INCIDENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CITRICOS EN VENEZUELA[1]

*G. PLAZA**
*R. LASTRA***
*J. E. MARTINEZ****

Summary

Citrus tristeza virus was detected by ELISA in 53% of the citrus trees tested in Aragua, Carabobo and Yaracuy states. Virus-like particles with the shape and size of CTV were visualized by electron microscopy. The severe symptoms resulted in the decline and collapse of the affected trees. High infestation with the aphid Toxoptera citricida *K. was found in all surveyed areas.*

Introducción

En Venezuela se plantan comercialmente cerca de 40 000 ha de cítricos, ubicados principalmente en los Estados Aragua, Carabobo y Yaracuy. La mayoría de las variedades sembradas están injertadas sobre naranja agria (*Citrus aurantium* L.) patrón que es preferido por los cultivadores debido a los altos rendimientos, calidad de los frutos y su resistencia a la pudrición de la raíz, causada por *Phytophthora* spp. En los últimos dos años la producción ha descendido debido a la presencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).

En 1950 se reportó en Venezuela una marchitez en los árboles de cítricos, no obstante, la etiología de la enfermedad no estaba clara, debido a que el diagnóstico se basó solamente en la sintomatología (3). La tristeza de los cítricos (CTV) se menciona por primera vez en Venezuela en 1960, sin embargo la enfermedad estaba restringida sólo a unos pocos árboles en un área pequeña (6). La razón principal para la localización de la enfermedad se debió a que el vector *Toxoptera citricida* K. no estaba presente en el país.

Durante 1975 y 1976, *T. citricida* se identificó en las fronteras con Brasil y Colombia (7), el áfido se expandió rápidamente en Venezuela y hoy en día se encuentran altas poblaciones en casi todas las plantaciones de cítricos. La primera epidemia de la enfermedad comenzó en 1980, en el Estado Yaracuy y el virus fue identificado mediante el injerto a plantas indicadoras, serología y microscopía electrónica (2, 7).

En este estudio se han muestreado las áreas más importantes de producción de cítricos, para determinar la presencia de CTV y su distribución en Venezuela.

Materiales y métodos

Las plantaciones de cítricos fueron muestreadas en las principales áreas cultivadas del país. Se colectaron muestras compuestas de árboles que presentaban síntomas de la enfermedad y de árboles sanos en áreas

1 Recibido para publicación el 18 de mayo de 1983. Agradecemos al Ing. Agr. Nelson Morgado, Director de Sanidad Vegetal, Ministerio de Agricultura y Cría, por el financiamiento de este proyecto y también a las siguientes personas por su ayuda en la colección de muestras: Roland Mendt, Germán Pérez y Ricardo Castillo, FUSAGRI; Francisco Garrido, Alí Carrillo, Norma de Quintero y Carlos Omaña, Sanidad Vegetal, M.A.C., Edo. Carabobo; Juan Antolini, Sanidad Vegetal, M.A.C., Edo. Aragua; María L. Sosa, Sanidad Vegetal, M.A.C., Edo. Yaracuy

* División de Sanidad Vegetal, Ministerio de Agricultura y Cría.

** Laboratorio de Virus de Plantas, I.V.I.C., Apartado 1827, Caracas 1010A Venezuela

*** FUSAGRI, Cagua, Edo. Aragua, Venezuela.

cercanas a éstos. Los brotes jóvenes de 10 cm de largo, se guardaron en bolsas plásticas en hielo hasta llegar al laboratorio para los análisis. Las muestras se guardaron a 4°C y se procesaron a los pocos días de haber sido recibidas.

El tejido de la corteza fue macerado en un mortero o usando un homogeneizador de tejidos (Tissumizer, Tekmar Co., Ohio, USA) a una dilución 1/20 (p/v) en PBS-tween, pH 7.4, conteniendo 2% polyvinylpyrrolidone (PVP-40) para ensayos de inmunoabsorción con una enzima conjugada (ELISA). Para pruebas de inmunodifusión con SDS, el tejido de la corteza fue macerado y diluído 1/20 (p/v) con 0.5% sodio dodecil sulfato (SDS) (5). El antisuero usado en todas las pruebas fue preparado en contra del aislamiento T4 de Florida (enviado gentilmente por el Dr. S. M. Garnsey). La técnica usada para ELISA fue una modificación del procedimiento de Clark y Adams, específicamente para CTV (1). Cada muestra fue analizada por duplicado, utilizándose extracto de corteza de plantas sanas de *Citrus aurantifolia* (CHR) Swingle, provenientes de los invernaderos y bufer PBS-tween pH 7.4, como controles. Los platos de ELISA fueron leídos visualmente y medidos en espectrofotómetro a 405 nm. Lecturas mayores de 0.4 fueron consideradas positivas ya que los controles nunca fueron mayores de 0.2.

En los estudios de microscopía electrónica se utilizó tejido de nervadura central macerado en agua. Rejillas de 400 mesh, cubiertas de una película de colodión y carbón, se flotaron sobre el extracto de tejido, enjuadas y coloreadas negativamente, usando 2% ácido fosfotúngstico (PTA). Las rejillas fueron examinadas en un microscopio electrónico JEOL 100 B.

El virus de la tristeza de los cítricos fue transmitido de plantas sospechosas a plántulas de *Citrus limon* injertando tejido foliar (4); las plantas injertadas fueron colocadas en un invernadero libre de insectos hasta el desarrollo de los síntomas.

Resultados

En los tres estados muestreados se encontraron árboles con amarillamiento general del follaje y anormalidades a nivel de la unión patrón-injerto, tales como "panal de abeja" (honey combing), lo que sugirió la presencia de CTV. Algunos de estos síntomas fueron observados en las siguientes combinaciones patrón-injerto: Valencia/naranja agria; Pineapple/naranja agria; California/naranja agria; Valencia/mandarina cleopatra. Algunas de las plantas que mostraban síntomas severos dieron resultados negativos cuando se realizó la prueba ELISA. También algunas plantas aparentemente sin síntomas dieron resultados positivos con la misma prueba, estas plantas mostraron síntomas de la enfermedad en observaciones subsiguientes y algunas veces colapso de las mismas en pocas semanas.

Las plántulas de *Citrus limon*, inoculadas con tejido foliar de algunas de las plantas que mostraban síntomas severos, desarrollaron un aclaramiento de las nervaduras, aproximadamente 5 meses después de injertadas. Las plantas probadas resultaron positivas, cuando se les realizó la prueba ELISA y también se vieron fácilmente las partículas del virus al microscopio electrónico. Los valores de absorbancia considerados positivos para ELISA, fueron entre 0.4-2.3, en todas las pruebas, ya que los valores de los testigos negativos nunca fueron más altos que 0.2. Todas las plantas fueron probadas por el método ELISA, y las que resultaron fuertemente positivas con esta prueba, también reaccionaron con una clara línea de precipitación en las pruebas de inmunodifusión con SDS. Partículas filamentosas características de CTV fueron observadas al microscopio electrónico en preparaciones de extractos provenientes de muestras positivas.

Las edades de los árboles en las plantaciones muestreadas estaban comprendidas entre 5 a 15 años. Todas las infecciones fueron comprobadas durante los últimos dos años. De los tres estados muestreados el más alto porcentaje de árboles infectados fue encontrado en Yaracuy (68.6%), seguido por Aragua (54.3%) y Carabobo (43.8%). No obstante, hay indicaciones de que la enfermedad está también presente en el estado Monagas, al este del país, ya que se ha encontrado el *T. citricida* K. y una sintomatología similar a la de CTV en esa área.

Todas las combinaciones patrón-injerto más comúnmente usadas en Venezuela fueron encontradas infectadas por la enfermedad (Cuadro 1).

Discusión

El virus de la tristeza de los cítricos fue identificado en Venezuela en 1960, la enfermedad estuvo localizada en un área muy pequeña, con muy pocos árboles afectados (6). Una posible explicación para esta localización fue la ausencia en Venezuela de un vector eficiente del virus de la tristeza. Desde 1975 a 1976, cuando al áfido *Toxoptera citricida* K. fue reportado por primera vez en Venezuela, se esperaba un fuerte brote de la enfermedad. En 1980, el mal se encontró por primera vez en plantaciones comerciales (2, 7) y a pesar de las medidas cuarentenarias tomadas para erradicar este brote, la enfermedad se expandió rápidamente. Durante los últimos dos años se ha incrementado la cantidad de árboles afectados en las principales plantaciones de los estados costeros.

Cuadro 1. Especies y número de árboles de cítricos infectados con CTV.

Especie o híbrido/patrón	Número de árboles (positivos/N° de muestras)			
	Aragua[1]	Carabobo[1]	Yaracuy[1]	Total
Valencia/naranja agria (*C. sinensis* L./*C. aurantium* L.)	95/170	143/296	174/252	412/718
Washington nivel/naranja agria (*C. sinensis* L./*C. aurantium* L.)	13/39	16/87	6/12	35/138
Pineapple/naranja agria (*C. sinensis* L./*C. aurantium* L.)	36/55	55/97	6/6	97/158
Tangor/naranja agria (*C. sinensis* L. x *C. reticulata* blanco/*C. aurantium* L.)	0/1	0/4	0/1	0/6
Tangor/limón rugoso (*C. sinensis* L. x *C. reticulata* blanco/*C. jambhiri* Lush)	1/2	–/–[2]	–/–	1/2
Valencia/mandarina cleopatra (*C. sinensis* L./*C. reticulata* blanco)	–/–	0/4	–/–	0/4
Total	145/267	214/488	186/271	545/1026

1 Localidades muestreadas: Aragua 57, Carabobo 76, Yaracuy 53.

2 –: no probadas.

La rápida diseminación de la enfermedad, posiblemente se debió a las altas poblaciones de *T. citricida* K. encontradas en todas las áreas muestreadas. Otro factor importante es que la mayoría de los árboles están injertados sobre naranja agria, la cual es muy susceptible a la enfermedad.

Algunas plantas murieron a las pocas semanas después del inicio de los síntomas, sin embargo otras mostraron síntomas suaves y continuaron fructificando. Por lo tanto, existe la posibilidad de que en Venezuela estén presentes diferentes cepas de este virus.

No se estudiaron asociaciones de CTV con otras enfermedades de cítricos, no obstante, la pudrición de las raíces producida por *Phytophthora* spp. y síntomas parecidos a los de *Psorosis*, fueron observados en algunas fincas. Estamos conscientes que otras virosis deben estar afectando este cultivo en Venezuela, como es el caso particular de plantas injertadas sobre mandarina cleopatra, que presentan síntomas de virosis, resultando todas las pruebas negativas para CTV. Como este patrón es tolerante a CTV, posiblemente estas plantas deben estar infectadas con otros virus.

En vista de la severidad de la enfermedad y la rápida expansión de la misma, debería desarrollarse un programa de certificación de yemas y selección de patrones tolerantes a tristeza para Venezuela.

Resumen

El virus de la tristeza de los cítricos fue identificado serológicamente mediante la técnica ELISA, en 53% de los árboles de cítricos examinados en los estados Aragua, Carabobo y Yaracuy. Partículas virales con la forma y tamaño correspondientes al virus de la tristeza fueron observadas al microscopio electrónico, en preparaciones provenientes de plantas que mostraban síntomas de la enfermedad. Los síntomas más severos causaron marchitamiento y colapso de los árboles afectados. Una alta infestación con el áfido *Toxoptera citricida* K. se encontró en todas las áreas examinadas.

Literatura citada

1. BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, S. M., GONÇALVES, D., MOSCOVITZ, M., PURCIFUL, D. E., CLARK, M. F. and LOEBENSTEIN, G. The use of enzyme linked immunosorbent assay for

detection of Citrus Tristeza Virus. Phytopathology 69:190-194. 1979.

2. CERMELI, M., MARTINEZ, J. E., LASTRA, R., REYES, F., GERAUD, F. y PLAZA, G. Evolución de la enfermedad conocida como tristeza de los cítricos en plantaciones comerciales de Venezuela. III Seminario Nacional de Fruticultura, Valencia, Venezuela. 1981.

3. CIFERRI, R. A decline of citrus plants in Venezuela. Nature 165:32. 1950.

4. GARNSEY, S. M and WHIDDEN, R. A rapid technique for making leaf-tissue grafts to transmit citrus viruses. Plant Disease Report 54(10): 907-908. 1970.

5. GARNSEY, S. M., GONÇALVES, D. and PURCIFUL, D. E. Rapid diagnosis of citrus tristeza virus infections by sodium dodecyl sulfate immunodiffusion procedures. Phytopathology 69:88-95. 1979.

6. KNORR, L. C., MALAGUTTI, G. y SERPA, D. Descubrimiento de la tristeza de los citricos en Venezuela. Agronomia Tropical X(1):3-12. 1960.

7. MARTINEZ, J. E., LASTRA, R., REYES, F., GERAUD, F., DIAZ, R y RAMOS, M. La tristeza de los citricos en plantaciones comerciales de naranja dulce en Venezuela. Prejornadas Agronómicas, Maracay, Venezuela, 1980