines de observar si se está moviendo la bacteria.

Con respecto a si se han llevado a cabo trabajos para diagnóstico y detección de la bacteria en traspatios. En México, el principal problema es que existen muchos árboles en traspatio. A final de cuentas, una vez infectados, sirven como fuente de inóculo para las huertas productoras.

2- **Para la Dra. Martins: ¿Se han detectado casos de co-infección de Liberibacter y fitoplasma? ¿Es frecuente que esto ocurra?**

Dra. Martins: Si, es posible tener infecciones tanto de *Ca.* L. *americanus* y *Ca. Liberibacter asiaticus* en una única planta. Y también Liberibacter con fitoplasma. Pero es muy rato. Actualmente, predomina *Candidatus Liberibacter asiaticus* en las muestras que recibimos en el laboratorio. Se hicieron experimentos donde se tenía una planta infectada con *Ca.* L. americanus, inyectando en esta planta candidatos *Candidatus* Liberibacter asiaticus. Después de un tiempo la planta fue tomada por los *Candidatus* Liberibacter asiaticus y los *Ca.* L. americanus desaparecieron. Con respecto a esto, hay algunas hipótesis: que a los *Ca.* L. americanus les faltan algunos genes, que *Candidatus* Liberibacter asiaticus tienen. Esto puede justificar que la adaptación de *Candidatus* Liberibacter asiaticus es mejor que el de los *Ca.* L. americanus.

3- **Para la Dra. Blariza: ¿Para aplicar el kit necesitaría extraer material genético? En ese caso, ¿Los costos de extracción están incluidos? Por otro lado, ¿Qué pasaría si no se usa el ADN sino un extracto vegetal en el *kit*?**

Dra. Blariza: El costo de extracción de ADN no está considerado en la presentación. Por supuesto que se necesita una extracción previa. Sin embargo, hay kits que son bastante simples, económicos y que implica hacer un extracto de manera muy simple, sin equipamiento.

4- **Para el Dr. Villamizar: ¿Qué debe pasar para que un método desarrollado sea aceptado en las normas *European and Mediterranean Plant Protection Organization* (EPPO)?**

Dr. Villamizar: Lo primero que tenemos que hacer es seguir los protocolos PM 7. No solo existen protocolos para el diagnóstico de la detección de patógenos, sino también guías para hacer un procedimiento adecuado. En el PM7-98, se marcan las directrices mínimas que exige la EPPO para validar ese protocolo. Entonces lo primero que se debe hacer para que un protocolo sea

considerado por la EPPO es que, al menos su diseño se haya hecho siguiendo esas normas y criterios.

5- **Para la Dra. Stolowicz: El método que mostraste es muy sensible y robusto. Pero en el caso de que se analicen muchas muestras y haya contaminación, ¿Se tiene en ese kit un control interno de contaminación?**

Dra. Stolowicz: El kit no posee un control interno. Y aunque por supuesto que se podría tener una contaminación, lo que hemos observado es que, en la validación, hemos procesado muchas muestras. Si bien puede haber algún falso positivo, no es alto el número. En el diagnóstico, hay que tener áreas separadas y ser muy riguroso. Por eso se requiere personal que haya pasado por una capacitación sencilla, para trabajar correctamente, mantener áreas limpias de ácidos nucleicos y separarlas de las áreas donde se carga la muestra o se hace revelar.

Conclusiones

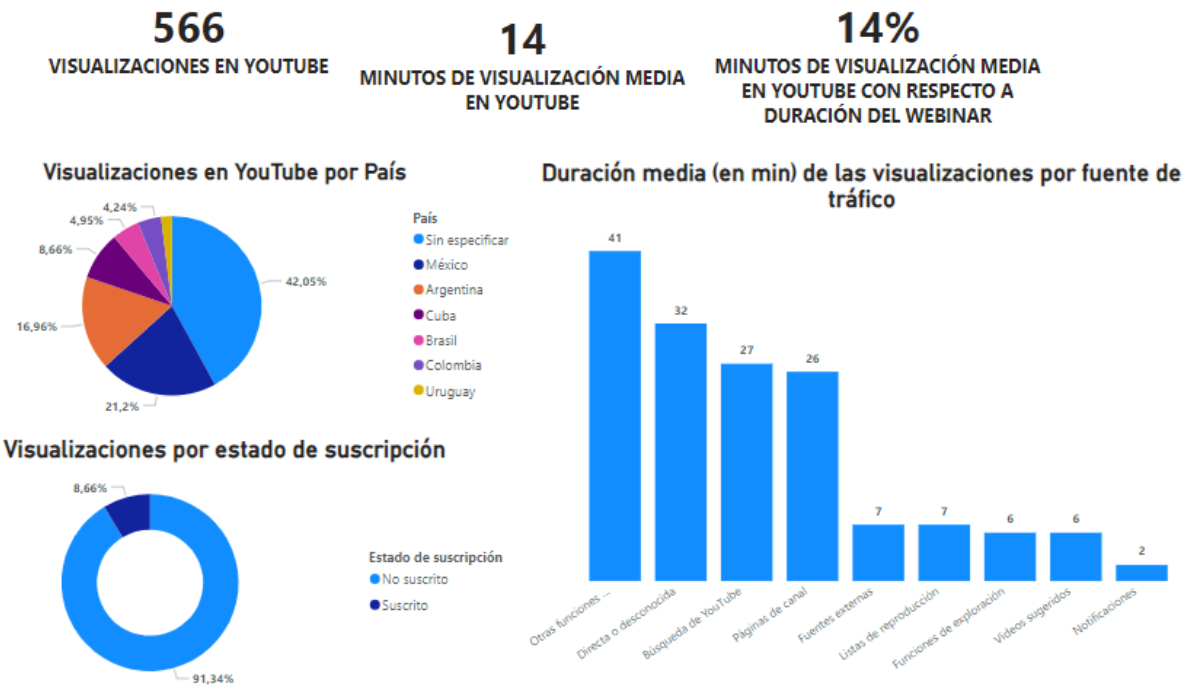
El Huanglongbing (HLB) o *Citrus Greening* se presenta como uno de los desafíos más críticos para la citricultura mundial debido a su impacto devastador en la productividad de las plantaciones y su rápida propagación. En este contexto, el webinar destacó la importancia de la transferencia de conocimientos y la colaboración entre instituciones para mitigar los efectos de esta enfermedad. Entre los enfoques abordados, se enfatizó la necesidad de herramientas de diagnóstico temprano, especialmente en regiones libres de HLB, para prevenir la introducción de la bacteria y actuar rápidamente ante su detección.

El evento destacó las limitaciones y ventajas de los métodos actuales, como el PCR *standard*, conocido por su precisión y sensibilidad, aunque costoso y dependiente de infraestructura avanzada. También se exploraron técnicas alternativas prometedoras como las pruebas de amplificación isotérmica (RPA y LAMP) y las herramientas basadas en CRISPR-Cas, las cuales ofrecen rapidez y simplicidad. Adicionalmente, las tecnologías de secuenciación masiva están comenzando a demostrar su potencial no solo para detectar patógenos conocidos, sino también para identificar nuevos asociados al HLB.

Uno de los desarrollos más innovadores presentados fue el NEOKIT HLB, una herramienta molecular simplificada que utiliza amplificación isotérmica LAMP con lectura directa por cambio de color. Este método destaca por su accesibilidad, al requerir equipos y personal menos especializados, y su capacidad para ofrecer resultados rápidos y precisos. El NEOKIT se perfila como una solución viable y económica para laboratorios en la región, complementando las estrategias actuales de prevención y control del HLB.

Estadísticas

Estadísticas de YouTube al 13/12/2024



Estadísticas sobre visualizaciones de YouTube:

YouTube expone las estadísticas de cantidad de visualizaciones en vivo y en diferido. En tal sentido, brinda información sobre el país desde el cual algunos de los usuarios han visto el video, que se identifica en los gráficos.

Asimismo, muestra la duración promedio en la que los usuarios han visto el video. Esto ha sido comparado con respecto a la duración del webinar. También se expone la cantidad de tiempo promedio (en minutos) en las que se ha visto el webinar, por fuente de tráfico: dependiendo si el usuario hizo la búsqueda en YouTube, si recibió notificaciones u otras fuentes.

Anexo. Imagen del evento

Anexo 1: Fotografía de los panelistas: Alberto Gochez, Eugenia Saini, Elaine Martins, Félix Morán Villamizar, Fabiana Stolowicz, María José Blariz y Emiliano Loeza Kuk.

Referencias

W. Li, J. S. Hartung, L. Levy (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with Citrus Huanglongbing. Journal of Microbiological Methods, Volume 66, Issue 1, Pages 104-115, ISSN 0167-7012, https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018.

Zheng Zheng, Meirong Xu, Minli Bao, Fengnian Wu, Jianchi Chen y Xiaoling Deng (2016). Unusual five copies and dual forms of nrdB in "Candidatus Liberibacter asiaticus": Biological Implications and PCR Detection Application. VL - 6. DO - 10.1038/srep39020. JO - Scientific Reports, https://www.researchgate.net/publication/311620425_Unusual_Five_Copies_and_Dual_Forms_of_nrdB_in_Candidatus_Liberibacter_asiaticus_Biological_Implications_and_PCR_Detection_Application

Biografías de los participantes

Eugenia Saini

Secretaria Ejecutiva de FONTAGRO. Ingeniera Agrónomo, doctora en Ciencias Agropecuarias, apasionada por la agricultura, la alimentación de las personas y la mejorar la vida de los agricultores. Con 25 años de trabajo en la planificación estratégica y ejecución de la cooperación internacional en ciencia e innovación, promoviendo la agroindustria y el desarrollo sostenible. Recibió una beca Fulbright en la Universidad de Cornell y, más recientemente, la beca Abshire-Inamori Leadership Academy (AILA) en el Centro de Estudios Estratégicos e Internacionales (CSIS) en Washington D.C.

Alberto Gochez

Referente por INTA en la temática HLB de los Citrus. Representante por INTA en la Comisión de Trabajo Interinstitucional de HLB (desde Marzo/2019). Especialista en Interacción Planta Patógeno del patosistema Cancrosis de los Citricos. Realiza y supervisa tareas de laboratorio de fitopatología de Citrus (aislamientos de patógenos de citrus y análisis molecular). Diseño de ensayos de campo. Análisis, evaluación y registro de datos. Formador de RRHH. Adiestramiento de investigadores, profesionales, alumnos universitarios, de tecnicaturas y secundarios en Enfermedades Cuarentenarias en Citrus y metodología de investigación con bacterias y hongos.

Emiliano Loeza Kuk

Ingeniero Agrónomo por la Universidad Autónoma Chapingo, con postgrado en Fitopatología por el Colegio de Postgraduados en el tema de Cítricos: Laboró en la Dirección General de Sanidad Vegetal para la Campaña de plagas Cuarentenarias de los Cítricos. Actualmente labora en el Campo Experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias en Mocochá, Yucatán. Es responsable de laboratorio de Fitopatología y Biotecnología.

Elaine Cristina Martins

Posee licenciatura en Farmacia-Bioquímica por la Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) y un doctorado en Biotecnología por el Instituto de Química de la misma institución. Actualmente es Analista de Investigación en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades de los Cítricos en Fundecitrus (Fondo de Defensa de la Citricultura). Tiene experiencia en microbiología y biología molecular, con enfoque principal en los siguientes temas: diagnóstico de fitopatógenos mediante PCR convencional y qPCR.

Maria José Blariza

Licenciada en Genética de la U. Nac. Misiones, con especialización en Biología Molecular. Se especializa en desarrollar estrategias pioneras de última generación para controlar los vectores de enfermedades. Su investigación se centra en el Huanglongbing (HLB), y su transmisión por Diaphorina citri, explorando genes diana clave y desarrollando sistemas de administración basados en RNAi prácticos y aplicables en el campo para controlar la propagación del HLB, a fin de ofrecer soluciones efectivas y escalables para el manejo de enfermedades en la agricultura.

Félix Morán Villamizar

Investigador postdoctoral del IVIA, con más de 8 años de experiencia en el diagnóstico fitopatológico. Obtuvo su doctorado con honores en la Universidad de Valencia (España) y actualmente desarrolla su labor en los Laboratorios Nacionales de Referencia en Bacterias Fitopatógenas y en Virus, Viroides y Fitoplasmas de Frutales. Su trayectoria incluye más de 20 publicaciones científicas y la participación en más de 10 proyectos competitivos de investigación.

Fabiana Stolowicz

Ha realizado su doctorado en Biología Molecular de plantas en la fundación Instituto Leloir. Luego ha trabajado por más de diez años en diversas empresas de la Industria Argentina, fundamentalmente en Biotecnología Vegetal. Desde el año 2014 se desempeña como Investigadora (CONICET) en el ICT-Milstein, y participa en el Desarrollo de una Plataforma Tecnológica para el diseño y producción de Kits de diagnóstico molecular rápidos y simples, de fácil implementación y lectura del tipo POINT OF CARE (POC). Varios de estos Kits realizados para detectar Covid-19, Chagas en neonatos y Dengue, ya fueron aprobados por La Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica de Argentina. En particular de interés para el agro, junto al Dr. Adrián Vojnov, han desarrollado un kit para la detección del HLB. Todos estos trabajos han devenido en una patente y algunas publicaciones en revistas científicas.

Secretaría Técnica Administrativa

FONTAGRO

Con el apoyo de:

BID
Banco Interamericano de Desarrollo

IICA

www.fontagro.org
Correo electrónico: fontagro@fontagro.org