

# DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN CLONES DE POMELO (*Citrus paradisi* Macf.), SELECCIONADOS EN LOS DEPARTAMENTOS DE SAN PEDRO Y CONCEPCIÓN<sup>1</sup>

PEREZ, J. A.<sup>2</sup>  
GONZALEZ S., L. R.<sup>3</sup>

## ABSTRACT

The present work was carried out at the experimental field of the Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, in San Lorenzo, Paraguay. The main aim of this investigation was to determine the severity and presence of the Citrus Tristeza Virus (CTV- Closterovirus) in selected grapefruit clons, by developeny the biological indexing to the indicative plant, Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing). The experiment was developed from November 2005 through February 2007. If were selected 5 (five) gapefruit clons (*Citrus paradisi* Macf.) from Concepción, and another 5 clons from San Pedro. They were previously obtained from select works at the Biology department FCA/UNA. As rootstocks, it was used sour orange plants (*Citrus aurantium* L) obtained by seeds. Incide them was grafted the grapefruit clons. As far as the spourtness reached the height of 15 to 20 centimeters, it was laterally grafted with the indicative plant. The Mexicam lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing) obtained from the aphid Prof. Screenhouse. It was proved the presence of the CTV in all the analized plants, but with loft signs. It was also proved the absence of stem pitting signs in the stem of different studied clons.

**KEY WORDS:** (CTV) Tristeza, grapefruit clons, severity and presence of the CTV, veian clering, stem pitting

## RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Campus de la Universidad Nacional de Asunción, en la ciudad de San Lorenzo, República del Paraguay. La finalidad principal de esta investigación fue la de detectar la presencia y severidad del virus de la tristeza de los cítricos (CTV- Closterovirus), en clones seleccionados de pomelo a través del test biológico usando como planta indicadora limón sutil (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing). El experimento se desarrolló entre noviembre 2005 a febrero de 2007. Se seleccionaron 5 clones de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) de Concepción y 5 clones de San Pedro, previamente obtenidos en trabajos de selección del departamento de Biología FCA/UNA. Como portainjerto se utilizaron plantas de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L), obtenidos por semillas, en los cuales se injertaron los clones de pomelo, cuando las brotaciones de las yemas injertadas alcanzaron una altura de 15 a 20 cm se injertó lateralmente la planta indicadora. El limón sutil, fue obtenido de la casa de mallas anti-áfidos. Se observaron los síntomas de clorosis nervial y acanaladuras en los tallos. Se demostró la presencia del CTV en todas las plantas analizadas, pero con síntomas suaves, también se demostró la ausencia de síntomas de acanaladuras en el leño en los diferentes clones estudiados.

**PALABRAS CLAVE:** Tristeza (CTV), clones de pomelo, diagnóstico del CTV, clorosis nervial, acanaladuras.

<sup>1</sup> Trabajo de Tesis de grado presentada a la facultad de Ciencias Agrarias, FCA-UNA, como requisito para la obtención del título de Ingeniero Agrónomo, Departamento de Protección Vegetal.

<sup>2</sup> Ing. Agr. Egresado de la FCA-UNA joseperezbf81@hotmail.com Tel: 0981-554972

<sup>3</sup> Prof. Ing. Agr. (MSc.) Docente-Investigador de la FCA-UNA, Director del Departamento de Biología

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por virus, viroides y otros organismos similares producen importantes pérdidas económicas en los cítricos de todo el mundo. Algunas enfermedades provocan la muerte de las plantas y otras disminuyen la producción y la calidad de la fruta, causando pérdida de vigor y longevidad de la planta, los síntomas producidos son sistémicos o sea se encuentran distribuidos por toda la planta. Los virus y viroides son parásitos obligados de las células que pueden multiplicarse solamente en células huésped vivas (Milne et al., 2003).

Entre las enfermedades virósicas principales que afectan a los cítricos esta la tristeza, transmisible por pulgones, que causa la muerte de los árboles de naranjos (*Citrus sinensis* L Osbeck), mandarinos (*Citrus reticulata* Blanco) y pomelos (*Citrus paradisi* Macf) cuando son injertados sobre naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.); la exocortis, producida por un viroide, provoca enanismo de los árboles y disminución de la cosecha; la psorosis, que produce declinamiento, pérdida de vigor; la xyloporosis, que causa disminución de la cosecha (Navarro, 1979).

Uno de los virus de mayor importancia es la tristeza de los cítricos (CTV-closterovirus), diseminada en la mayoría de las áreas cítrícolas del mundo y en el Paraguay, donde es prácticamente una enfermedad endémica, afectando sobre todo a especies sensibles como el pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) y la naranja (*Citrus sinensis* L.). El virus que causa la enfermedad de la tristeza de los cítricos (CTV), pertenece al grupo de los closterovirus (virus filamentosos flexuosos) de unos 2.000 nm de largo por 10–12 nm de ancho, su genoma esta constituido por ácido ribonucleico de cadena simple (ssARN) (Cambra et al, 1991) (Timmer et al, 2000)

El CTV provoca el bloqueo de los haces conductores de savia en el ámbito de la línea de injerto y los árboles injertados sobre naranjo amargo decaen al infectarse. De ahí, el nombre de «tristeza», ya que los árboles se marchitan y llegan a morir. Este decaimiento puede ser lento, sucediendo a lo largo de meses o pocos años o repentino, unos días, tipo colapso. Al final, los árboles mueren o quedan improductivos con producción inferior a la normal y frutos de menor calibre (Cambra, 2000). El virus de la tristeza de los cítricos produce una clorosis nervial y acanaladuras en la madera. Produce también amarillamiento de plantas francas de pomelos y naranjos.

Duran-Vila & Moreno (2000), indican que el síntoma de clorosis nervial y acanaladuras o «Stem pitting» en la madera se manifiesta en distintas especies de cítricos, cultivadas como plantas francas o injertadas sobre cualquier patrón, entre las especies más sensibles están las limas ácidas como la lima de México o más

conocida en Paraguay como limón sutil, (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing), entre las especies más tolerantes están los mandarinos. La clorosis nervial consiste normalmente en amarillamiento discontinuo de los nervios secundarios, pero los aislados más virulentos pueden dar lugar a una suberización generalizada de las nervaduras. Las hojas afectadas pueden mostrar epinastia en sus estadios inmaduros, que suele desaparecer al expandirse la lámina.

En el leño luego de retirar la corteza se observan depresiones alargadas o cortas, muchas veces impregnadas por una sustancia marrón, estos canales son encontrados tanto en troncos como en ramas finas, observados muchas veces sin retirar la corteza, conocido como stem pitting (Muller, 1976)

En la naturaleza el CTV es transmitido por áfidos, siendo el más eficiente el (*Toxoptera citricida* K.), lo realiza en forma semipersistente, la otra forma de transmisión la provoca el hombre con los injertos.

En el manejo del CTV resulta importante la detección del mismo así como determinar la severidad de las estirpes o razas locales, de modo a realizar programas de manejo de la enfermedad mediante la protección cruzada o preinmunización.

Por lo expuesto, éste trabajo tiene como finalidad diagnosticar la presencia del VTC, en las plantas de pomelos, seleccionadas en los Departamentos de San Pedro y Concepción. Así como, determinar la severidad de las estirpes encontradas en los clones seleccionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agrarias, Campus Universitario de la Universidad Nacional de Asunción, en la ciudad de San Lorenzo, República del Paraguay, en el periodo comprendido de noviembre de 2005 a febrero de 2007.

### Selección de clones de pomelos

La selección de los clones de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.), en los departamentos de San Pedro (SP) y Concepción (CN) se realizó en trabajos previos desarrollados por el Departamento de Biología de la FCA/UNA. Se utilizaron 5 (cinco) clones por cada departamento, para realizar el presente experimento. En la Tabla 1 se aprecian el departamento, la localidad y edad de cada clon seleccionado.

**TABLA 1. Selecciones de clones de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.).**

SELECCIÓN	DEPARTAMENTO	LOCALIDAD	EDAD (AÑOS)*
CN-1	Concepción	Arroyito	33
CN-2	Concepción	Arroyito	30
CN-3	Concepción	Tacuara	20
CN-5	Concepción	Horqueta	25
CN-6	Concepción	San Antonio (Horqueta)	25
SP-1	San Pedro	Naranjaty	25
SP-2	San Pedro	Barbero	40
SP-4	San Pedro	Barbero	30
SP-5.1	San Pedro	Barbero	25
SP-6.3	San Pedro	Barbero	35

\*Edad estimada por los productores locales

### Material biológico (Portainjerto)

Se usaron los patrones o portainjertos de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L), en el experimento se utilizaron cien plantas de Apepú Caazapá, elegidos por sus características sobresalientes, como tolerantes a exocortis, psoriasis, xyloporosis y gomosis, resistente a sequía, asfixia radical, etc., obtenidos de semillas que se sembraron en macetas plásticas de 30 X 12 cm en un sustrato compuesto por: 30% de estiércol, 70% de suelo franco arenoso. Cuando las plantas tuvieron entre 60 a 70 cm (6 a 8 meses) se procedió al injerto.

### Injerto de clones seleccionados de pomelo

Los clones de pomelos fueron obtenidos injertando yemas de las plantas seleccionadas, por el método de T invertida. Se realizó un corte de T invertida en el tallo a una altura entre 15 a 20 cm desde la base del portainjerto, se colocó la yema de pomelo en su interior y se cubrió con cinta plástica. Los clones se identificaron con etiquetas.

### Método de detección del virus

La detección del VTC se realizó utilizando como planta indicadora al limón sutil (*Citrus aurantifolia* Christm. Swing) obtenidas de la casa de malla anti-áfidos. Cuando las brotaciones del pomelo injertados sobre el naranjo agrio alcanzaron una altura de 15 a 20 cm, se procedió al injerto lateral de varetas de 10 cm de largo del limón sutil, de modo a observar los síntomas del virus de la tristeza de los cítricos en las nuevas brotaciones. Para clasificar los síntomas del CTV en la planta indicadora limón sutil se utilizó la escala propuesta por Carvalho et al. (1997), que establece los síntomas de clorosis nervial en la siguiente escala:

- Suaves (trazos muy débiles de clorosis nervial, ) (+)
- Severas (clorosis de la vena) (++)
- Muy Severas (clorosis nervial intenso inclusive hasta formar suberización de las nervaduras) (+++)

Las evaluaciones para identificar la clorosis nervial se realizaron durante 2 meses desde la primera aparición de síntomas, la misma consistió en la observación de cada hoja a contra luz para la percepción de los síntomas típicos del CTV.

### Estudio de la severidad del CTV en los clones seleccionados

Para determinar la severidad de la raza de CTV se utilizó el método propuesto por Carvalho et al, (1997), ver Tabla 2, para lo cual se midió la intensidad de las acanaladuras en el leño de las ramas de aproximadamente 16 meses de edad, según la escala siguiente:

**TABLA 2. Escala propuesta por Carvalho et al, (1997), para el Stem Pitting.**

ESCALA	NUMEROS DE CANALES EN EL LEÑO (PITTING)	DESCRIPCIÓN DE CANALES
0	0	Sin canales
1	1 a 15	Canales leves
2	16 a 30	Canales moderados
3	31 a 50	Canales fuertes
4	51 a 80	Canales severos
5	Cubierto totalmente	Canales muy severos

Fuente: Carvalho et al. (1997)

La evaluación del estudio se llevó a cabo mediante la observación minuciosa de cada pedazo de tallo de aproximadamente 15 a 20 cm de longitud y con un diámetro de 0,9 a 1,2 cm.

Las observaciones se realizaron de brotes de plantas de campo, así como en las brotaciones de los bloques de plantas yemeras en el predio del campo experimental de la FCA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Detección del CTV en clones seleccionados

Los resultados obtenidos de las pruebas biológicas (indexing) de los 5 clones de San Pedro y de Concepción mostraron la aparición de síntomas de la clorosis nervial en todas las plantas analizadas, lo que demuestra, que el virus de la tristeza de los cítricos está ampliamente diseminado en las regiones estudiadas.

Estos resultados coinciden con los trabajos de González et al, (1997), donde se encontró un 100% de infección en la distribución del virus en la región Oriental del Paraguay Esta situación se debería a la eficiencia del pulgón negro de los cítricos (*Toxoptera citricida* K), en diseminar el virus (Timmer et al, 2000).

Los resultados obtenidos están listados en la Tabla 3 y 4, donde se observa que en todos los clones estudiados, los síntomas resultaron ser suaves.

**TABLA 3. Resultados obtenidos del diagnóstico de la presencia del CTV en clones seleccionados de pomelo (*Citrus paradisi Macf*) del Departamento de San Pedro – Paraguay. San Lorenzo, 2007.**

CLONES SELECCIONES	DEPARTAMENTO	DIAGNOSTICO	
		CTV SEVERIDAD	PRUEBAS BIOLÓGICAS
SP-1	San Pedro	0	+
SP-2	San Pedro	0	+
SP-4	San Pedro	0	+
SP-5.1	San Pedro	0	+
SP-6.3	San Pedro	0	+

**TABLA 4. Resultados obtenidos del diagnóstico de la presencia del CTV en clones seleccionados de pomelo (*Citrus paradisi Macf*) del Departamento de Concepción – Paraguay. San Lorenzo, 2007.**

CLONES SELECCIONES	DEPARTAMENTO	DIAGNOSTICO	
		CTV SEVERIDAD	PRUEBAS BIOLÓGICAS
CN-1	Concepción	0	+
CN-2	Concepción	0	+
CN-3	Concepción	0	+
CN-5	Concepción	0	+
CN-6	Concepción	0	+

Los clones CN-2 y CN-3, registraron una peculiaridad, a diferencia del resto donde los síntomas observados fueron mas claros y fáciles de distinguir, pero quedando aún en el rango de suaves.

De igual manera, en experimentos anteriores hechos sobre la severidad de aislados de CTV preseleccionados, donde había aislados de pomelo de San Pedro, también se demostró que esos eran menos agresivos, más suaves, debido a que permitían el desarrollo normal de las brotaciones. En el mismo experimento pero con aislados del departamento Central y Caazapá, demostraron ser fuertes porque producían desarrollo reducido en longitud y área foliar en las plantas de limón sutil (Armoa, 2003).

Este experimento concuerda con los realizados en Brasil (SP), Corazza-Nunes et al, (2006), donde demostraron que los aislados de la mayoría de las 35 plantas de pomelos analizadas, un 77% inducían reacciones suaves en la planta indicadora limón sutil (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing), y el 23% mosto síntomas moderados de clorosis nervial. Los autores mencionan que el (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing), es sensible para expresar síntomas de clorosis nervial, pero estos síntomas no necesariamente reflejan la severidad de los aislados en otras especies o variedades de cítricos.

#### Evaluación de la severidad «stem pitting»

En los resultados de la severidad del CTV, no fueron observados síntomas de acanaladuras o stem pitting, en las selecciones o clones de Concepción y San Pe-

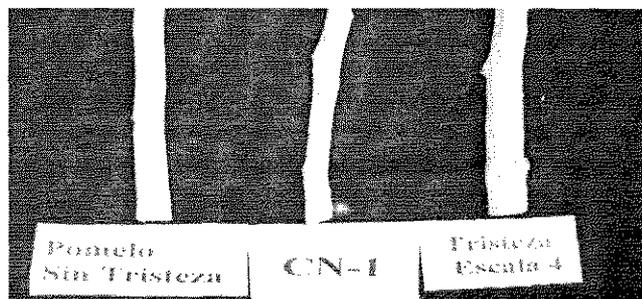
dro. (Tabla 3 y 4).

En investigaciones hechas sobre el tema en Venezuela, se pudo distinguir tres grupos de razas, un grupo severo, capaz de inducir inclusiones abundantes e hipertrofia (acanaladuras) en todas las plantas inoculadas, otro grupo de razas moderadas o intermedias, que indujo inclusiones pero sin acanaladuras y el tercer grupo de razas débiles que no mostraron síntomas de acanaladuras ni inclusiones, las razas débiles pueden pasar desapercibidas durante diagnósticos masivos de campo o de rutina en el laboratorio (Ochoa et al, 1994).

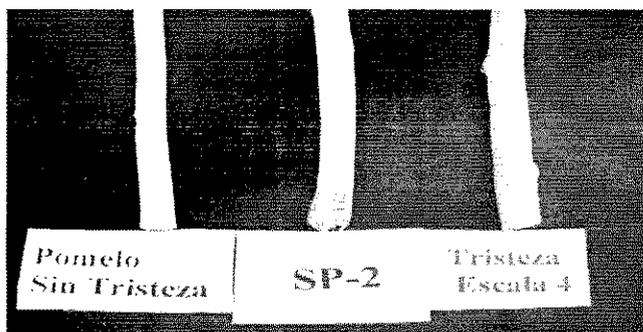
Los resultados no concuerdan con los estudios similares hechos en San Pablo, Brasil, donde los resultados fueron diferentes, los síntomas de acanaladura fueron de moderadas a muy severas en un 62% de los gajos o ramas medidas de 35 plantas de pomelo, los restantes se mostraron suaves, en una escala que va de 0 a 5, considerado 3 moderada y 5 muy severa. También encontraron que algunos de los aislados que demostraron un indexing suave, mostraban síntomas moderados a severos en cuanto a acanaladuras (Corazza-Nunes et al, 2006).

Con estos resultados obtenidos esta claro que las razas del virus de la tristeza de los cítricos presentes en las selecciones tomadas de los dos departamentos son débiles y serían ideales para programas de control con preinmunización o protección cruzada.

Cuando en una región o país se hace endémico el CTV, la detección de razas débiles constituye una necesidad, con la finalidad de utilizarlas en trabajos de protección cruzada, por lo cual es de interés el comportamiento diferencial que diversas razas de este virus puedan presentar a nivel histológico, ya que esto permite, con la ayuda de otros parámetros, definir a priori el daño que se podría esperar de una raza en particular, así como también caracterizar más acertadamente estas variantes virales en severas, moderadas o débiles para un hospedero en particular (Ochoa et al, 1994). En la figura 1 y 2 se observan los resultados obtenidos en comparación con pomelos libres de CTV y con CTV severo.



**FIGURA 1. Tallo de la planta del clon seleccionado de Concepción (CN-1) sin acanaladuras, comparadas con tallos de pomelos libres de CTV (izquierda) y tallos de pomelos con acanaladuras severas (derecha).**



**FIGURA 2.** Tallo de la planta del clon seleccionado de San Pedro (SP-2) sin acanaladuras, comparadas con tallos de pomelos libres de CTV (izquierda) y tallos de pomelos con acanaladuras severas (derecha)

## CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia del virus de la tristeza de los cítricos en todos los clones de pomelos seleccionados de los departamentos de Concepción y San Pedro, presentando clorosis nervial en las hojas.
- En todos los clones de pomelo tanto de Concepción como de San Pedro, todos los síntomas de clorosis nervial de las hojas, demostraron ser suaves, debido a aparecer sólo en trazos en las hojas.
- En cuanto a la severidad de los clones (CN-1, CN2, CN-3, CN-5, CN-6; SP-1, SP-2, SP-4, SP-5.1, SP-6.3) estudiados no presentaron síntomas de acanaladuras o stem pitting en las ramas de campo ni de las plantas yemas estudiadas.

## LITERATURA CITADA

- ARMOA, F. 2003. Severidad de aislados preseleccionados del virus de la tristeza de los cítricos. Tesis (Ing. Agr.). San Lorenzo, PY: Carrera de Ingeniería Agronómica. FCA. UNA. 27 p.
- CAMBRA, M. 2000. Liberación del virus de la tristeza. (en línea), ES. Consultado el 28 de marzo de 2005. Disponible en <http://www.ivia.es/publicaciones/encuentros41/meristemas.html>
- CAMBRA, M.; GORRIS, M.; SERRA, J.; CAMARAS, E.; PINA, J.; SANZ, A.; VELA, C.; LLATSER, F. 1991. Diagnostico y estudio del virus de la tristeza de los cítricos utilizando técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos monoclonales específicos. *Levante Agrícola*. (ES). 4 (1): 176 – 177.
- CARVALHO, S.; MACHADO, M.; BAPTISTA, C.; MULLER, G.; SILVERIO, J. 1997. Caracterização biológica de isolados faz citros do dos tristeza do da do virus. *Fitopatología Brasileira*(BR). 22: 79 – 84
- CORAZZA-NUNES, M.; MACHADO, M.; STACH-MACHADO, D.; CARVALHO, W.; CARVALHO, S.; MÜLLER, G. 2006. Carecterização de isolates do virus do tristeza do citrino das ascensões do pomelos (*citrino Macf paradisi.*) do banco ativo de Germoplasma do citrino. *Summa Phytopathologica*(BR). 32(4): 28 – 39.
- DURAN-VILA, N. & MORENO, P. 2000. Enfermedades de los Cítricos. Sociedad Española de Fitopatología. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 165 p.
- GONZALEZ, L.; VILLALBA, N.; ARMADANS, A.; SHOHARA, W.; TIMMER, L. 1997. Incidence of tristeza and other Citrus diseases in Paraguay. *Flo. State Hort. Soc. Proc.* 110: 43.46.
- MILNE, R.; GARCIA, M.; MORENO, P. 2003. Descriptions of plant viruses: virus de la psorosis de la fruta citrica. G.; (en línea). AAB. US. Consultado el 28 de marzo de 2005. Disponible en <http://www.dpvweb.net>
- MULLER, G. 1976. A Tristeza dos Citros. *Summa Phytopathologica* 2(1): 245-263.
- NAVARRO, L. 1979. Microinjerto de apices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agrios libres de virus. *Boletín del servicio de plagas*(ES). 5: 127-148.
- OCHOA, F.; MÉRIDA, T.; TRUJILLO, G. 1994. Alteraciones histológicas en peciolo de limonero criollo (*Citrus aurantifolia*) inducidas por razas del virus de la tristeza de los cítricos. *Fitopatología Venezolana* (Vz). 7 (1): 22 – 26.
- TIMMER, L.; GARNSEY, S.; GRAHAM, J. 2000. Compendium of citrus diseases. The American Phytopathological Society. 2ed. Florida, United States. 92 p.