

EN ESPAÑA HAY QUE CONVIVIR CON EL VIRUS EVITANDO AL MÁXIMO LOS DAÑOS QUE PUEDE CAUSAR

# Bases para el control de las enfermedades causadas por el virus de la **tristeza de los cítricos**

La situación de la citricultura española sería sostenible en las condiciones actuales, ya que las nuevas plantas propagadas por los viveros autorizados están libres de virus, más del 90% de las plantas de campo están injertadas sobre patrones tolerantes al decaimiento por tristeza, y las cepas predominantes de CTV son poco virulentas y no afectan a las variedades cultivadas de naranjo dulce, mandarino o pomelo. Sin embargo, nada garantiza que esta situación se mantenga estable en el futuro.

Pedro Moreno y Silvia Ambrós.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Moncada, Valencia.

La aparición del virus de la tristeza de los cítricos o CTV (siglas derivadas de su nombre científico *Citrus tristeza virus*) fue un acontecimiento que cambió el curso de las principales citriculturas del mundo a partir de los años 30 del siglo pasado. La razón de este impacto tiene que ver con el uso generalizado de un patrón, el naranjo amargo, que se popularizó en la segunda mitad del siglo XIX para evitar los efectos de las epidemias de podredumbre del pie (causadas por oomicetos del género *Phytophthora*) que por aquel entonces diezaban la incipiente citricultura comercial de distintos países, incluyendo España. El naranjo amargo, un patrón resistente a la podredumbre del pie y de excelente calidad agronómica, fue clave para la expansión de la citricultura comercial que tuvo lugar a comienzos del siglo XX, pero al mismo tiempo, su utilización exclusiva en distintos países sentó las bases para el desastre que habría de ocurrir con la llegada y dispersión de CTV, un virus que afecta gravemente a la mayoría de las variedades de cítricos propagadas sobre este patrón.

CTV es peculiar en varios aspectos. Es un virus filamentoso (**foto 1**) que posee el genoma de mayor tamaño entre los virus de plantas, lo que sugiere que debe necesitar muchas proteínas diferentes para interaccionar con sus huéspedes y vectores y poder completar adecuadamente su ciclo biológico. Por otra parte, en condiciones naturales CTV solo infecta células del floema de algunas especies de cítricos (esencialmente de los géneros *Citrus* y *Fortu-*



nella). Un nicho ecológico tan reducido sugiere una adaptación especial a los cítricos, probablemente como resultado de una co-evolución de virus y huésped que tendería a minimizar los daños del parasitismo. De hecho, la mayoría de las cepas de CTV son asintomáticas o provocan síntomas moderados en la mayoría de las especies de cítricos cuando éstas se cultivan como plantas francas. Es probable que CTV apareciera en la zona de origen de los cítricos (áreas del sureste asiático y del archipiélago malayo) y allí se adaptase a las distintas especies nativas. El interés botánico y comercial por los cítricos y la mejora de los transportes marítimos en el siglo XIX permitió el movimiento de plantas completas de cítricos (y con ellas del virus) a otras zonas del planeta. En ellas, CTV se encontró con un nuevo tipo de huésped (plantas de naranjo, mandarino o pomelo propagadas sobre patrón naranjo amargo) al que no estaba adaptado. El resultado de este encuentro fue desastroso, ya que la intolerancia del patrón naranjo amargo al virus dio lugar a sucesivas epidemias de decaimiento y muerte de árboles (lo que conocemos como enfermedad de la tristeza) que aún continúan en distintos países y que globalmente han causado la pérdida de más de 100 millones de árboles sobre este patrón, de los que al menos la mitad corresponden a la citricultura española.

## Enfermedades causadas por el virus de la tristeza

La más conocida de las enfermedades causadas por CTV, especialmente en los países mediterráneos, es la tristeza. Esta enfermedad consiste en el decaimiento progresivo y muerte de árboles propagados sobre patrón naranjo amargo (**foto 2**), que afecta a la mayoría de las especies cultivadas, excepto a los limoneros. Se trata por tanto de una enfermedad de combinación que se desencadena por la intolerancia del patrón naranjo amargo al virus. CTV apenas se multiplica en plantas de semilla de naranjo amargo (ni de limonero), mientras que en plantas de otras especies (naranjo dulce, mandarino, lima, etc.) se acumula a altos niveles. Cuando éstas especies están propagadas sobre patrón naranjo amargo la llegada del virus acumulado en la copa a la línea de injerto da lugar a la muerte de los tubos

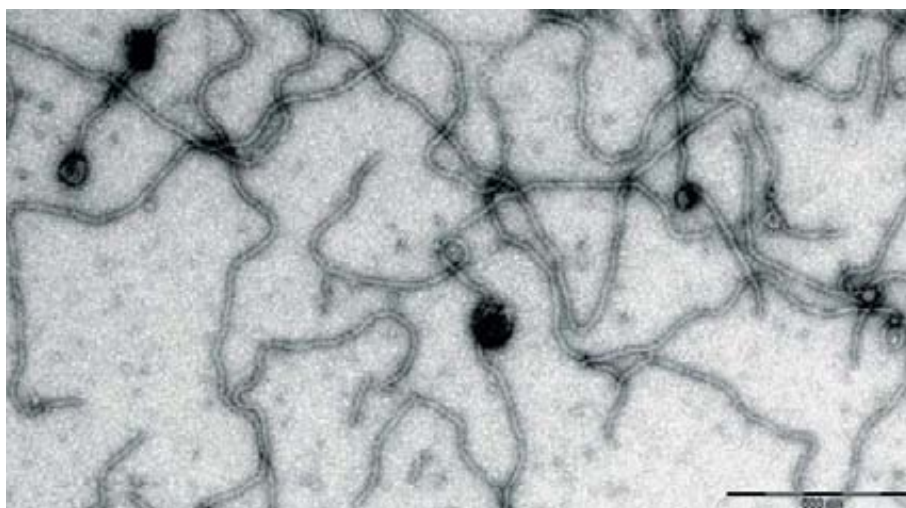


Foto 1. Partículas filamentosas del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) observadas al microscopio electrónico (8.900 aumentos) en savia de naranjo dulce. La barra al pie de la foto representa una longitud de 0,0005 milímetros



Foto 2. Decaimiento por tristeza de un naranjo Valencia sobre patrón naranjo amargo en el plazo de dos años. El árbol de la derecha en ambas fotos no está afectado por la enfermedad.

**El uso de naranjo amargo como patrón debe quedar restringido a la propagación de limoneros por ser la única combinación que no resulta dañada por CTV. La propagación de naranjos, mandarinos y pomelos debe efectuarse sobre patrones tolerantes como los citrangeros, citrumelos, mandarino Cleopatra, Citrus volkameriana y otros**

cribosos del floema, que son la vía de transporte hacia las raíces de los productos sintetizados en la copa. Ello causa la desnutrición y muerte progresiva del sistema radicular, comenzando por las raicillas, lo que a su vez impide la absorción de agua y sales minerales necesarias para el desarrollo y supervivencia de la copa. En consecuencia, el árbol empieza a mostrar síntomas de falta de agua (defoliación, seca de ramillas y reducción del volumen de la copa) y de elementos minerales (clorosis, brotaciones cortas, hojas pequeñas y coriáceas, fruta pequeña y pálida, etc).

Dependiendo de la proporción de tubos cribosos necrosados, de las condiciones climáticas y de los cuidados recibidos, el proceso de decaimiento puede durar años o dar lugar a un colapso que acaba con la vida del árbol en pocas semanas. Dado que esta enfermedad depende de la intolerancia a CTV del patrón naranjo amargo, sus efectos pue-



Foto 3. Síndrome de amarillo (*seedling yellows*): enanismo, clorosis y hoja pequeña en planta de semilla de naranjo amargo inoculada con una cepa virulenta del virus de la tristeza (izquierda) en comparación con una planta similar no inoculada (derecha).



Foto 4. Síndrome de acanaladuras en la madera (izquierda) y fruta pequeña (derecha) inducido por una cepa virulenta del virus de la tristeza en pomelo Star Ruby.

den evitarse utilizando otros patrones tolerantes al decaimiento.

### Amarilleo de las plantas de semilla

Algunas cepas de CTV causan otra enfermedad, que generalmente no se observa en el campo y que afecta a las plantas de semilla de naranjo amargo, limonero o pomelo cultivadas en condiciones de invernadero. Esta enfermedad conocida en inglés como *seedling yellows* (amarilleo de las plantas de semilla) hace que las plantas afectadas muestren enanismo, amarilleo y hojas pequeñas (foto 3) y frecuentemente detención total del crecimiento. Las cepas de CTV que inducen el síndrome de amarilleo probablemente tienen mayor capacidad para inducir el decaimiento por tristeza.

### Síndrome de acanaladuras en la madera

Finalmente, algunas cepas de CTV pueden causar en distintas variedades de cítricos otra enfermedad que consiste en acanaladuras en la madera, enanismo, cosecha reducida y producción de fruta pequeña y de mala calidad (foto 4), con independencia del patrón utilizado. Aunque menos espectacular que el decaimiento por tristeza, el síndrome de las acanaladuras en la madera da lugar a un debilitamiento progresivo de las plantas y a una merma crónica en la producción y calidad de la fruta que con el tiempo pueden resultar tan costosas como el decaimiento e impedir el cultivo rentable de ciertas variedades en algunas zonas. La sensibilidad a las acanaladuras es muy variable entre especies y variedades.

Mientras las limas ácidas son muy sensibles y muestran síntomas con la mayoría de cepas de CTV, los mandarinos son muy tolerantes y rara vez muestran síntomas, y los pomelos y naranjos dulces muestran una sensibilidad intermedia. Entre los pomelos, los rojos suelen ser más sensibles que los blancos, y entre los naranjos dulces, el naranjo Pera de Brasil o el Berna en España son más sensibles que los Valencia o Navel. Por el momento, las cepas de CTV inductoras de acanaladuras en la madera de pomelo o naranjo dulce son frecuentes en áreas de Sudáfrica, Australia, Japón y gran parte de Sudamérica, y raras en la cuenca del Mediterráneo; sin embargo, esta situación es dinámica y puede verse alterada con el tiempo. De hecho, a lo largo de los años se ha notado la aparición e incremento de estas cepas virulentas en distintos países mediterráneos incluyendo España.

## Dispersión del virus e interferencia entre cepas del mismo

El principal vehículo de dispersión de CTV de unos países a otros ha sido el material vegetal infectado: plantas enteras en los primeros movimientos y yemas infectadas cuando se inició la propagación comercial sobre patrones. A nivel más local, varias especies de pulgones han contribuido a esta dispersión con eficiencia variable. *Toxoptera citricida*, la especie más eficiente, ha sido el principal vector en Asia y la mayor parte del Hemisferio Sur, mientras que en Norteamérica y la cuenca del Mediterráneo, donde *Toxoptera citricida* no estaba presente, el principal vector ha sido *Aphis gossypii*, la segunda especie más eficiente en la transmisión. En presencia del primer vector la incidencia de CTV suele pasar del 5 al 95% en un período de dos a cuatro años, mientras que en las zonas donde *Aphis gossypii* es el principal vector este aumento en la incidencia del virus requiere normalmente entre ocho y catorce años. De ahí que la destrucción de la citricultura sobre patrón naranjo amargo en Brasil, Argentina o Venezuela fuese mucho más rápida que en España.

Resulta curioso que el área biogeográfica ocupada tradicionalmente por *Toxoptera citricida* coincide con el área donde las cepas virulentas de CTV capaces de causar el síndrome de acanaladuras en la madera de naranjo dul-

**Citrus macrophylla, crecientemente utilizado en España por su tolerancia a la caliza y la salinidad y por inducir la producción precoz de frutos de buen calibre, es sensible a CTV. Las plantas no muestran los síntomas de decaimiento característicos de la tristeza, pero son sensibles al síndrome de las acanaladuras en la madera**

ce y pomelo son más abundantes. Por otra parte, se conoce desde hace años que las plantas infectadas con CTV contienen con frecuencia cepas del virus genéticamente muy diferentes. Aunque no está demostrado que *Toxoptera citricida* transmita selectivamente las cepas más virulentas de CTV, varios experimentos han puesto de manifiesto que la transmisión de aislados suaves o incluso asintomáticos con este vector da lugar en ocasiones a aislados más virulentos inductores de acanaladuras en la madera en pomelo o naranjo dulce, lo que sugiere la separación de cepas diferentes del virus que estaban mezcladas en el aislado inicial. Con estos antecedentes, la reciente detección de *Toxoptera citricida* en diversos puntos de Portugal y norte de España hace temer que este vector acabe estableciéndose en toda la cuenca mediterránea y permite presagiar:

i) La dispersión acelerada de CTV en países en los que actualmente el virus tiene escasa incidencia.

ii) El incremento en la frecuencia de cepas más virulentas de CTV en países como España en los que el virus está muy extendido y existen múltiples cepas del mismo.

El daño causado por CTV en una región depende de las especies y variedades utilizadas como copa o como patrón y de la virulencia de las cepas predominantes del virus. A su vez, la frecuencia de las distintas cepas depende de su transmisibilidad por pulgones y de su eficacia biológica relativa en cada huésped. Así, mientras que algunas cepas de CTV parecen acumularse con independencia de la presencia de otras cepas en la misma planta huésped, en otros casos se ha observado que la infección con una cepa poco agresiva del virus impide o retrasa la acumulación de cepas más virulentas y por tanto protege al huésped, al menos temporalmente, de los efectos adversos de las cepas virulentas. Este fenómeno, conocido como protección cruzada, se ha utilizado masivamente para cultivar el naranjo Pera en Brasil o el pomelo en Sudáfrica minimizando los daños derivados del síndrome de acanaladuras en la madera. Las reglas básicas que rigen las interacciones entre cepas de CTV y el fenómeno de la protección cruzada son poco conocidas y el estudio de las mismas se considera cada vez más necesario para entender la epidemiología del virus y las posibilidades de control de las cepas más virulentas del mismo.

**IQV, líder mundial en síntesis y formulación de compuestos cúpricos**

Una de nuestras principales actividades desde nuestros orígenes ha sido la síntesis y formulación de productos fitosanitarios basados en sales de cobre.

Actualmente somos el primer productor mundial de Caldo Bordelés y el segundo productor de Oxidocloruro de Cobre.

En IQV apostamos por ofrecer al agricultor una amplia gama de soluciones en protección de cultivos para una agricultura más rentable y sostenible.



[www.iqvagro.com](http://www.iqvagro.com)

## Detección y caracterización de distintas cepas del virus

En campo, los síntomas de decaimiento de plantas propagadas sobre patrón naranjo amargo (**foto 2**) permiten con frecuencia un diagnóstico preliminar de la infección por CTV; sin embargo, síntomas similares pueden ser producidos por causas distintas al virus, y por otra parte, la infección de plantas propagadas sobre un patrón tolerante al decaimiento suele ser asintomática o produce síntomas diferentes, por lo que un diagnóstico fiable de la infección requiere siempre pruebas adicionales.

El diagnóstico tradicional de la infección por CTV se hacía mediante pruebas de infectividad inoculando yemas o trozos de corteza del árbol candidato en plantas indicadoras cultivadas en invernadero en condiciones óptimas para un crecimiento sano y vigoroso de las mismas. Este procedimiento permite en 4-8 meses tener un diagnóstico certero de la infección por CTV, y dependiendo de las especies indicadoras utilizadas en las pruebas, proporciona una información más o menos completa de la virulencia de las cepas de CTV presentes en el árbol analizado. La gama de especies más utilizadas en estas pruebas incluye la lima Mexicana o *Citrus macrophylla* como especies sensibles que muestran clorosis nervial y acanaladuras en la madera con la mayoría de las cepas de CTV (**foto 5**), naranjo amargo que detecta las cepas inductoras de amarilleo (**foto 3**), pomelo Duncan que detecta cepas inductoras de amarilleo o de acanaladuras en la madera de pomelo (**fotos 3 y 4**), y naranjo dulce Pineapple que detecta las cepas inductoras de acanaladuras en la madera de naranjo dulce (**foto 4**).

La larga duración de estas pruebas, su elevado coste debido a la necesidad de un invernadero climatizado y de mano de obra especializada, y la imposibilidad de efectuar los análisis masivos necesarios en prospecciones de campo y estudios epidemiológicos, han hecho que con los años se desarrollasen métodos rápidos de laboratorio para la detección de CTV. El más popular de estos métodos es el llamado ELISA (derivado del nombre inglés de esta técnica *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), en cualquiera de sus múltiples versio-



**Foto 5.** Síntoma de clorosis nervial en hoja de *Citrus macrophylla* inducida por el virus de la tristeza. Este síntoma se ha utilizado para el diagnóstico biológico de la infección.

nes, que consiste en detectar CTV por su reacción con anticuerpos específicos de la proteína de cubierta del virus. ELISA permite el diagnóstico fiable de cientos (e incluso miles) de muestras en 24-48 horas con un coste reducido y ha sido un avance fundamental para los programas de erradicación de CTV desarrollados en algunas zonas y para el conocimiento de la epidemiología de CTV en presencia de *Toxoptera citricida* o de *Aphis gossypii* como vectores predominantes.

Posteriormente se han desarrollado otros procedimientos basados en la detección del ARN genómico de CTV mediante hibridación con sondas moleculares de ARN o ADN complementarios, o mediante métodos de retrotranscripción y amplificación del mismo (conocidos como RT-PCR por las iniciales de su nombre inglés, *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). Estos últimos, que consisten en sintetizar ADN complementario del ARN genómico del virus utilizando fragmentos iniciadores de zonas conocidas del genoma, han alcanzado gran popularidad en los últimos años debido a su elevada sensibilidad (superior a ELISA) y a la posibilidad de estimar la cantidad de virus en distintos tejidos o de discriminar entre algunas cepas de CTV. La amplificación con ciertos iniciadores se ha asociado con la presencia de cepas virulentas en la planta infectada, mientras que la amplificación con otros se asocia con la presencia de cepas no virulentas, lo que permite una carac-

terización preliminar de las características patogénicas previsibles para aislados desconocidos de CTV. Sin embargo, no es raro encontrar excepciones a estas asociaciones, por lo que actualmente el único método infalible para caracterizar la virulencia de nuevos aislados de CTV es el ensayo en plantas indicadoras de distintas especies.

## Control de los daños causados por el virus

Teniendo en cuenta que la dispersión de CTV a nuevas regiones ocurre por el movimiento incontrolado de yemas infectadas, la medida de control más efectiva en zonas aún no afectadas por el virus es evitar la introducción del mismo respetando las normas de cuarentena y propagar únicamente yemas certificadas libres de CTV. Los programas de cuarentena tienen sentido incluso para países donde CTV está presente, como es el caso de España y otros países mediterráneos, ya que mientras las cepas predominantes en estos países generalmente no dan síntomas en naranjos y pomelos propagados sobre patrones tolerantes al decaimiento por tristeza (por ejemplo, citranges o mandarina Cleopatra), las cepas comunes en otras zonas del mundo causan enanismo, acanaladuras en la madera y mermas de producción y calidad de la fruta en estas mismas especies. Cualquiera

variedad interesante para la citricultura local puede ser introducida sin riesgo a través de la Estación Nacional de Cuarentena de Cítricos para ser posteriormente distribuida a los agricultores a través de los viveros autorizados siguiendo el programa de certificación de yemas y plantas.

En zonas aisladas con incidencia de CTV muy baja es posible intentar la erradicación del virus, o al menos retrasar su dispersión, mediante la prospección de árboles infectados y la supresión inmediata de los mismos. Las técnicas de diagnóstico rápido y masivo como ELISA son esenciales para estos programas, que además requieren:

- i) Mantener las prospecciones de forma sostenida e intensa durante muchos años.
- ii) Disponer de un sistema de certificación obligatorio para que las nuevas plantaciones y replantaciones se efectúen con plantas sanas.
- iii) La formación y colaboración de los citricultores de la zona.

iv) Una normativa adecuada que permita el arranque obligatorio e inmediato de los árboles infectados que se detecten.

Aunque el control de las poblaciones de pulgones en las plantaciones de cítricos es necesario por diversas razones, distintos experimentos han demostrado que este control no reduce de forma significativa la dispersión de CTV, ya que se trata de una transmisión no persistente en la que el virus permanece en el vector menos de 24 horas y la inoculación de nuevas plantas ocurre en un tiempo muy breve (antes de que los insecticidas sistémicos hagan su efecto letal sobre el pulgón).

En países como España donde CTV está muy extendido y resultaría imposible la erradicación, hay que convivir con el virus evitando al máximo los daños que puede causar. En este sentido, el uso de naranjo amargo como patrón debe quedar restringido a la propagación de limoneros por ser la única combinación que no resulta dañada por CTV. La propagación de naranjos, mandarinos, pomelos y otras especies debe efectuarse sobre patrones tolerantes al decaimiento por tristeza como los citranges, citrumelos, mandarino Cleopatra, *Citrus volkameriana* y otros. En este sentido hay que recordar que *Citrus macrophylla*, un patrón crecientemente utilizado en España en los últimos años por su tolerancia a la caliza y la salinidad y por inducir la

producción precoz de frutos de buen calibre, es sensible a CTV. Aunque las plantas propagadas sobre este patrón no muestran los síntomas de decaimiento característicos de la tristeza, *Citrus macrophylla* es sensible al síndrome de las acanaladuras en la madera (de hecho se utiliza con frecuencia como planta indicadora de CTV) y algunas cepas del virus le producen un enanismo acusado que limita el crecimiento de la copa e induce la producción de frutos pequeños no aptos para el comercio, especialmente si la planta se infecta en los dos o tres primeros años después de la plantación. Esta sensibilidad, que se ha observado incluso con cepas españolas de CTV, puede limitar en algunos casos la vida comercial de los árboles a diez o doce años, lo que debería ser tenido en cuenta al planificar las plantaciones sobre este patrón.

En relación con los daños causados por CTV, la situación de la citricultura española sería sostenible en las condiciones actuales, ya que las nuevas plantas propagadas por los viveros autorizados están libres de virus, más del 90% de las plantas de campo están injertadas sobre patrones tolerantes al decaimiento por tristeza, y las cepas predominantes de CTV son poco virulentas y no afectan a las variedades cultivadas de naranjo dulce, mandarino o pomelo. Sin embargo, nada garantiza que esta situación se mantenga estable en el futuro y no aparezcan o aumenten su frecuencia cepas más virulentas de CTV similares a las que en otros países inducen pérdidas importantes por el síndrome de acanaladuras en la madera. Un cambio de situación podría verse favorecido por introducciones clandestinas de material vegetal de otros países, que son más frecuentes de lo deseable, por la acción vectora de *Toxoptera citricida*, si esta especie de pulgón acaba extendiéndose a las principales zonas cítricas, o simplemente por una evolución natural de las poblaciones de CTV debida a la mayor eficacia biológica de cepas virulentas presentes en nuestros cítricos, aunque actualmente minoritarias. En una situación en la que las cepas más virulentas de CTV se hicieran frecuentes habría que considerar distintas posibilidades para evitar los daños del síndrome de acanaladuras en la madera, tales como:

- 1) Evitar la propagación de estas cepas en los viveros. Actualmente las plantas de los viveros autorizados están libres de CTV y otros

patógenos, pero en una situación de tristeza endémica podría hacerse imposible mantener este requisito sanitario. En este caso habría que certificar al menos que las plantas están libres de cepas de CTV inductoras de acanaladuras en la madera de naranjo dulce y pomelo. Esto requeriría disponer de métodos rápidos y fiables para asegurarse de que las plantas de donde se toman las yemas sólo contienen cepas no virulentas de CTV.

2) Utilizar la protección cruzada con cepas asintomáticas de CTV con capacidad protectora frente a las cepas más virulentas, tal y como se viene haciendo en Brasil o Sudáfrica. Esto requeriría ensayos previos de campo con cepas locales del virus, apoyados con métodos apropiados de laboratorio e invernadero para controlar a lo largo del tiempo las cepas predominantes en las plantas protegidas.

3) Desarrollar plantas resistentes a CTV mediante transformación genética u otras aproximaciones biotecnológicas que puedan desarrollarse en el futuro.

Cualquiera de estas posibilidades requerirá mejorar nuestra comprensión de las interacciones entre cepas del virus y entre éstas y sus huéspedes cítricos, que actualmente es muy limitada. Sólo un conocimiento profundo de estas interacciones permitirá una manipulación adecuada de las mismas para reducir los efectos negativos del virus sobre la producción. En este sentido hay que señalar que el IVIA viene desarrollando desde hace años investigaciones sobre la biología molecular de CTV, el desarrollo de métodos rápidos y fiables de caracterización de las cepas del virus y la obtención de plantas transgénicas resistentes a CTV con resultados pioneros en el mundo. ●

## Bibliografía ▼

- BAR-JOSEPH, M., DAWSON, W. O. 2008. Citrus tristeza virus. In Encyclopedia of Virology, eds. Mahy, B. W. J. and M. H. V. Van Regenmortel, 520-525. (Oxford: Elsevier).
- DURAN-VILA N., MORENO P. (Editores) 2000. Enfermedades de los cítricos. Ediciones Mundi-Prensa (ISBN 84-7114-862-5), Madrid .165 pp.
- GARNSEY, S. M., GOTTWALD, T. R., YOKOMI, R. K. 1998. Control strategies for Citrus tristeza virus. In Plant virus disease control, eds. Hadidi, A., R. K. Khetarpal, and H. Koganezawa, 639-658. (St Paul, Mn: APS Press).
- MORENO, P., AMBRÓS, S., ALBIACH-MARTÍ, M. R., GUERRER, J., PEÑA, L. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Molecular Plant Pathology 9: 251-268