

Lucha contra la "tristeza" de los cítricos: avances y perspectivas (y II)

Actuaciones de la Consellería de Agricultura de la Comunidad Valenciana para erradicar esta enfermedad

Publicamos la segunda y última parte de este artículo, que se inicia con los avances existentes en el diagnóstico del CTV y su repercusión en la lucha contra la tristeza, y finaliza con las perspectivas de futuro para el control efectivo de esta grave enfermedad de los cítricos.

Mariano Cambra Álvarez. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA).

Siguiendo con los métodos de detección del virus de la tristeza, a continuación, detallamos los avances en el diagnóstico del CTV y su repercusión en la lucha contra la tristeza.

A pesar de su gran sensibilidad y fiabilidad, la técnica ELISA clásica posee el inconveniente de precisar un laboratorio y técnicos especializados para su realización. Además, la necesaria preparación de extractos complica su aplicación en el caso de plantas leñosas y reduce a unas 300 el número de muestras que puede realizar diariamente un equipo de dos personas. El desarrollo de la técnica de inmunopresión-ELISA y su disponibilidad comercial mediante acuerdo IVIA-Plant Print Diagnostics, S.L., ha permitido resolver de forma definitiva los problemas del diagnóstico del virus de la tristeza. El método es muy sencillo, ya que no precisa realizar extractos. Las muestras recolectadas en campo o invernadero son seccionadas con un elemento cortante y presionadas directamente sobre una membrana de nitrocelulosa. La huella o impronta que dejan los pedicelos de hojas o los tallos, permiten la detección del

virus de forma muy sensible, rápida (3 horas) y sencilla a personal no especializado y en condiciones de campo. Desde 1994 los viveristas han realizado más de 500.000 análisis de plantas en sus propias instalaciones, independientemente de los controles oficiales de la producción viverística.

La aplicación por parte de los viveristas de la técnica de inmunopresión-ELISA ha permitido mantener la exigencia de la Administración de producir plantas de vivero libres de CTV. Un equipo de dos personas es capaz de recolectar, imprimir y analizar 1.250 plantas por día, con un coste aproximado de 38 pesetas/planta.

Además, se han puesto a punto métodos moleculares para detección del CTV en España. Destacan diferentes variantes de PCR con inmunocaptura previa o sin ella y sin necesidad de realizar extractos (impresión captura-PCR), método patentado por el IVIA. Recientemente, se ha descrito un método de nested-PCR en un solo tubo cerrado que aumenta espectacularmente la sensibilidad y reduce drásticamente los riesgos de contaminación.

Los métodos serológicos y moleculares son igualmente fiables y sensibles para la detección rutinaria del virus en material vegetal. La detección del virus en pulgones individuales se ha logrado mediante la variante de "escachado captura-PCR" y su aplicación está permitiendo avanzar en el conocimiento de las relaciones virus-vector.

Las repercusiones de los nuevos métodos de diagnóstico en la lucha y control de la tristeza son muy claras. Especialmente, la disponibilidad de un estuche comercial de inmunopresión-ELISA permite mantener la producción de plantas sin CTV en zonas endémicas de la enfermedad, la realización de numerosos controles y la emisión de certificados individuales, si fuera necesario emitir-



El problema de la tristeza está resuelto en las nuevas plantaciones si no se introducen razas del virus más agresivas. Más de 95 millones de plantas certificadas "libres de virus" e injertadas sobre patrones tolerantes a tristeza, han ido sustituyendo a la citricultura clásica basada en el uso del patrón naranjo amargo.



La aplicación de la técnica de inmunopresión-ELISA facilita la producción de plantas libres de CTV en los viveros españoles sujetos a un programa de certificación, en los que se producen anualmente unos 7 millones de plantas.

los, para exportar plántones producidos en nuestro país. Además, ha hecho posible realizar prospecciones a menor coste económico y de una forma más simple.

Perspectivas futuras

El impacto económico del CTV en la citricultura española ha sido de gran importancia. Más de 40 millones de árboles injertados sobre naranjo amargo han declinado lenta o rápidamente, y han sido arrancados. Asimismo, se estima que unos 9 millones de árboles injertados sobre amargo serán substituidos en los próximos años en la Comunidad Valenciana.

En un futuro próximo, el 100% de los árboles de extensas zonas como la Comunidad Valenciana, estarán infectados por CTV, pero, afortunadamente, la práctica totalidad de los cítricos en ese periodo serán de variedades seleccionadas y libres de virus e injertadas sobre patrones tolerantes a la tristeza, por lo que no mostrarán síntomas de la enfermedad.

El drástico cambio inducido por la tristeza en la citricultura española ha sido positivo. Una amplia gama de variedades locales y extranjeras están disponibles para los agricultores en viveros modélicos. El agricultor puede adquirir la variedad más apropiada a las características de su huerto y a la demanda del mercado. Los árboles libres de patógenos e injertados sobre patrones tolerantes a tristeza son más productivos y con mayor calidad de fruta.

El cambio de una citricultura tradicional a

una moderna ya se ha producido, a pesar del problema de la tristeza. Ello ha sido posible por el esfuerzo y tecnología aplicados por los distintos organismos públicos implicados, incluyendo las recomendaciones realizadas a los agricultores y las ayudas para la reconversión, y gracias a la activa colaboración del sector vitiverístico.

La política oficial de protección continúa estando basada en la exclusiva producción de plantas libres de patógenos transmitidos por injerto, incluido el CTV (a pesar de que esas plantas se infectarán en campo en poco tiempo). La no tolerancia de tristeza en las plantas de vivero asegura el uso de patrones muy sensibles, como *Citrus macrophylla*, y que ninguna raza del CTV se dispersará desde los viveros, incluyendo aislados agresivos o severos que pudieran introducirse en Espa-

ña. Estos objetivos se logran y se mantendrán en el futuro por el uso simultáneo de túneles con malla antipulgón para el cultivo de las plantas madre en vivero, y por el cuidadoso y sistemático análisis de dichas plantas madre mediante inmunopresión-ELISA, además del control oficial que se efectúa.

El problema de la tristeza en España está resuelto si no se introducen aislados mucho más agresivos. No obstante, se debe mantener la actividad investigadora para continuar estudiando las epidemias del virus y evaluar los riesgos de nuevos aislados del mismo, que pudieran ser transmitidos el día en que el pulgón pardo de los cítricos (*Toxoptera citricida*) se instaure en nuestro país. La presencia del mismo en las islas portuguesas de Madeira aumenta el riesgo accidental de su introducción. ■

BIBLIOGRAFÍA

Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F., Loebenstein, G., 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69, 190-194.

Cambra, M., Camarasa, E., Gorris, M.T., Román, M.P., 1994. Distribución actual de la tristeza de los cítricos y nuevos métodos de diagnóstico. *Phytoma* 72, 150-158.

Cambra, M., Gorris, M.T., Camarasa, E., Román, M.P., Narváez, G.,

CEN FERTILIZANTE CIENTÍFICO produce más vitaminas A y C y LICOPENO

«BERLIN EXPORT», a la cabeza de la alta tecnología con sus abonos CEN conocidos internacionalmente por sus excelentes resultados: **nutrición equilibrada, uniformidad y peso específico**, así como una óptima calidad según exigen los mercados internacionales, **ha conseguido aumentar considerablemente las vitaminas A y C** en frutas y hortalizas y el **LICOPENO** (anticancerígeno) en tomate.



CEN-20, especial para engorde de cítricos.

LOS ANÁLISIS COMPARATIVOS DEMUESTRAN:

- Aumento de vitamina A: Hasta un 100%.
- Aumento de vitamina C: Hasta un 25%. Cítricos: 100%.
- Aumento del LICOPENO en tomate: Hasta un 80%.
- Aumento del RESVESTROL en vino: 18%.

CEN es un fertilizante inteligente programado para que la planta tome en cada momento justo lo que necesita. Su acción en cultivos marca importantes diferencias respecto de los productos orgánicos tradicionales.

MÁS VENTAJAS PARA SUS CULTIVOS:

- Hasta un 20% de aumento en la producción.
- Mayor cuajado en flor.
- Mayor calidad y mejor conservación de los frutos.
- Color más intenso y mayor contenido de azúcar.
- Mayor resistencia a la sequía, frío y enfermedades.
- Mejora del suelo en N.P.K. y M.O.
- Mayor uniformidad de frutos y calidad constante de exportación.

BIOAGA

Apartado 404 - 31.500 Tudela (NAVARRA)
Telf.: 948 82 20 00 - Fax: 948 82 84 37

Empresa ganadora de **DOS ESTRELLAS INTERNACIONALES DE ORO**:
Una a la **TECNOLOGÍA** y otra a la **CALIDAD**;
TROFEO al PRESTIGIO COMERCIAL.

Más de 1.000 millones anuales para el programa de saneamiento de huertos afectados de tristeza

LA CONSELLERÍA DE AGRICULTURA, DECIDIDA A ERRADICAR EL VIRUS DE LA TRISTEZA

La Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación (CAPA) de la Comunidad Valenciana ha emprendido, desde hace unos años, un programa de saneamiento de las plantaciones de cítricos afectadas de tristeza, para lo cual, anualmente, convoca unas ayudas para paliar en parte el coste de las operaciones de saneamiento. Hasta la fecha, cerca de 15.000 hectáreas de cítricos han sido arrancadas, por estar injertadas sobre pie amargo, y sustituidas por variedades sobre patrón tolerante a la enfermedad. El programa de saneamiento ha alcanzado un nivel de ayudas que, en estos momentos, supera los 4.000 millones de pesetas.

El plan de saneamiento

El plan de la CAPA se basa en fomentar la utilización de plantas con portainjertos adecuados que las hagan tolerantes a la enfermedad, tal y como viene realizándose desde hace dos décadas. Sin embargo, existen aún muchas plantaciones con pie amargo, sensibles a "tristeza", y que actualmente están afectando gravemente la mayoría de las comarcas citrícolas, especialmente aquéllas en las que las plantaciones adultas, de más de 20-25 años, están en su totalidad injertadas sobre pie amargo, como ocurre en La Plana, L'Horta, La Ribera, etc.

Ante la importancia que representa dicha enfermedad, y en base a la experiencia en la tramitación de estas ayudas, la CAPA pretende mejorar la gestión del programa de saneamiento citrícola incentivando el arranque de las plantaciones afectadas y su nueva plantación con patrones tolerantes.

Tipo de saneamiento

Se establecen ayudas públicas para los titulares de explotaciones citrícolas implantadas con portainjerto amargo y afectadas por el virus, y que realicen la sustitución de la plantación mediante alguna de las siguientes acciones:

- Arranque del arbolado y nueva plantación con plántones injertados sobre pie tolerante al virus.
- Doblado en la misma línea con plántones tolerantes, injertados o no.

• **Marcos de plantación.** La norma de la Consellería establece en ambos casos que los marcos de plantación se ajustarán de forma que la distancia entre líneas de la nueva plantación sean, como mínimo, las siguientes:

| | |
|------------------------------|---------------------------------------|
| - Mandarinos en general | 5 metros |
| - Id. de desarrollo limitado | 4 metros (Clausellina, Marisol, etc.) |
| - Naranjos | 5,5 metros |
| - Limoneros y pomelos | 6 metros |

En la separación de líneas anterior, se admitirá una desviación de hasta el 10%, siempre que la mecanización de las diversas operaciones de cultivo y recolección sean factibles, y para ajustarse a las dimensiones de la parcela.

En el caso de **doblado**, éste se realizará en las mismas líneas de la plantación existente, y sólo se aceptará en el caso de que la separación de dichas líneas permitan la mecanización de las labores.

Cuántía de las ayudas

El solicitante podrá elegir una de las siguientes opciones:

1. **Subvención para arranque y replantación.** Hasta **325.000 pesetas por hectárea**, siempre que se planten al menos 500 plantas por hectárea. Si se plantan menos, la subvención máxima será el resultado de multiplicar el número de plantas puestas por **650 pesetas**.

2. **Subvención para doblado de la plantación.** El importe máximo será de **100.000 pesetas por hectárea**, cuando se planten al menos 500 plantas por hectárea. Si se plantan menos, la subvención máxima será el resultado de multiplicar el número de plantas puestas por **200 pesetas**.

Condiciones y requisitos

La norma establece que para tener derecho a estas ayudas deberán tenerse en cuenta las siguientes condiciones:

- No haber solicitado otra ayuda para la misma inversión.
- El arranque o el doblado, en su caso afectará a la totalidad de cada parcela a sanear, no subvencionándose en consecuencia partes de la parcela o plantas aisladas.
- Las plantas y las yemas deberán proceder de viveros autorizados.

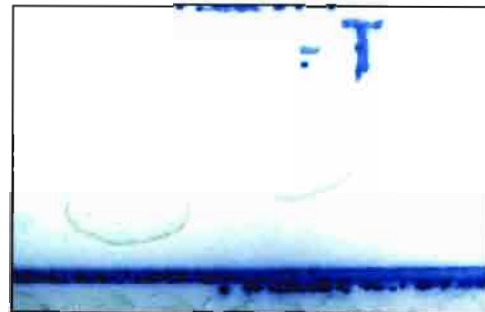


Foto arriba. Se ha diseñado un estuche de diagnóstico de CTV que permite su uso a personal no especializado. En el mismo se incluyen todos los reactivos necesarios, comprendido controles negativos preimpresos en las membranas.

Foto abajo. Aspecto de los controles positivos tras ser revelada la membrana de inmunopresión-ELISA. Las manchas púrpuro-azuladas aparecen en la zona floemática de la sección del tallo (imagen ampliada 6 veces).

Terrada, M.E., Martínez, M.C., 1999. Inmunopresión-ELISA: Método ideal para detección del virus de la tristeza de los cítricos. *Comunitat Valenciana Agraria* 13, 4-14.

Cambra, M., Moreno, P., Navarro, L., 1979. Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-sandwich. *Ann. INIA, Ser. Prot. Veg.* 12, 115-125.

Cambra, M., Serra, J., Bonet, J.C., Villalba, D., 1990a. Situación de la tristeza de los cítricos en la Comunidad Valenciana. 32 pp. Generalitat Valenciana, Conselleria d'Agricultura i Pesca. Serie Fullets Divulgació nº 3-90, Valencia.

Garnsey, S.M., Cambra, M., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In: Roistacher, C.N. (Ed), *Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis*. FAO, Rome, pp. 193-216.

Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M., Henderson, C.T., 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In: P. Moreno, J. Da Graça and L.W. Timmer (Eds), *Proc. 12th. Inter. Conf. Organ. Citrus Virol., IOCV, Riverside*, pp. 39-50.

Gottwald, T.R., Cambra, M., Moreno, P., Camarasa, E., Piquer, J., 1996. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in Eastern Spain. *Phytopathology* 86, 45-55.

Navarro, L., 1976. The Citrus Variety Improvement Program in Spain. In: S. Calavan (Ed), *Proc. 7th. Inter. Conf. Organ. Citrus Virol., IOCV, Riverside*, pp. 198-203.

Navarro, L., Juárez, J., Pina, J.A., Ballester, J.F., 1984. The Citrus Quarantine Station in Spain. In: S.M. Garnsey, L.W. Timmer and J.A. Dodds (Eds), *Proc. 9th. Conf. Inter. Organ. Citrus Virol., IOCV, Riverside*, pp.365-370.

Navarro, L., Roistacher, C.N., Murashige, T., 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100, 471-479.

Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T., Terrada, E., 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Res.* 27, 1564-1565.

Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Perez de San Román, C., Sanz, A., 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *J. Gen. Virol.* 67, 91-96.