

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE FITOMEJORAMIENTO



**Análisis inmuno – enzimático del virus tristeza de los cítricos (VTC)
en dos bancos de germoplasma del Estado de Sinaloa, México.**

Por:

Julieta Alicia Ceballos Ruíz

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Noviembre de 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

**Análisis inmuno – enzimático del virus tristeza de los cítricos
(VTC) en dos bancos de germoplasma del Estado de Sinaloa,
México.**

TESIS

Presentada por:

Julieta Alicia Ceballos Ruíz

Que somete a consideración del H. Jurado Examinador
como requisito para obtener el título de :

Ingeniero Agrónomo

Dra. Diana Jasso Cantú

Presidente del Jurado Examinador

M.C. Sixto Velarde Félix

Asesor

Dr. Raúl Rodríguez García

Asesor

M.C. Arnoldo Oyervides García

Coordinador de la División de Agronomía

Buenavista, Saltillo Coahuila, México

Noviembre de 2005

AGRADECIMIENTOS

AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES, FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS (INIFAP), POR HABER FACILITADO LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA PARA REALIZAR LA PRESENTE INVESTIGACIÓN Y MUY ESPECIALMENTE AL DR. JORGE LUIS ARMENTA SOTO, DIRECTOR DE COORD. Y VINC. ESTATAL DEL CAMPO EXP. VALLE DE CULIACAN.

CON TODO MI CARIÑO AL M.C. SIXTO VELARDE FELIX, POR TODO SU APOYO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

PARA LA DRA. DIANA JASSO CANTU, YA QUE SU AYUDA DESINTERESADA FUE ESCENCIAL PARA MI PRESENTACIÓN.

A LA FUNDACION PRODUCE SINALOA, A.C., POR EL APOYO ECONÓMICO PARA EL PROYECTO TITULADO: “ANALISIS DE LA PRESENCIA Ó AUSENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CITRICOS (VTC), EN DOS BANCOS DE GERMOPLASMA MEDIANTE ELISA, PARA SU CERTIFICACIÓN”.

AL ING. CESAR GOMEZ LLANOS, TÉCNICO DEL CESAVESIN, POR TODAS LAS FACILIDADES BRINDADAS PARA REALIZAR ESTE TRABAJO.

A LILI, EVA LILIA, MARY, MALENA, TRANKY, CONRADO, OLI, CLAUDIA Y CRISTIAN, POR BRINDARME SU AMISTAD.

AGRADEZCO ESPECIALMENTE AL SR. ERNESTO MELGAR LAZARO POR SU AMISTAD Y AYUDA PARA LLEVAR A CABO LOS ANALISIS PARA ESTA TESIS.

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE OMITÍ INVOLUNTARIAMENTE. GRACIAS.

DEDICATORIA

A MIS PADRES, CON CARIÑO.

CON TODO MI AMOR PARA MI ESPOSO, MIS HIJOS Y MI NIETA.

CON CARIÑO PARA JUAN LUIS, ROCIO Y PARA EL BEBÉ.

PARA LA FAMILIA VUELVAS SOLORZANO POR SU AMISTAD, CARIÑO Y MOTIVACIÓN PARA REALIZAR ESTE TRABAJO.

PARA LA FAMILIA DÍAZ DE LEÓN GOMEZ, POR SU AMISTAD Y CARIÑO.

¡A LA QUEENY, QUE LA EXTRAÑO MUCHO!

INDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. OBJETIVOS	3
1.2. HIPÓTESIS	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. MOVIMIENTO DEL PULGON CAFÉ.....	7
2.2. SINTOMATOLOGIA.....	8
2.3. CARACTERISTICAS DEL VIRUS	10
2.4. TRANSMISIÓN DEL VIRUS	11
2.5. CONTROL	13
2.6. CARACTERISTICAS DEL VECTOR <i>T. citricidus</i>	13
2.7. METODOS DE DIAGNOSTICO	16
3. MATERIALES Y METODOS	19
3.1. SITIOS DE MUESTREO	19
3.2. TOMA DE MUESTRAS	24
3.3. ANALISIS DE MUESTRAS	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5. CONCLUSIONES	58
6. RESUMEN	59
7. BIBLIOGRAFIA	60
7. APÉNDICE	65

INDICE DE CUADROS

CUADRO	DESCRIPCION	PÁGINA
3.1	DISTRIBUCIÓN ÁRBOLES DE LIMON EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE CHAMETLA, SIN.	20
3.2	DISTRIBUCIÓN ÁRBOLES DE MANDARINA Y LIMA EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE CHAMETLA, SIN.	21
3.3	DISTRIBUCIÓN ÁRBOLES DE MANDARINA Y LIMA EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE CHAMETLA. CONTINUACIÓN.	22
3.4	DISTRIBUCIÓN DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE CITRICOS Y ESPECIES AFINES DE LA SUB-ESTACIÓN AGUARUTO DEL CEVACU-CIRNO-INIFAP.	23
3.5	TEMPERATURAS MÁXIMAS, MINIMAS Y MEDIAS TOMADAS DE LA ESTACIÓN METEOROLÓGICA EN LAS FECHAS DE LOS MUESTREOS DE LOS BANCOS DE GERMOPLASMA.	24
4.1	RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE ELISA EFECTUADOS EN LOS MUESTREOS DE LOS ÁRBOLES DE LIMÓN COLECTADOS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE CHAMETLA, SIN.	29
4.2	RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE ELISA EFECTUADOS EN LOS MUESTREOS DE LOS ÁRBOLES DE MANDARINA COLECTADOS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE CHAMETLA, SIN.	32
4.3	RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE ELISA EFECTUADOS EN LOS MUESTREOS DE LOS ÁRBOLES DE LIMA COLECTADOS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE CHAMETLA, SIN.	35

4.4	RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE ELISA EFECTUADOS EN LOS MUESTREOS DE LOS ÁRBOLES DE CITRICOS COLECTADOS EN EL BANCO DE GERMOPLASMA DE AGUARUTO, SIN	45
------------	--	-----------

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCION	PÁGINA
1	Producción mundial de cítricos	4
2	Sintomatología causada por el VTC	8
3	Micrografía electrónica del VTC	10

I INTRODUCCIÓN

El Virus de la tristeza de los cítricos (VTC) es un patógeno de distribución mundial, considerándosele uno de los principales problemas sanitarios de los cítricos en el mundo, debido a que en los últimos 20 años ha causado la muerte a más de 100 millones de árboles en países como Argentina, Brasil, Venezuela, E.U., Israel y España (Iracheta, *et al.*, 2001).

El VTC presenta un virión filamentososo, cuya cápside está constituida por dos moléculas proteínicas de 25 y 27 kDa (Febres *et al.*, 1996), pertenece al grupo de los closterovirus y está compuesto por una partícula larga y flexible de ARN de cadena sencilla de $5.4 - 6.5 \times 10^6$ daltons y de aproximadamente 2000 b. La partícula observada al microscopio electrónico tiene un tamaño de 2000 x 12 nm. (Iracheta, *et al.*, 2001).

El virus es diseminado en la naturaleza de manera semi-persistente por varias especies de áfidos, siendo el vector más eficiente el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricidus* Kirkaldy) (PCC) y, por material vegetativo infectado (injertos). El virus se trasmite por los vectores sin un período de latencia y tiene una pérdida de efectividad después de 48 horas de haberlo adquirido el insecto (Rocha-Peña *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996).

Este virus se ha reportado en 12 entidades citrícolas del país (Villarreal, *et al.*, 1996), sin embargo, todavía no se han presentado daños a la citricultura nacional por ocurrir en forma de infecciones asintomáticas.

Los síntomas externos de la enfermedad no son específicos y se traducen por un marchitamiento seguido de un resecamiento más o menos rápido que ocasiona la muerte del árbol; internamente, ocurre una necrosis del floema en el sitio del injerto y como consecuencia puede aparecer una coloración café claro

en la unión del injerto de algunos árboles afectados (Argumedo y Rocha-Peña, 1993).

Existen una serie de variantes o aislamientos del VTC extremadamente severos y destructivos del tipo que causa un picado o acanalado severo de ramas o tronco independientemente del portainjerto utilizado, las cuales son eficientemente transmitidos ya sea por *T. citricidus* y/o *Aphis gossypii*. Muchos de estos aislamientos severos ocurren en forma natural en países como Japón, China y otros países asiáticos y el hombre mismo los ha distribuido al resto del mundo mediante el movimiento inadvertido de material de propagación infectado (Rocha-Peña, *et al.*, 1992).

El áfido *T. citricidus* ha sido recientemente detectado en el sureste de nuestro país, esto es relevante, ya que la mayoría de las plantas comerciales (más del 90%) están injertadas sobre naranjo agrio que es susceptible al VTC, por lo que se podría ocasionar una epidemia si el vector logra invadir las principales regiones cítricas del país (Mendoza, *et al.*, 2003).

La presencia del VTC tanto en Estados Unidos como en Centro América y el avance gradual del vector *T. citricidus* hacia México a través de Centro América y las Islas del Caribe, indica que el virus de la tristeza inevitablemente llegará a ser un problema para la citricultura local si permanecemos bajo las condiciones actuales en cuanto a los patrones susceptibles.

Aunque el estado de Sinaloa no figura como un centro de producción cítrica de gran importancia nacional, actualmente cuenta con sólo 1,700 ha sembradas, que representan el 5.7% de la superficie nacional; sin embargo, el cultivo de cítricos está considerado dentro de los prioritarios en el programa de reconversión productiva en el estado, de ahí la importancia de analizar la presencia del VTC en dos bancos de germoplasma de cítricos con que se cuenta en el estado, en los cuales existen materiales resistentes al VTC, que pueden ser utilizados como tutores o portainjertos (comunicación personal Ing.

Cesar Gómez Llanos, CESAVESIN). Así como ratificar o rectificar la presencia del mencionado virus en el estado, ya que durante 1982 a 1991 se hicieron muestreos en diferentes áreas citrícolas de Sinaloa; de las 182 muestras analizadas por ELISA todas dieron reacción negativa al VTC (Rocha-Peña, *et al.*, 1992).

1.1. OBJETIVOS

Analizar la sanidad en dos bancos de germoplasma de cítricos de Aguaruto en Culiacán y Chametla en Rosario del estado de Sinaloa, en cuanto a la presencia del virus tristeza de los cítricos.

1.2. HIPÓTESIS

Las diferentes especies de cítricos que conforman los Bancos de Germoplasma de Aguaruto y Chametla, en Sinaloa se encuentran libres del Virus Tristeza de los cítricos.

II REVISIÓN DE LITERATURA

A nivel mundial los principales países productores de cítricos son: China (11,098 ton), Brasil (24,253), Estados Unidos (16,335), México (5,477), España (4,861) e Italia (3,053) (Fig. 1), por lo que México se ubica en el cuarto lugar de producción de cítricos (FAO, 1999); destacando por su importancia cítrica varios estados, entre los cuales están, por el monto de producción: Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Michoacán, Colima, Nuevo León, Yucatán y Sonora, con un área de cultivo de 402, 527 ha y otro grupo de pequeños productores con 100,077 ha, lo que arroja un total nacional de 502,554 ha, con un promedio anual de producción de 6'504,258 toneladas de fruta, lo que representa un valor estimado de 7,100 millones de pesos (FAO, 1999), (Rocha-Peña, M.A., 2004).

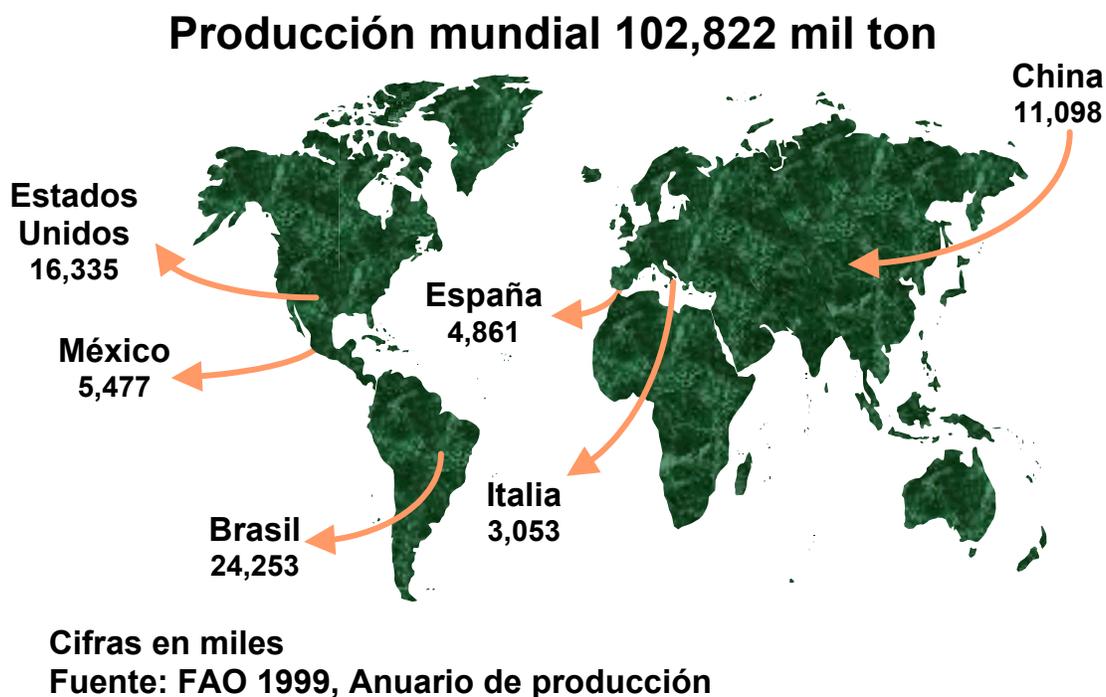


Fig. 1. Principales países productores de cítricos

De la superficie total cultivada, la naranja (*Citrus sinensis* Osbeck) ocupa 67%, el limón mexicano [*C. aurantifolia* (Christm) Swingle] el 19%, el limón persa (*C. latifolia* Tanaka) el 5%, la mandarina (*C. reticulata* Blanco) y sus híbridos con alrededor del 6% y toronja (*C. paradisi* Macf.) 3%. En el caso de la naranja dulce, la variedad Valencia cubre aproximadamente el 70% de la superficie plantada. Asimismo, Veracruz con 176,000 ha ocupa el primer lugar en la producción de cítricos, le sigue San Luis Potosí con 44,000 ha, Tamaulipas con 38,000 ha, Michoacán con 35,000 ha, Nuevo León y Colima con 32,000 ha cada uno; en conjunto, estas entidades concentran el 83% de la superficie cultivada en el país (Rocha-Peña, M.A., 2004).

El primer reporte de la presencia de esta enfermedad se tiene en Brasil y Argentina (1930 y 1933) en donde cerca de 30 millones de plantas de cítricos murieron, posteriormente en España en los años 60's, este virus causó la muerte de 10 millones de árboles y en Venezuela durante 1976 la industria cítrica perdió alrededor de 6.5 millones de árboles, todo ello debido a que la mayoría de los árboles tenían porta-injertos de naranja agria, los cuales son susceptibles a este patógeno. Epidemias menos severas ocurrieron en California e Israel y continuaron en Florida (Rocha-Peña, *et al.*, 1995).

En Chile, aparentemente, la enfermedad estuvo restringida debido a la prohibición de injertar naranjos dulces sobre agrios. No obstante en 1968, Weathers y otros, indicaron que el VTC estaba ampliamente distribuido en Chile pero no en cultivos comerciales de cítricos. En 1996 Herrera y otros, estudiando la causa de la muerte de plantas de limonero injertadas sobre el portainjerto *Citrus macrophylla*, identificaron mediante ELISA y PCR al VTC asociado a dichas muertes. Posteriormente, Besoain y otros (2000), en prospecciones mediante pruebas biológicas de virus y viroides afectando a cítricos en las regiones I, IV, V, y VI reportan la presencia del VTC en todas las regiones estudiadas de ese país. Actualmente, el VTC está ampliamente diseminado en

cultivos de limoneros en Chile, expresándose con mucha severidad en limoneros injertados sobre *C. macrophylla* y no así sobre otros portainjertos mas resistentes (INIA, 2000).

En 1997, es reportado por primera vez el VTC en Albania, en una colección de variedades del Instituto de Pomología, Vlora. Siete de 62 muestras resultaron infectadas del VTC. (Stamo, A.M. D'Onghia. 1997.)

En México, las primeras manifestaciones del VTC, fueron registradas en Yucatán, uno de los 23 estados productores de cítricos del país, que posee cerca de 520 mil hectáreas plantados con la especie. ([www. Agroandino. Com/info@agroandino.com](http://www.Agroandino.Com/info@agroandino.com)).

En 1983 se detectó en plantaciones comerciales del estado de Tamaulipas, posteriormente en viveros de Veracruz (1986-87); en ambos casos los árboles infectados fueron erradicados mediante incineración. Durante 1993 y 1995, el Centro Nacional de Referencia en Diagnóstico Fitosanitario de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), realizó un monitoreo nacional en 21 estados de la República Mexicana y encontró plantas infectadas con el VTC en Veracruz, Nuevo León y Quintana Roo. Posteriormente a través del Programa de Alianza para el Campo y como apoyo a las Campañas Fitosanitarias de DGSV, se intensificaron los muestreos, determinando la presencia del VTC en Colima y Michoacán (1998), Nuevo León (1996), Baja California (1997), Quintana Roo y Yucatán (1999-2000) y Campeche (2000). Cabe señalar que, aunque se han muestreado intensamente las principales entidades citrícolas del país, las detecciones positivas del VTC han sido mínimas; por ejemplo, de 78,500 muestras analizadas en Veracruz, sólo 53 resultaron positivas; en Colima una de 5,725; y en Nuevo León 48 de 27,000. Un aspecto importante es que las plantas con VTC se encontraron ubicadas aleatoriamente, lo que significa que la enfermedad fue introducida con material vegetativo infectado y no por diseminación natural. No obstante que las plantas no presentaron

síntomas de la enfermedad, la disposición establecida por la DGSV ha sido la erradicación (Comunicación personal, Ing. Cesar Gomez Llanos, Técnico del CESAVESIN).

Aunado a la enfermedad, en febrero de 2000 se detectó el áfido *T. citricidus*, catalogado como el vector más eficiente del VTC, en huertos de traspatio localizados en Kantunilkin y Chiquilá, municipio de Lázaro Cárdenas, Quintana Roo; posteriormente se detectó en el Cuyo, Tizimín y Valladolid en el estado de Yucatán (Villarreal, *et al.*, 2000).

2.1. MOVIMIENTO DEL PULGÓN CAFÉ DE LOS CITRICOS (PCC) *T. citricidus*.

En los pasados 20 años se observó un movimiento natural del PCC a través del Caribe. En 1976 el PCC fue identificado por primera vez en múltiples locaciones cerca del sureste de la región del Lago Maracaibo y en el suroeste de Venezuela cerca de la frontera con Brasil. En 1979 el PCC estaba ampliamente diseminado en Venezuela.

En 1991 Lastra *et al.*, encontraron al PCC en el Noreste de Costa Rica. En 1990 se mostró que el PCC estaba establecido y ampliamente diseminado en el país. En 1991 un muestreo para VTC y PCC indicaron que el PCC estaba presente en Panamá y en la frontera entre Nicaragua y Costa Rica.

En el área del Caribe el PCC fue reportado en Trinidad en 1985. En la primavera del 92 fue reportado en las islas caribeñas de Guadalupe, Martinica y Santa Lucía. En mayo de 1992 el PCC fue reportado en Puerto Rico y República Dominicana. En marzo de 1993 científicos cubanos reportan su presencia en cuatro provincias de Cuba y en Julio 1993 fue reportado en Jamaica (Rocha, *et al.*, 1995).

Hasta la fecha se tiene conocimiento de que la enfermedad se encuentra presente en el Lejano Oriente, Australia, Africa, India, Sur, Centro y Norteamérica.

En países como Argentina, Uruguay, Brasil y Perú el VTC del tipo declinamiento se encuentra ampliamente distribuido, mientras que en Brasil y Perú además esta presente el tipo que ocasiona acanaladuras o picado del tallo.

2.2. SINTOMATOLOGÍA

Los primeros síntomas externos de las plantas afectadas por VTC son: hojas de coloración verde opaca y abarquilladas, clorosis de la nervadura central, consistencia coreácea y defoliación, amarillamiento total de las hojas viejas, declive rápido de la planta, seca de los gajos a partir de las extremidades, necrosis de los tubos perforados de la naranja ácida, pudrición de las raicillas y muerte de la planta, (Fig. 2) (INIA, 2000; http://www.inia.el/virología/enfermedades/citricos_tristeza.htm)



Fig. 2. Sintomatología causada por el VTC: picado de tallo, resaltamiento de nervaduras y muerte de la planta

La brotación es numerosa, débil y de hojas pequeñas. La planta a partir del segundo año después de la infección comienza a mostrar pérdida de vigor. Todos estos síntomas son consecuencia de la acción del virus en la zona de la unión variedad porta injerto. El virus afecta los vasos conductores y sus células acompañantes. Estos, al perder turgencia se aplastan produciendo una hipertrofia de las células del parénquima. El daño al tejido conductor del portainjerto, causa en la parte aérea, un déficit hídrico y una falta de nutrimentos en la zona radical. Dependiendo de los grados de resistencia y susceptibilidad de las diferentes combinaciones de variedad-portainjerto, la planta colapsará más o menos rápido. En el tronco se observa el daño sólo unos 2.5 cm sobre la unión y hacia abajo las alteraciones llegan en algunos casos hasta los 45 cm (INIA. 2000).

La tristeza se caracteriza también por la presencia de síntomas foliares típicos en ciertas especies como en el limón mexicano, en el cual se manifiesta de forma más acusada la formación de **guiones** en las nervaduras foliares, distinguibles cuando las hojas son observadas a “contraluz” o a simple vista cuando hay mayor severidad de la enfermedad (Argumedo y Rocha-Peña, 1993).

Existen otras formas en que se presenta la tristeza y están relacionadas con la severidad o raza del virus, esto es, el VTC puede inducir acanaladuras o picado del tallo o ramas en el injerto y o el patrón. En casos severos se presenta un debilitamiento general del árbol con una consecuente reducción del tamaño del fruto y en el rendimiento; el potencial destructivo del acanalado o picado del tallo es de importancia mayor, ya que afecta a los cítricos, independientemente del patrón utilizado (Argumedo y Rocha-Peña, 1993.).

2.3 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS

El VTC pertenece al grupo de los closterovirus; tiene forma de varilla flexible o de partícula filamentosa que mide 11-12 X 2000 nm, las partículas tienen un sólo cordón de ácido ribonucleico (ARN) como material genético, de aproximadamente 2000 bases; (Fig. 3), el cual presenta agregados de partículas, denominados inclusiones, que frecuentemente se encuentran en el parénquima o células adyacentes a los haces vasculares del floema, causando declinación de las plantas y disminución en la producción de frutas y finalmente la muerte de los árboles. Este virus presenta cuatro tipos o variantes: 1) asintomática, 2) la variante leve que ocasiona clorosis ligera, 3) la moderada que provoca picado de tallo, y 4) la severa, causante de la muerte de la planta en corto plazo (Comunicación personal Ing. Cesar Gomez Llanos, técnico del CESAVESIN).

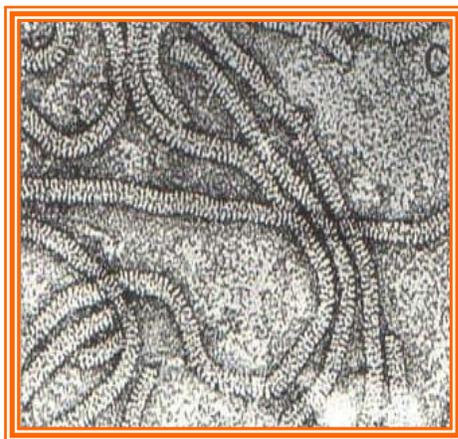


Fig. 3. Micrografía electrónica del Virus de la Tristeza de los Cítricos

En México, desde su aparición ha sido aislado y caracterizado por investigadores del INIFAP y de la DGSV, para ello han utilizado antisueros policlonales y el monoclonal MCA-13 que fue desarrollado en los Estados Unidos a partir de un aislamiento del VTC que causa declinamiento en plantas injertadas en naranjo agrio y reacciona selectivamente con la mayoría de los aislamientos severos del virus; así como las pruebas moleculares

hibridación, reacción de cadena de la polimerasa y biocaracterización. Mediante los métodos anteriores, se ha determinado que de las cuatro variantes existentes, aún no se ha detectado una que mate a los árboles en corto tiempo; aunque cabe mencionar que un aislamiento de Tamaulipas fue muy similar a las variantes que causan picado de tallo, considerada como severa media.

La magnitud del daño depende de varias condiciones, entre las que destacan la presencia de hospederos susceptibles como el portainjerto naranjo agrio *Citrus aurantium* (90% de la citricultura de México), la presencia de variantes severas del virus y temperaturas medias óptimas para su desarrollo (20-25°C). Afecta prácticamente todas las especies y variedades de cítricos, así como híbridos y algunas especies afines como *Aeglopsis chevalien*, *Afraegle paniculata*, *Fortunella* sp., *Pamburus missiones* y *Citrus macrophylla*.

2.4. TRANSMISIÓN

El VTC se transmite de dos maneras: una por medio del injerto, o sea por medio del material de propagación (yemas) provenientes de plantas enfermas y otra por medio de varias especies de áfidos en forma semipersistente (pueden ser adquiridos e inoculados en períodos de acceso de apenas 30 minutos), entre los cuales destacan *T. citricidus* y *Aphis gossypii* Glover, que son los responsables de la gran diseminación del virus en el campo. Otros áfidos vectores del VTC reportados son *Aphis spiraecola* Patch, y *Toxoptera aurantii* B. de Fonsc.; sin embargo, *T. citricidus* es el vector más eficiente y el causante de la gran mortalidad de árboles por esta enfermedad en Sudamérica, en tanto que *Aphis gossypii* es el responsable de los problemas epidémicos del VTC en España, Israel y E.E.U.U. (California y Florida). El VTC no se trasmite mediante semilla, por lo que todas las plantas provenientes de semillas están exentas de este virus (Argumedeo y Rocha-Peña, 1993).

Durante algún tiempo se consideró a *T. citricidus* el único vector responsable de la diseminación del VTC en campo. A finales de la década de 1920 la citricultura de Argentina y Brasil estaban basadas en plantaciones injertadas en naranjo agrio. Alrededor de 1930, hubo introducciones de plantas completas de cítricos provenientes de África del Sur y Asia, las cuales venían infectadas por el VTC junto con el áfido *T. citricidus* proveniente de países asiáticos. De esta forma la diseminación del virus fue inmediata. En España, California y Florida (E.U.A.) y finalmente en Israel el VTC fue introducido pero sin el vector, aparentemente en importaciones masivas efectuadas durante los años 1920-1940 también de países asiáticos. Sobre el hallazgo del virus en esos lugares, en ensayos iniciales transmisiones efectuadas en forma independiente con los aislamientos del VTC introducidos, otros áfidos presentes en esas áreas, tales como *Aphis gossypii*, *A. spiraecola* Patch (= *A. citricola* van der Goot) y *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe, mostraron ser vectores poco eficientes del virus (Rocha, Peña.M.A., 1992). Debido a esta circunstancia, se llegó a pensar que mientras *T. citricidus* no estuviera presente, el VTC nunca llegaría a ser problema en esas áreas cítricas. Sin embargo, en las décadas de 1960 y 1970 la tristeza empezó a ser diseminada epifíticamente en España, Israel en California y Florida, EUA, aún en ausencia de *T. citricidus*. En ensayos efectuados en forma independiente en Israel, California, Florida y España, se descubrió un cambio en la transmisibilidad de muchos aislamientos del VTC severos para ser eficientemente diseminados por *A. gossypii*. En los tres países mencionados, esto ocurrió incidentalmente entre 30 y 50 años después de que se efectuaron las primeras importaciones de cítricos infectados por el VTC. Aparentemente los aislamientos del VTC presentes en el germoplasma originalmente introducido de Asia, eran primariamente transmitidos por *T. citricidus* y llevó alrededor de 30-50 años para que desarrollaran la capacidad de ser transmitidos por *A. gossypii*. Por esto actualmente tanto Israel, España, Estados Unidos (Florida y California) tiene problemas epidémicos con el VTC, aún en ausencia de *T. citricidus* (Rocha, Peña, M.A., 1992).

En California y posiblemente otras áreas citricolas del mundo, las altas poblaciones de *A. spiraecola* frecuentes en plantaciones de cítricos, aparentemente pueden compensar su relativa baja eficiencia como vector del virus, por lo que esta especie puede jugar un papel importante adicional en la diseminación del virus en el campo (Rocha, Peña, M.A., 1992).

Otros áfidos que han sido consignados como vectores del VTC bajo condiciones experimentales son: *Aphis craccivora* Koch, *Dactinotus jaceae* L y *Myzus persicae* Sulzer (Argumedo y Rocha-Peña, M.A., 1993).

2.5. CONTROL

El control del virus está basado en medidas indirectas contra el virus de tal forma que eviten el progreso de la diseminación en el espacio y/o protegen la vida económica del árbol. En zonas de cultivo de cítricos se deben tomar las medidas cuarentenarias necesarias para impedir la entrada de material infectado y en caso de encontrarse plantas contaminadas ellas deben ser eliminadas a la brevedad. En zonas donde el virus ya se ha establecido deben utilizarse combinaciones variedad portainjerto tolerantes (INIA, 2000).

2.6. CARACTERISTICAS DEL VECTOR *T. citricidus*

El pulgón café de los cítricos (PCC) es probablemente nativo de China y actualmente se encuentra distribuido en una gran cantidad de regiones citrícolas del mundo. Los únicos lugares donde aún no ha sido introducido son: los países de la Costa del Mediterráneo (Italia, España, Israel, etc.), las islas del Caribe, algunos países de Centro América, México y Estados Unidos. Aunque es considerado como una especie tropical, el áfido existe en los lugares fríos del Japón, en el sur del desierto del Sahara, en la India, Ceylán, en las regiones áridas de África del sur, Australia y Nueva Zelanda, así como todos los pa 13

del oriente. Las condiciones climáticas de los lugares donde aún no ha sido introducido no difieren de las que prevalecen en muchas de las regiones donde este vector es actualmente endémico. Por tal motivo, no existe ninguna razón por la cual este vector no prosperaría en esos países. *T. citricidus* además de ser vector de aislamientos extremadamente severos del VTC, es en sí una plaga de consideración del cultivo de los cítricos.

Por las características de color y forma, es frecuentemente confundido con el pulgón negro *Toxoptera aurantii* y *Aphis cracivora*, sin embargo existen cuatro características que los distinguen (Fig. 4):

1. Antenas: los segmentos I, II y III de las antenas en las formas aladas de *T. citricidus* son de color café oscuro o negro, mientras que los mismos segmentos en *T. aurantii* son de color claro.
2. Alas: El sector del pterostigma de *T. citricidus* es de color claro, en contraste con un sector del pterostigma notoriamente oscuro en *T. aurantii*.
3. Alas: La vena media es doblemente bifurcada en *T. citricidus*, en contraste con una bifurcación simple en *T. aurantii*.
4. Tamaño: *T. citricidus* es alrededor de 10 por ciento más grande que *T. aurantii*



Fig. 4. Fotografía del Pulgón Café de los Cítricos

Asimismo, puede ubicarse por la presencia de sus altas poblaciones y por la pigmentación que deja en nuestras manos o en alcohol al macerar ejemplares de la colonia.

Se ha establecido que el PCC es una plaga muy alarmante donde se presenta y aunque los cítricos no son el único hospedero, si tiene preferencia por estos; en México, este insecto ha preferido los cítricos o especies relacionadas, entre ellas el naranjo agrio.

Esta especie supera en gran medida a *Toxoptera aurantii*, *Aphis spiraecola*, *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* (Glover) y *Aphis cracivora*, las cuales están asociadas con la transmisión del VTC. Estas 5 especies de pulgones son ineficientes en transmitir variantes leves y moderadas de VTC, pero son eficientes en transmitir variantes severas, mientras que el PCC es eficiente en transmitir cualquier variante del virus, pero selecciona en forma natural a las variantes severas; por lo anterior, al ser seleccionada la variante severa del VTC por el PCC, ésta se vuelve accesible al resto de las especies, quintuplicándose la posibilidad de que el VTC se disemine en forma natural en la zona donde se encuentra la raza severa. La segunda especie en importancia por ser eficiente como vector es *Aphis gossypii*. En todos los casos la transmisión es del tipo semipersistente (Rocha, Peña, M.A., 1992).

2.7. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los métodos para la identificación del VTC son:

1. Presentación de síntomas.
2. Presencia del vector.

El áfido *T. citricidus* se encuentra colonizando principalmente brotes tiernos, botones florales, frutos y chupones de cítricos . Cuando hay altas infestaciones pueden ocurrir deformaciones severas en las hojas.

3. Por métodos serológicos como es el Ensayo de Inmunoabsorción de Conjugados Enzimáticos. (Enzyme-linked immunosorbent assay. ELISA).

Debido a su gran versatilidad y alta sensibilidad, este método ha llegado a ser de uso imprescindible en cualquier laboratorio o institución donde se trabaje con el VTC.

Esta técnica fue desarrollada por Engvall y Perlmann (1971). ELISA fue empleada primero para detectar anticuerpos contra enfermedades infecciosas en humanos y animales (Voller *et al.*, 1974). Su uso para la detección de virus de plantas fue descrito por Voller *et al.*, 1976 y Clark y Adams (1977). ELISA fue adoptada rápidamente para la detección de virus y otros patógenos, y varias modificaciones fueron propuestas (Casper, 1977; Cambra *et al.*, 1979; Salazar, 1979), aunque la técnica original descrita por Clark y Adams (1977) es aún la más usada.

La inmunodiagnos is tiene dos elementos fundamentales: el antígeno y el anticuerpo. Un antígeno completo es un agente químico o biológico capaz

de estimular una respuesta inmunológica específica cuando es introducido en un animal, y también capaz de reaccionar con los productos de esta respuesta (Salazar, 1995).

ELISA se basa en la producción de un conjugado anticuerpo - enzima en el cual ambas moléculas retienen sus propiedades individuales. El anticuerpo se adhiere al antígeno mientras que la enzima detecta y amplifica tal reacción (Salazar, 1995).

4. Por métodos moleculares: Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Está basado en la síntesis específica de secuencias de ADN, gracias a la enzima ADN polimerasa (termoestable), las cuales están localizadas entre dos iniciadores o cebadores (oligonucleótidos) de secuencia corta y conocida y, complementarios a una región del ácido nucleico de interés (Saiki, *et al.*, 1985, Querci, *et al.*, 1993). Los iniciadores son sintetizados con una estructura determinada de tal manera que se orienten en el ADN a ser amplificado y que la síntesis por la polimerasa proceda a través de la región entre los iniciadores.

5. Hibridación molecular.

El análisis de hibridación molecular (Symons, 1984) ha llegado a ser en los últimos años la técnica preferida para la detección de virus.

La técnica de hibridación de ácidos nucleicos fue introducida por primera vez por Spiegelman (1964) para formar híbridos en solución entre ARN y ADN. Hoy en día, la técnica se lleva a cabo adhiriendo los ácidos nucleicos (por ejemplo, extractos de plantas que contienen virus) a un filtro de nitrocelulosa ó nylon y luego incubando este filtro con una solución de la sonda. La sonda

es un ADN o ARN complementario marcado, preparado de ácido nucleico viral por síntesis directa o por métodos de ADN recombinante.

Después de la hibridación con la sonda, los híbridos que se hayan formado entre el ácido nucleico absorbido en el filtro y la sonda son detectados por autoradiografía (sondas marcadas radiactivamente) o con un sustrato enzimático (fluoresceína o digoxigenina).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.SITIOS DE MUESTREO

Se colectaron muestras de dos Centros de Validación y Transferencia de Tecnología de la Fundación Produce Sinaloa, A.C.; uno de ellos ubicado en la carretera vecinal a Chametla, Km. 6.5 en Rosario, Sinaloa, (Cuadros 3.1 a 3.3) siendo el muestreo de 590 árboles de una totalidad de aproximadamente 1500; en esta huerta los árboles tienen una edad promedio de 8 años, están plantados a una distancia entre árboles de 6 X 8 m y el porta injerto predominante es *Macrophila* y *Volkameriana*. El segundo Centro de Validación fue en la Huerta ubicada en Aguaruto,(Cuadro 3.4) perteneciente al municipio de Culiacán, Sin., aquí se muestrearon los 399 árboles de cítricos existentes en la huerta, los cuales fueron trasplantados en Junio de 1973 (edad promedio de 32 años).

La región de Chametla, perteneciente al municipio del Rosario, Sin. tiene unas coordenadas de 23° 0' y 105° 52', con un tipo de clima $BS_1(h')w''(w)(e)$, en donde: BS_1 = Clima de estepa menos seco.

h' = Temperatura media anual

w'' = dos estaciones lluviosas separadas por una temperatura seca corta en el verano y una larga en la mitad fría del año.

w = Clima con invierno seco.

e = Clima extremo de la parte central norte con oscilación entre 7° y 14° C.

(Fuente: García, E. 1973)

La Sindicatura de Aguaruto, pertenece al Municipio de Culiacán, con unas coordenadas de 24° 48' y 107°24', con un tipo de clima $BS_1(h')w(e)$, en donde:

BS_1 = Clima de estepa menos seco.

h' = Temperatura media anual

w = Clima con invierno seco.

e = Clima extremo de la parte central norte con oscilación entre 7° y 14° C.

Las temperaturas máxima, mínima y media predominantes en los días de los muestreos se enlistan en el Cuadro 3.5:

Cuadro 3.1. Distribución árboles de Limon en el Banco de Germoplasma de Chametla, Sin.

N

↑

7	14	21	27	33	39	X	52	59	66	73	80	87	X
6	13	20	26	32	38	45	51	58	65	72	79	86	93
5	12	19	25	31	37	44	50	57	64	71	78	85	92
4	11	18	24	X	36	43	49	56	63	70	77	84	91
3	10	17	23	30	35	42	48	55	62	69	76	83	90
2	9	16	X	29	X	41	47	54	61	68	75	82	89
1	8	15	22	28	34	40	46	53	60	67	74	81	88

X- No hay árbol

S

Cuadro 3. 2 Distribución de árboles de mandarina y lima en el Banco de Germoplasma de Chametla, Sin.

E

		146		169	212	213	256	257	300	322	323	366	367	
		145	168	170	211	214	255	258	299	321	324	365	368	
	105	144	167	171	210	215	254	259	298	320	325	364	369	
	106	143	165	172	209	216	253	260	297	319	326	363	370	
	107	142	164	173	208	217	252	261	296	318	327	362	371	
	108	141	163	174	207	218	251	262	295	317	328	361	372	
	109	140	162	175	206	219	250	263	294	316	329	360	373	
	110	139	161	176	205	220	249	264	293	315	330	359	374	
	111	138	160	177	204	221	248	265	292	314	331	358	375	
	112	137	159	178	203	222	247	266	291	313	332	357	376	
		113	136	158	179	202	223	246	267	290	312	333	356	377
104	114	135	157	180	201	224	245	268	289	311	334	355	378	
103	115	134	156	181	200	225	244	269	288	310	335	354	379	
102	116	133	155	182	199	226	243	270	287	309	336	353	380	
101	117	132	154	183	198	227	242	271	286	308	337	352	381	
100	118	131	153	184	197	228	241	272	285	307	338	351	382	
99	119	130	152	185	196	229	240	273	284	306	339	350	383	
98	120	129	151	186	195	230	239	274	283	305	340	349	384	
97	121	128	150	187	194	231	238	275	282	304	341	348	385	
96	122	127	149	188	193	232	237	276	281	303	342	347	386	
95	123	126	148	189	192	233	236	277	280	302	343	346	387	
94	124	125	147	190	191	234	235	278	279	301	344	345	388	

Cuadro 3.3. Distribución de árboles de mandarina y lima en el Banco de Germoplasma de Chametla, Sin. Continuación

E

410	411	454	455	498	499	542	543	586	587	
409	412	453	456	497	500	541	544	585	588	
408	413	452	457	496	501	540	545	584	589	
407	414	451	458	495	502	539	546	583	590	
406	415	450	459	494	503	538	547	582	591	
405	416	449	460	493	504	537	548	581	592	
404	417	448	461	492	505	536	549	580	593	
403	418	447	462	491	506	535	550	579	594	
402	419	446	463	490	507	534	551	578	595	
401	420	445	464	489	508	533	552	577	596	

400	421	444	465	488	509	532	553	576	597	
399	422	443	466	487	510	531	554	575	598	
398	423	442	467	486	511	530	555	574	599	
397	424	441	468	485	512	529	556	573	600	
396	425	440	469	484	513	528	557	572	601	616
395	426	439	470	483	514	527	558	571	602	615
394	427	438	471	482	515	526	559	570	603	614
393	428	437	472	481	516	525	560	569	604	613
392	429	436	473	480	517	524	561	568	605	612
391	430	435	474	479	518	523	562	567	606	611
390	431	434	475	478	519	522	563	566	607	610
389	432	433	476	477	520	521	564	565	608	609

Cuadro 3.4 Banco de Germoplasma de cítricos y especies afines, Sub-Estación
Aguaruto del Cevacu Cirno-Inifap

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
L. Eureka			T. Rio Red			L. Rugoso			L. Rangpur			13	16	17	7	1	5
L. Persa			L. Ponderosa			N. Dwet sdl			L. Mexicano			15	12	18	14	15	14
N. Hamlin			Cit. Carrizo			N. Hamlin Tex			N. Hamlin 1			1	5	16	1	13	2
N. Frua			N. Koethan			N. Parson B.			N. Parson B			3	2	8	6	8	2
N. Pineapple			N. Queen OL			N. Tarocco			N. Grillete			12	9	11	1	3	5
N. W. Navel			N.S. Miguel			N.Jaffa			Chironja			16	3	15	8	16	1
N. Puerto Rico-1			N. PR-2			N. PR-6			N. PR-7			1	18	15	17	15	7
N. Valencia			N.Val. Tex.			N.Val. Calif.			N. Val Rio F.			8	6	7	6	15	13
N. Val. 12-5			N. Pajarito			N. Val. Tempra			N. Val Camp. B			17	14	6	18	16	17
N. Navel			M. Dancy Furr			M. Dancy Frost			M. Fortune			18	2	17	9	12	13
M.Fremont			M. King			M. Lee			M. Algeriana			14	4	2	18	3	3
M.Encore			M. Ponkan			M. Fairchild			M. Común			13	14	12	13	1	18
M.Satsuma			M. japonesa			M. Kinow			N. Pope Summ			3	4	5	5	6	7
M.Cleopatra			M. Murcott			M. Osceola			N. Val 103			8	9	15	10	12	11
Tan.Minneola			Hib. Chironja			M. Pearl			M. Clementina			11	18	2	2	13	11
T.Duncan			T. Marsh Frost			T. Marsh Gard			T. Marsh			15	8	9	16	7	8
T. Red Blush			T. Shary Red			T. Red Mex			N. Val Cutter			8	1	2	14	16	10
N. Moro			Cit. Savage			Cit. Morton			N.Salustiana			14	5	18	15	1	16
N. Agrio Tex			N. Agr. Austr.			N. Agr. Fraser			N. Agr. Region			1	13	3	15	16	4
Tan. Sunshine			Hib. Citremon			Citrangequa			Lima Palestina			2	17	17	18	18	3
M.Temple			M. Page			N. Val. Jaral			M. Robinson			M. Kara		Calamondin			
M. Nova			M. Orlando			M. pearl			N. Marrs			Cit. Troyer		Taiwanica			
T.Duncan N.			T. Marsh Un			Pomelo Haw			Naranja Hee								
Chinotto			C. Sinton			C.Volkameriana			L. Lisbon			Macrophylla		Kumqua T.			
Alemow			Lima Hib. Me			C. Taiwanica			Limequat			KunquatNag		L. Mex.Reg.			
Citrumelo S.			Brasilian Sour			C. Amblicarp			C. Depresa			L. S/espina		P. Trifoliata			

Fecha de trasplante: Junio de 1973 hileras de 1 a 20

Los árboles del 13-18 de las hileras 1-20 son árboles de un estudio comparativo de 6 portainjertos en 3 especies: Naranja, Toronja y Mineola.

Cuadro 3.5. Temperaturas máximas, mínimas y medias tomadas de la Estación Meteorológica.

FECHA	TEMPERATURAS		
	Máxima	Mínima	Media
14/Dic/02	31.2	7.0	19.1°C
12/Ene/03	31.0	12.0	21.5°C
1/Feb/03	33.0	18.0	25.5°C
8/Feb/03	28.5	12.0	20.2°C
13/Mar/03	31.5	10.0	20.7°C
19/Mar/03	27.0	8.5	17.7°C
8/May/03	37.2	13.5	25.3°C
24/May/03	35.6	21.5	28.5°C
31/Jul/03	38.0	24.0	31.0°C
15/Feb/04	27.4	5.0	16.2°C
22/Feb/04	24.0	11.0	17.5°C

Estas temperaturas fueron tomadas de la Estación Meteorológica perteneciente a la Comisión Nacional del Agua, que comprende la región de Aguaruto; el cual tiene una altitud de 38.54 m/nm, una latitud de 24° 38' 05" y longitud de 107° 26' 26".

3.2. TOMA DE MUESTRAS

La toma de muestras se realizó de la siguiente manera: Se tomó de los árboles la corteza y hojas de los brotes más jóvenes (6 por planta - de las regiones norte, sur, este y oeste de la planta-), se depositaron en una hielera y se llevaron a procesar a la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Valle de Culiacán del INIFAP, en donde se les practicó análisis

3.3 ANÁLISIS DE MUESTRAS

El análisis se llevó a cabo mediante la técnica serológica de conjugados enzimáticos (ELISA) del tipo sandwich de doble anticuerpo (DAS), para esto se adquirió el PathoScreen Kit para el VTC de Agdia inc. con todos los reactivos

necesarios para el análisis, a continuación se describen los pasos que se siguieron de esta técnica (los cuales son proporcionados por el proveedor):

a) Sensibilización de la placa.

Esta consistió en preparar un amortiguador “cubridor” (coating buffer)(Apéndice). De este amortiguador se tomó 1 mL , se le adicionó 5 μ l de anticuerpo concentrado, se diluyó perfectamente y se distribuyó 100 μ l de la solución en cada celda de la placa de poliestireno, posteriormente se cubrió la placa para evitar la evaporación y se puso en camara húmeda toda la noche a 4°C. Pasado el período de incubación, con un movimiento fuerte y rápido se vació el contenido de la placa y se dieron de 4 a 8 lavados con PBST (amortiguador de lavado) (Apéndice)

b) Adición de la muestra.

Se tomó una porción de hoja y corteza (tierna) de cada muestra, esto se colocó en mortero, se le adicionó de 1 a 3 mL de amortiguador de extracción MEB (Apéndice) y se maceró; enseguida se tomó el macerado de la muestra y se colocaron 100 μ l en cada celda y así sucesivamente hasta completar la placa, (la tira de poliestireno tiene 8 celdas, en una se depositó el control positivo, en otra el control negativo, en las siguientes las muestras), se cubrió la placa con Parafilm y se colocó en cámara húmeda toda la noche a 4°C., en una libreta se anotó número de árbol y en que celda se colocó.

c) Lavado

Pasado el período de incubación se lavó la placa con PBST, de 4 a 8 veces.

d) Adición de la enzima fosfatasa alcalina.

Aproximadamente 15 minutos antes de que finalizara el período de incubación se preparó la enzima fosfatasa alcalina de la siguiente manera: Se tomó 1 ml. de buffer ECG 1X (Apéndice) y se le agregó 5 μ l de la enzima fosfatasa alcalina, se diluyó perfectamente y se colocaron 100 μ l en cada

celda, esto se depositó en cámara húmeda a temperatura ambiente por 2 horas.

e) Lavado

Pasado el período de incubación nuevamente se lavó la placa con PBST, de 4 a 8 veces.

f) Adición del sustrato de la enzima (PNP)(Apéndice).

Aproximadamente 15 minutos antes de que finalizara el período de incubación se preparó el PNP (P-nitrofenil fosfato) de la siguiente manera: Se diluyó 1 mL del sustrato PNP concentrado en 4 mL de agua destilada, se agitó y se añadió una tableta de PNP, el recipiente se cubrió con papel aluminio (porque el reactivo es sensible a la luz), esto se agitó en Vortex hasta que la tableta se diluyera completamente, ya diluida la pastilla se distribuyó 100 μ l en cada celda y se dejó en incubación de 30 a 60 minutos. Después de transcurrido el tiempo de incubación se apreció a simple vista la coloración del control positivo; posteriormente se añadió una gota de Hidróxido de sodio para detener la reacción (esto fue opcional).

g) Lectura de la placa en el espectrofotómetro.

Los resultados fueron interpretados a simple vista y se empleó el Espectrofotómetro Spectronic® Genesys TM5, colocando 2900 μ l de agua destilada por 100 μ l de muestra en celdas de poliestireno semi-micro especiales para medir la reacción final de la prueba a 405 nm de densidad óptica (DO) (Iracheta, *et al.*, 2001).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Banco de Germoplasma de Chametla, Sin. (Centro de Validación y Transferencia de Tecnología de Sinaloa, A.C.), se colectaron muestras en las siguientes fechas: 14 de Diciembre de 2002, 12 de Enero de 2003, 1ro. de febrero de 2003, 8 de Marzo de 2003 y 24 de Mayo de 2003. Posteriormente en el mes de Julio de 2003 se hizo otra toma de muestras para confirmar los resultados obtenidos y el 15 de Febrero de 2004 se terminó con el muestreo. En el Banco de Germoplasma de Aguaruto, Sin., se hicieron dos muestreos, el 13 y 19 de Marzo de 2003, posteriormente el 24 de Mayo del mismo año se hizo un último muestreo, cabe hacer la aclaración que este Banco de Germoplasma de Aguaruto se muestrearon en su totalidad 399 árboles, y en el de Chametla se muestrearon 590 árboles de un total aproximado de 1500 árboles.

Las muestras se llevaron al Laboratorio de Biotecnología, en donde se procesaron por el Método de ELISA. Las muestras se analizaron en grupos de 10 para agilizar el procedimiento, con éste método se procesaban sesenta muestras por cada "tira", de ocho celdas. En el caso de que se detectara reacción positiva en alguno de los grupos, se procesaban individualmente para definir exactamente el árbol correspondiente, esto es posible debido a la sensibilidad de la técnica de ELISA, la cual puede detectar concentraciones de virus entre 0.1 y 10 ng/mL., (Gugerli, 1983).

Para considerar que una muestra fuera positiva, se tomó la lectura de cada celda en el espectrofotómetro a una absorbancia de 405 nm., (lectura recomendada para la longitud de onda del p-nitrofenil fosfato que es el producto final que se le agrega a la placa y que da la coloración amarilla en la Técnica de ELISA) (Catalogo Sigma Reactivos y Productos Químicos 2004-2005, p. 1465), comparando con nuestros controles positivo (control positivo para el Virus de la Tristeza de los Cítricos, incluido en el kit) y el control negativo (Amortiguador de

extracción). Se consideraron positivos aquellas muestras que tuvieron una lectura 3 veces mayor que el control negativo. En los cuadros del 4.1 al 4.3 los valores varían de acuerdo a la lectura del control positivo y negativo, por tal razón hay algunas lecturas muy elevadas, sin embargo son resultados negativos al compararse con los controles correspondientes de esa placa.

En la Huerta de Chametla se observaron algunos árboles secos, los técnicos adscritos en ese Centro de Validación hicieron la aclaración de que el motivo era porque en temporada de lluvias se inunda esa área, lo cual pudo crear una condición adecuada para el ataque de hongos como *Phytophthora parasítica*, que causan marchitez en cítricos. También aclararon que sí se han observado pulgones pero estos no se han identificado (Ing. Alberta Vázquez, Técnico del Centro de Validación en Chametla. comunicación personal, 2003); no obstante, la presencia de este grupo de insectos en ciertas épocas del año son comunes en el estado de Sinaloa, lo cual es un indicador de que existen condiciones para el desarrollo de este grupo de insectos, de ahí que el estado sea considerado riesgoso para esta enfermedad.

De igual manera, en la huerta de Aguaruto (Cuadro 4.4), en años anteriores se estuvo realizando un saneamiento de árboles con síntomas de marchitamiento, los cuales se incineraron para eliminar cualquier riesgo de contaminación en caso de que se tratase del VTC; sin embargo, al igual que en Chametla, no se realizó algún análisis sobre la etiología de este tipo de marchitamientos (M.C. Adolfo Ireta, Investigador del INIFAP. comunicación personal, 2003).

Cuadro 4.1. Resultados de los análisis de ELISA efectuados en el muestreo de los árboles de limón, colectados en el banco de Germoplasma de Chametla, Sinaloa

LIMON

Nombre común: Limón

Nombre Técnico: *Citrus aurantifolia*

Familia: Rutaceae

Variedad: Mexicano sin espinas

Fecha de colección: 14/12/02

Cantidad de árboles: 93

No. DE ARBOL	LECTURA ESPECTROFOTOMÉTRICA 402 nm	VTC (+ o -)
1	.081	-
2	.077	-
3	.081	-
4	.079	-
5	.077	-
6	.079	-
7	.086	-
8	.081	-
9	.079	-
10	.081	-
11	.077	-
12	.081	-
13	.081	-
14	.081	-
15	.081	-
16	.077	-
17	.077	-
18	.072	-
19	.081	-
20	.081	-
21	.077	-
22	.081	-
23	.089	-
24	.079	-
25	.071	-

26	.081	-
27	.079	-
28	.071	-
29	.079	-
30	.081	-
31	.079	-
32	.080	-
33	.080	-
34	.081	-
35	.081	-
36	.079	-
37	.080	-
38	.080	-
39	.077	-
40	.073	-
41	.077	-
42	.080	-
43	.080	-
44	.074	-
45	.080	-
46	.080	-
47	.080	-
48	.081	-
49	.077	-
50	.074	-
51	.074	-
52	.074	-
53	.072	-
54	.077	-
55	.074	-
56	.073	-
57	.074	-
58	.074	-
59	.081	-
60	.073	-
61	.081	-
62	.081	-
63	.074	-
64	.088	-
65	.074	-
66	.074	-
67	.074	-
68	.074	-
69	.079	-
70	.074	-

71	.074	-
72	.074	-
73	.089	-
74	.074	-
75	.074	-
76	.089	-
77	.074	-
78	.073	-
79	.074	-
80	.080	-
81	.074	-
82	.074	-
83	.074	-
84	.074	-
85	.079	-
86	.074	-
87	.074	-
88	.081	-
89	.074	-
90	.090	-
91	.074	-
92	.074	-
93	.081	-

Cuadro 4.2. Resultados de los análisis de ELISA efectuados en los muestreos de los árboles de mandarina colectados en el Banco de Germoplasma de Chametla, Sinaloa.

MANDARINA

Nombre común: Mandarina

Nombre técnico: Citrus reticulata

Familia: Rutaceae

Variedad: Reyna

Fecha de colección: 12/01/03

Cantidad de árboles: 97

No. DE ARBOL	LECTURA ESPECTROFOTÓMETRO 402 nm	CTV (+ ó -)
94	.087	-
95	.087	-
96	.094	-
97	.087	-
98	.087	-
99	.087	-
100		S/a
101		S/a
102	.087	-
103	.087	-
104	.087	-
105	.087	-
106	.087	-
107	.094	-
108	.071	-
109	.091	-
110	.072	-
111	.087	-
112	.094	-
113	.087	-
114	.097	-
115	.105	-
116	.087	-
117	.087	-
118	.076	-
119	.097	-

120	.097	-
121	.099	-
122	.097	-
123	.097	-
124	.099	-
125	.099	-
126	.099	-
127	.099	-
128	.099	-
129	.097	-
130	.097	-
131	.096	-
132	.097	-
133	.097	-
134	.097	-
135	.097	-
136	.099	-
137	.099	-
138	.087	-
139	.099	-
140	.078	-
141	.085	-
142	.094	-
143	.087	-
144	.087	-
145	.099	-
146	.087	-
147	.076	-
148	.074	-
149	.078	-
150	.074	-
151	.079	-
152	.075	-
153	.075	-
154	.079	-
155	.091	-
156	.075	-
157	.088	-
158	.076	-
159	.088	-
160	.081	-
161	.076	-
162	.088	-
163		S/a
164	.083	-

165	.076	-
166	.074	-
167	.088	-
168	.072	-
169	.091	-
170	.074	-
171	.091	-
172	.078	-
173	.075	-
174	.078	-
175	.079	-
176	.076	-
177	.076	-
178	.088	-
179		S/a
180	.088	-
181	.079	-
182	.091	-
183	.091	-
184	.078	-
185	.072	-
186	.079	-
187	.079	-
188	.079	-
189	.076	-
190	.088	-

Cuadro 4.3. Resultados de los análisis de ELISA efectuados en los muestreos de los árboles de lima colectados en el Banco de Germoplasma de Chametla, Sinaloa.

LIMA

Nombre común: Lima

Nombre técnico: *Citrus* sp.

Familia: Rutaceae

Variedad: Reyna

Fecha de colección: 8/03/03

Cantidad de árboles:

No. DE ARBOL	LECTURA ESPECTROFOTÓMETRO 402 nm	CTV (+ ó -)
191	.085	-
192	.094	-
193	.087	-
194	.085	-
195	.085	-
196	.094	-
197	.083	-
198	.087	-
199	.083	-
200	.083	-
201	.087	-
202	.085	-
203	.094	-
204	.083	-
205	.082	-
206	.085	-
207	.087	-
208	.083	-
209	.085	-
210	.085	-
211	.079	-
212	.083	-
213	.076	-
214	.087	-
215	.085	-

216	.094	-
217	.094	-
218	.077	-
219	.094	-
220	.089	-
221	.085	-
222	.072	-
223	.082	-
224	.093	-
225	.094	-
226	.093	-
227	.085	-
228	.073	-
229	.075	-
230	.093	-
231	.083	-
232	.079	-
233	.084	-
234	.081	-
235	.087	-
236	.083	-
237	.083	-
238	.079	-
239	.078	-
240	.083	-
241	.079	-
242	.091	-
243	.078	-
244	.087	-
245	.087	-
246	.074	-
247	.079	-
248	.079	-
249	.072	-
250	.074	-
251	.078	-
252	.076	-
253	.076	-
254	.079	-
255	.079	-
256		S /a
257	.072	-
258	.079	-
259	.076	-
260	.075	-

261	.074	-
262	.072	-
263	.082	-
264	.074	-
265	.072	-
266	.074	-
267	.084	-
268	.076	-
269	.075	-
270	.076	-
271	.075	-
272	.078	-
273	.076	-
274	.079	-
275	.076	-
276	.078	-
277	.072	-
278	.075	-
279	.079	-
280	.075	-
281	.079	-
282	.075	-
283	.079	-
284	.077	-
285	.076	-
286	.076	-
287	.076	-
288	.074	-
289	.072	-
290	.072	-
291	.072	-
292	.079	-
293	.076	-
294	.078	-
295	.079	-
296	.079	-
297	.076	-
298	.076	-
299	.087	-
300	.091	-
301	.082	-
302	.084	-
303	.084	-
304	.084	-
305	.084	-

306	.084	-
307	.094	-
308	.084	-
309	.085	-
310	.089	-
311	.087	-
312	.083	-
313	.084	-
314	.085	-
315	.094	-
316	.085	-
317	.085	-
318	.085	-
319		S/a
320	.080	-
321	.084	-
322	.089	-
323	.082	-
324	.080	-
325	.080	-
326	.096	-
327	.096	-
328	.087	-
329	.082	-
330	.085	-
331	.087	-
332	.096	-
333	.082	-
334	.087	-
335	.096	-
336	.089	-
337	.085	-
338	.096	-
339	.080	-
340	.087	-
341	.087	-
342	.096	-
343	.089	-
344	.096	-
345	.087	-
346	.094	-
347	.087	-
348	.085	-
349	.089	-
350	.083	-

351	.082	-
352	.089	-
353	.084	-
354		S/a
355	.083	-
356	.082	-
357	.080	-
358	.084	-
359	.082	-
360	.085	-
361	.083	-
362	.094	-
363	.082	-
364	.084	-
365	.085	-
366	.085	-
367	.090	-
368	.084	-
369	.096	-
370	.084	-
371	.082	-
372	.082	-
373	.085	-
374	.084	-
375	.094	-
376	.085	-
377	.094	-
378	.087	-
379	.084	-
380	.082	-
381		S/a
382	.080	-
383	.083	-
384	.090	-
385	.087	-
386	.094	-
387	.087	-
388	.096	-
389	.087	-
390	.090	-
391	.090	-
392	.085	-
393	.087	-
394	.084	-
395	.083	-

396	.094	-
397	.083	-
398	.080	-
399	.090	-
400	.090	-
401	.090	-
402	.087	-
403	.090	-
404	.087	-
405	.083	-
406	.085	-
407	.089	-
408	.094	-
409	.083	-
410	.085	-
411	.089	-
412	.092	-
413	.089	-
414	.089	-
415	.089	-
416	.089	-
417	.089	-
418	.089	-
419	.089	-
420	.091	-
421	.091	-
422	.089	-
423	.091	-
424		S/a
425	.091	-
426	.091	-
427	.091	-
428	.091	-
429	.089	-
430	.091	-
431	.091	-
432	.091	-
433	.083	-
434	.080	-
435	.089	-
436	.094	-
437	.089	-
438	.089	-
439	.090	-
440	.087	-

441	.087	-
442		S/a
443	.085	-
444	.087	-
445	.096	-
446	.084	-
447	.082	-
448	.087	-
449	.087	-
450	.080	-
451	.085	-
452	.080	-
453	.087	-
454	.087	-
455	.089	-
456	.094	-
457	.094	-
458	.113	-
459	.089	-
460	.094	-
461	.086	-
462	.089	-
463		S/a
464	.089	-
465	.089	-
466	.089	-
467	.093	-
468	.094	-
469	.094	-
470	.094	-
471	.113	-
472	.089	-
473	.086	-
474	.089	-
475	.086	-
476	.086	-
477	.112	-
478	.112	-
479	.112	-
480	.104	-
481	.112	-
482	.112	-
483		S/a
484		S/a
485	.104	-

486	.112	-
487		S/a
488		S/a
489	.104	-
490	.104	-
491	.104	-
492	.104	-
493	.104	-
494	.104	-
495	.104	-
496	.104	-
497	.091	-
498	.090	-
499	.089	-
500	.093	-
501	.094	-
502	.092	-
503	.094	-
504	.093	-
505	.093	-
506	.093	-
507	.093	-
508	.090	-
509	.092	-
510	.093	-
511	.090	-
512	.090	-
513	.092	-
514	.093	-
515	.092	-
516	.093	-
517	.093	-
518	.090	-
519	.090	-
520	.090	-
521	.086	-
522		S/a
523	.094	-
524	.089	-
525	.089	-
526	.089	-
527	.089	-
528		S/a
529	.089	-
530	.089	-

531	.089	-
532	.089	-
533	.089	-
534		S/a
535	.086	-
536	.112	-
537	.086	-
538	.086	-
539	.105	-
540	.114	-
541	.104	-
542	.094	-
543	.091	-
544	.093	-
545	.091	-
546	.093	-
547	.091	-
548	.091	-
549	.091	-
550	.093	-
551	.091	-
552	.091	-
553	.091	-
554	.091	-
555	.091	-
556	.093	-
557		S/a
558	.093	-
559	.093	-
560	.093	-
561	.093	-
562	.093	-
563	.093	-
564	.099	-
565	.113	-
566	.111	-
567	.112	-
568	.113	-
569	.113	-
570	.112	-
571		S/a
572	.111	-
573	.109	-
574	.118	-
575	.112	-

576	.112	-
577	.113	-
578	.090	-
579	.090	-
580		S/a
581	.113	-
582	.113	-
583	.105	-
584	.089	-
585	.118	-
586	.107	-
587	.109	-
588	.109	-
589	.109	-
590	.109	-
591	.109	-
592	.099	-
593	.104	-
594	.109	-
595	.109	-
596	.109	-
597	.109	-
598	.104	-
599	.104	-
600	.104	-
601	.099	-
602	.104	-
603	.104	-
604	.086	-
605	.086	-
606	.104	-
607	.104	-
608	.104	-
609	.099	-
610	.099	-
611	.099	-
612	.099	-
613	.099	-
614	.113	-
615	.099	-
616	.099	-

Cuadro 4.4. Resultados de los análisis de ELISA efectuados en los muestreos de los árboles de cítricos colectados en el Banco de Germoplasma de Aguaruto, Sinaloa.

BANCO DE GERMOPLASMA DE AGUARUTO

No. DE ARBOL	LECTURA ESPECTROFOTOMETRO 402 nm	CTV (+ ó -)
1	.123	-
2	.088	-
3	.080	-
4	.123	-
5	.088	-
6	.085	-
7	.080	-
8	.090	-
9		S/a
10	.088	-
11	.091	-
12	.080	-
13		S/a
14	.085	-
15	.086	-
16	.088	-
17		S/a
18		S/a
19	.084	-
20	.086	-
21		S/a
22		S/a
23		S/a
24	.090	-
25	.082	-
26	.084	-
27	.123	-
28	.090	-
29	.087	-
30	.101	-
31	.123	-
32	.090	-
33		S/a
34	.088	-

35	.087	-
36	.123	-
37		S/a
38		S/a
39		S/a
40	.088	-
41		S/a
42	.088	-
43	.086	-
44	.091	-
45		S/a
46	.087	-
47	.088	-
48		S/a
49		S/a
50	.123	-
51	.090	-
52		S/a
53	.088	-
54		S/a
55	.088	-
56	.088	-
57	.090	-
58	.084	-
59		S/a
60	.086	-
61	.087	-
62	.087	-
63	.123	-
64	.087	-
65		S/a
66	.088	-
67	.087	-
68		-
69	.088	-
70		S/a
71	.085	-
72	.088	-
73	.084	-
74	.086	-
75	.088	-
76	.088	-
77	.084	-
78	.086	-
79	.090	-

80	.085	-
81	.086	-
82	.086	-
83	.084	-
84		S/a
85	.085	-
86	.084	-
87	.088	-
88	.088	-
89		S/a
90	.086	-
91	.088	-
92	.080	-
93	.085	-
94	.084	-
95		S/a
96	.080	-
97	.088	-
98	.086	-
99	.086	-
100	.088	-
101	.080	-
102		S/a
103		S/a
104	.080	-
105		S/a
106		S/a
107		S/a
108	.080	-
109		S/a
110	.088	-
111		S/a
112	.088	-
113	.085	-
114	.088	-
115		S/a
116	.084	-
117		S/a
118	.084	-
119		S/a
120	.088	-
121	.085	-
122	.090	-
123	.088	-
124	.090	-

125	.087	-
126	.087	-
127	.087	-
128	.088	-
129	.090	-
130	.088	-
131		S/a
132	.101	-
133	.090	-
134	.090	-
135	.087	-
136		S/a
137		S/a
138		S/a
139		S/a
140		S/a
141	.091	-
142	.087	-
143		S/a
144	.087	-
145	.087	-
146		S/a
147		S/a
148		S/a
149	.087	-
150	.091	-
151		S/a
152	.087	-
153	.087	-
154	.087	-
155	.085	-
156	.085	-
157		S/a
158	.091	-
159	.085	-
160	.091	-
161	.101	-
162	.101	-
163	.101	-
164	.101	-
165		S/a
166	.101	-
167	.087	-
168	.091	-
169	.087	-

130	.088	-
131		S/a
132	.101	-
133	.090	-
134	.090	-
135	.087	-
136		S/a
137		S/a
138		S/a
139		S/a
140		S/a
141	.091	-
142	.087	-
143		S/a
144	.087	-
145	.087	-
146		S/a
147		S/a
148		S/a
149	.087	-
150	.091	-
151		S/a
152	.087	-
153	.087	-
154	.087	-
155	.085	-
156	.085	-
157		S/a
158	.091	-
159	.085	-
160	.091	-
161	.101	-
162	.101	-
163	.101	-
164	.101	-
165		S/a
166	.101	-
167	.087	-
168	.091	-
169	.087	-

170	.088	-
171		-
172	.101	-
173	.091	-
174		S/a
175		S/a
176	.091	-
177	.101	-
178		S/a
179	.093	-
180	.093	-
181		S/a
182		-
183	.107	-
184		S/a
185	.116	-
186	.090	-
187	.084	-
188	.093	-
189	.087	-
190	.087	-
191	.093	-
192	.091	-
193	.092	-
194	.093	-
195	.116	-
196	.087	-
197	.087	-
198	.102	-
199	.102	-
200	.097	-
201	.097	-
202	.097	-
203	.097	-
204	.100	-
205	.091	-
206	.090	-
207	.090	-
208	.102	-
209	.097	-

210		S/a
211		S/a
212		S/a
213	.102	-
214		S/a
215		S/a
216	.097	-
217		S/a
218	.100	-
219		S/a
220	.102	-
221		S/a
222	.095	-
223	.097	-
224	.102	-
225	.102	-
226	.100	-
227	.100	-
228	.101	-
229		S/a
230	.102	-
231	.100	-
232	.097	-
233	.102	-
234	.097	-
235	.100	-
236		S/a
237	.085	-
238	.099	-
239	.085	-
240	.099	-
241	.105	-
242	.105	-
243	.105	-
244	.099	-
245		S/a
246		S/a
247	.099	-
248	.099	-
249	.099	-
250	.087	-
251	.085	-
252	.099	-
253		S/a
254		S/a

255		S/a
256	.087	-
257	.099	-
258	.087	-
259		S/a
260	.099	-
261		S/a
262	.099	-
263	.109	-
264	.087	-
265	.099	-
266	.099	-
267	.109	-
268	.095	-
269	.093	-
270		S/a
271		S/a
272	.099	-
273	.085	-
274		S/a
275	.087	-
276	.093	-
277	.085	-
278		S/a
279	.094	-
280	.100	-
281	.095	-
282	.085	-
283	.105	-
284	.087	-
285	.093	-
286		S/a
287		S/a
288	.099	-
289	.099	-
290	.092	-
291	.099	-
292	.105	-
293		S/a
294	.102	-
295	.092	-
296	.093	-
297	.105	-
298	.105	-
299	.105	-

300	.099	-
301	.099	-
302	.099	-
303	.105	-
304	.099	-
305	.087	-
306	.087	-
307	.093	-
308	.093	-
309	.085	-
310	.093	-
311	.087	-
312	.102	-
313	.099	-
314	.102	-
315	.087	-
316	.092	-
317	.085	-
318	.093	-
319	.101	-
320	.099	-
321	.099	-
322	.099	-
323	.116	-
324	.099	-
325	.099	-
326	.102	-
327	.102	-
328		S/a
329	.085	-
330	.094	-
331	.099	-
332	.087	-
333	.130	-
334		S/a
335	.087	-
336	.087	-
337	.099	-
338	.087	-
339	.085	-
340	.092	-
341	.087	-
342	.102	-
343	.099	-
344	.099	-

345	.102	-
346	.096	-
347	.099	-
348	.102	-
349	.105	-
350	.095	-
351	.105	-
352	.105	-
353	.105	-
354	.105	-
355	.099	-
356	.109	-
357	.109	-
358	.094	-
359	.109	-
360	.095	-
361	.095	-
362	.095	-
363	.105	-
364	.109	-
365	.109	-
366	.109	-
367	.105	-
368		-
369	.109	-
370	.095	-
371		S/a
372		S/a
373		S/a
374	.095	-
375	.095	-
376		S/a
377	.095	-
378	.095	-
379	.109	-
380	.093	-
381	.095	-
382		S/a
383	.095	-
384	.116	-
385	.101	-
386	.087	-
387	.101	-
388	.090	-
389	.095	-

390	.094	-
391	.101	-
392	.094	-
393	.136	-
394	.092	-
395	.101	-
396		S/a
397	.094	-
398		S/a
399	.101	-
400	.087	-
401	.093	-
402		S/a
403		S/a
404	.091	-
405	.087	-
406	.095	-
407	.091	-
408	.087	-
409	.101	-
410	.093	-
411		S/a
412	.091	-
413	.121	-
414	.105	-
415		S/a
416	.094	-
417	.094	-
418	.087	-
419	.094	-
420	.087	-
421	.095	-
422	.087	-
423	.105	-
424	.094	-
425	.100	-
426	.099	-
427	.093	-
428	.095	-
429	.091	-
430	.090	-
431	.087	-
432	.107	-
433	.116	-
434	.116	-

435	.107	-
436	.095	-
437	.107	-
438	.121	-
439	.094	-
440		S/a
441	.095	-
442	.091	-
443	.107	-
444	.107	-
445	.121	-
446	.107	-
447	.101	-
448	.107	-
449		S/a
450	.116	-
451	.121	-
452		S/a
453		S/a
454	.121	-
455	.116	-
456	.121	-
457	.089	-
458	.121	-
459		S/a
460		S/a
461		S/a
462	.121	-
463	.132	-
464		S/a
465	.094	-
466	.087	-
467	.087	-
468	.102	-
469	.091	-
470	.092	-
471		S/a
472		S/a
473	.107	-
474		S/a
475	.092	-
476		S/a
477	.102	-
478	.093	-
479	.093	-

480	.107	-
481		S/a
482	.101	-
483	.093	-
484	.093	-
485	.087	-
486	.092	-
487	.095	-
488	.093	-
489	.087	-
490	.101	-
491	.116	-
492	.087	-
493	.091	-
494	.100	-
495	.100	-
496	.116	-
497	.092	-
498	.167	-
499	.107	-
500	.092	-

V CONCLUSIONES

Después de observar los resultados obtenidos de las muestras procesadas, se puede concluir que el VTC, no se detectó en los Bancos de Germoplasma de cítricos de las huertas de Aguaruto y Chametla en Sinaloa.

Esto coincide con los resultados negativos obtenidos en años anteriores (2001), dichos muestreos fueron realizados por el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Sinaloa (CESAVESIN), en la Huerta de Aguaruto, confirmándose con este trabajo los resultados negativos (Comunicación personal, Ing. Cesar Gómez Llanos).

VI RESUMEN

El virus de la tristeza de los cítricos (VTC) es un patógeno de distribución mundial, considerándosele uno de los principales problemas sanitarios de los cítricos en el mundo, debido a que en los últimos 20 años ha causado la muerte a más de 100 millones de árboles en América del Sur, California, Florida (E.U.), Israel y España (Iracheta, *et al.*, 2001)

Aunque nuestro estado no figura como un centro de producción citrícola de gran importancia, aquí se cuenta con dos bancos de germoplasma de cítricos, en los cuales existen materiales resistentes al VTC, de ahí que estos pueden ser utilizados como tutores o portainjertos (comunicación personal Ing. Cesar Gómez Llanos, CESAVESIN).

El objetivo del presente trabajo fue confirmar la presencia o ausencia del Virus de la Tristeza de los Cítricos (VTC) en los Bancos de Germoplasma de cítricos de Aguaruto y Chametla, mediante la Técnica Serológica ELISA.

Se colectaron 989 muestras de los Centros de Validación y Transferencia de Tecnología de la Fundación Produce Sinaloa, A.C.; ubicado uno de ellos en la carretera vecinal a Chametla, Km. 6.5 en Rosario, Sinaloa y el otro ubicado en Aguaruto, perteneciente al municipio de Navolato. Se llevaron a procesar a la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Valle de Culiacán, en donde se les practicó análisis de ELISA.

Todas las muestras se procesaron, dando resultado negativo; por lo que se concluye que los Bancos de Germoplasma de Aguaruto y Chametla están libres hasta el momento del Virus de la Tristeza de los Cítricos.

VII BIBLIOGRAFIA CITADA

- Argumedo, J. J., Rocha-Peña, M., 1993. El virus de la tristeza de los cítricos. Medidas preventivas. Folleto Técnico. INIFAP-SARH. P.15
- Besoain, X. A., Valenzuela, M., Castro, M., Ballester-Olmos, J. F., 2000. Current status of some virus and virus-like diseases of citrus in Chile. *Fitopatología*. 2000, 35:2,98-104.
- Cambra, M., Moreno, P., Navarro, L., 1979. Detección rápida del Virus de la Tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-Sandwich. *Anales INIA. Ser. Prot. Veg.* 12:115-125.
- Casper, R., 1977. Detection of potato leafroll virus in potato and in *Physalis floridana* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) *Phytopathol. Z.* 96:97-107.
- Clark, M.F., Adams, A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Engvall, E., Perlmann. P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.
- FAO, 1999. Anuario de producción.
- Febres V. J, L., Ashoulin, M., Mawassi, Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjanth, K. I., Lee, R.F., Niblett, C.L., 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86: 1331-1335.

García, E., 1973. Modificaciones al sistema de Clasificación Climática de Koppen. Instituto de Geografía. UNAM. 246 p.

Gugerli, P., 1983. Use of enzyme immunoassay in phytopathology. En: S. Avrameas, P. Druet, R. Masseyeff, G. Feldmann (eds.). Immunoenzymatic techniques. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Holanda. P. 369-384.

Herrera, M.G., Madariaga, M., Rosales, M., 1996. Diferenciación del Virus de la Tristeza de los cítricos (Citrus Tristeza virus) y del viroide causante de la Xiloporosis mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Simiente 66:36.

Herrera, M.G., Madariaga, M., Santalices, M., 1995. Detección del virus de la Tristeza de los Cítricos (Citrus Tristeza virus, CTV) en la zona central de Chile. Agricultura Técnica 55:167-169.

http://www.inia.el/virología/enfermedades/cítricos_tristeza.htm.

Iracheta, C.M., Peña, M.A., Rocha, P.M., 2001. Comparación de antisueros comerciales para la detección serológica del Virus de la Tristeza de los Cítricos. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de Fitopatología, Querétaro, Qro., México.

Lastra, R., Meneses, R., Still, P.E., Niblett, C.L., 1991. The citrus tristeza virus situation in Central America. pp 156-159 In: Proc. Conf. Intl. Org. Citrus Virol., 11th. Bransky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. (eds.) Riverside, California.

Lee R.F., Pappu, H.R., Rocha-Peña, M.A., Febres, V.J., Manjunath, K.L., Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Cevik, B., Akbulut, M., Benschler, D.,

- Anderson, E.J., Price, M., Ochoa, F., Niblett, C. L., 1996. Progress on strain differentiation of Citrus Tristeza Virus. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14:79-87.
- Mendoza, A., Salazar, C., Alvarado, O., Cruz, M. A., Barrera, H., 2003. Diferenciación molecular de razas severas y débiles de aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos de México. Artículo para publicarse en *Revista Fitotecnia Mexicana*.
- Querci, M., Salazar, L.F., Fernández-Northcote, E.N., 1993. Detection of Andean potato virus X isolates by radioactive and nonradioactive nucleic acid spot hybridization tests. *Phytopathology* 83:171-176.
- Rocha, M., Lee, R., 1991. Serological techniques for detection of citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods*. 34(3):311-331.
- Rocha, M., Lee, R., Lastra, R., Niblett, C., Ochoa, F., Garnsey, S., Yokomi, R. 1995. Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricidus*. Threats to citrus production in Caribbean and Central and North America. *Plant Disease*. 79:437-445.
- Rocha-Peña, M. A., Lee, R. F., Lastra, R., Niblett, C. N., Ochoa-Corona, F. M., Garnsey, S. M., Yokomi, R. K., 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector, *Toxoptera citricidus*. *Plant Disease*. 79:437-445.
- Rocha-Peña, M., Peña del Río, M. A., Lee, R., 1992. El virus de la tristeza y sus insectos vectores: Amenaza potencial para la citricultura de México. *Publicación especial No. 1. INIFAP-SARH*. p.40.
- Rocha-Peña, M. A. 2004. La citricultura de México y su fitosanidad. Veracruz XXXI Congreso Nacional de Fitopatología

SAGAR, Centro de Estadística Agropecuaria. 1999.

SAGAR. Comités Estatales de Sanidad Vegetal, 2000.

Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.

Salazar, L. F., 1979. Aplicación de la técnica serológica con conjugados enzimáticos (ELISA) para diagnosticar virus de la papa. *Fitopatología* 14:1-9.

Salazar, L. F., 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 226 p.

Spiegelman, S., 1964. Hybrid nucleic acids. *Scientific American* 228:34-42.

Stamo, B., D'Onghia, A.M., 1998. Detection of CTV in a citrus collection of Albania by immunoprinting. *Options Méditerranéennes, Serie B/n° 21, Proceedings of the Mediterranean Network on Certification of Citrus.*

Symons, R. H., 1984. Diagnostic approaches for the rapid and specific detection of plant viruses and viroids. In: Kosuge, T., Nester, E.W. (eds.). *Plant microbe interactions: Molecular and genetic perspectives, Vol. I.* Macmillan Publishing Company, Nueva York. p. 93-124.

Villarreal, G.L., Aguirre, L., Cruz, M., 1996. Presencia de la Tristeza de los Cítricos en plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo

León, México. Memorias del XXIII Congreso Nacional de Fitopatología, Guadalajara, Jalisco, México.

Villarreal, G. L., Ramirez, D. A., Robles, G., 2000. Campaña contra el Virus de la Tristeza de los Cítricos en México. Memorias séptima reunión anual del Consejo Consultivo Fitosanitario. SAGARPA. Comisión Nacional Agropecuaria, Puebla, Pue.

Voller, A., Bidwell, D. E., Bartlett, A., 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice. Bull. World Health Org. 53:55-65.

Voller, A., Bidwell, D. E., Huldt, G., Engvall, E., 1974. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. Bull. WorldHealth Org. 51:209-211.

Wheathers, L., Sánchez, L., Platt, R., 1969. Naturaleza y distribución de las enfermedades virosas de cítricos en Chile. Agricultura Técnica (Chile) 29:166-170.

www. Agroandino. Com/info@agroandino.com. ©Copyright 2000-2002. Agroandino Colombia.

APÉNDICE

AMORTIGUADOR DE RECUBRIMIENTO

Disolver en 1000 mL de agua destilada:

Carbonato de sodio (anhidro) 1.59 g

Bicarbonato de sodio 2.93 g

Azida de sodio 0.2 g

Ajustar el pH a 9.6. Almacenar a 4°C

AMORTIGUADOR DE EXTRACCIÓN MEB.

Disolver en 250 mL de PBST:

Tween – 20 1.25 g

Leche en polvo baja en grasas 1.0 g

Agitar por 30 minutos. Ajustar el pH a 7.4

AMORTIGUADOR ECG

Disolver 1 parte de Amortiguador ECG 5X en 4 partes de agua destilada. Agitar en Vortex.

AMORTIGUADOR PBST (de lavado).

Disolver en 1000 mL de agua destilada:

Cloruro de sodio 8.0 g

Fosfato de sodio dibásico (anhidro) 1.15g

Fosfato de potasio monobásico (anhidro) 0.2g

Cloruro de potasio 0.2g

Tween-20 0.5g

Ajustar el pH a 7.4

AMORTIGUADOR PNP

Disolver en 800 ml de agua destilada:

Cloruro de magnesio hexahidratado 0.1 g

Azida de sodio 0.2 g

Diethanolamina 97.0 mL

Ajustar el pH a 9.8 con Acido hidroclico. Ajustar el volumen final a 1000 mL con agua destilada. Almacenar a 4°C.