



AgEcon SEARCH
RESEARCH IN AGRICULTURAL & APPLIED ECONOMICS

The World's Largest Open Access Agricultural & Applied Economics Digital Library

This document is discoverable and free to researchers across the globe due to the work of AgEcon Search.

Help ensure our sustainability.

Give to AgEcon Search

AgEcon Search
<http://ageconsearch.umn.edu>
aesearch@umn.edu

*Papers downloaded from **AgEcon Search** may be used for non-commercial purposes and personal study only. No other use, including posting to another Internet site, is permitted without permission from the copyright owner (not AgEcon Search), or as allowed under the provisions of Fair Use, U.S. Copyright Act, Title 17 U.S.C.*



**CARIBBEAN
FOOD
CROPS SOCIETY**

44

**Forty Fourth
Annual Meeting 2008**

Miami, Florida, USA

**Vol. XLIV – Number 2
Plenary Session and Oral Presentations**

MEETING HOST:

UF UNIVERSITY of
FLORIDA
IFAS

El Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) en Plantaciones Comerciales y Viveros de la República Dominicana

Luis Matos¹ y Julio Borbón². ¹Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) y ²Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), Santo Domingo, República Dominicana. lmatos@idiaf.org.do

RESUMEN:

El Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) es la principal limitante de la producción cítrica en la República Dominicana. En el período marzo a octubre del 2007 se realizaron muestreos en viveros y plantaciones comerciales para determinar el estatus actual del CTV. Se muestrearon nueve viveros tomando entre 1 y 2% del total de plantas para un total de 700 plantas muestreadas. A nivel de campo se muestrearon 42 plantaciones en 18 provincias del país, tomando 3200 muestras. Se usaron bloques de 400 plantas con una configuración de 20 hileras x 20 plantas, tomando 100 muestras en cada uno. Seis diferentes cultivares fueron muestreados, los cuales fueron, naranjas dulces (cv. 'Valencia' y 'Washington Navel'), limón 'Persa', mandarinas, toronjas y limón 'Criollo' ('Lima Mexicana'). Se utilizó la técnica serológica de impresión directa del tejido (DTBIA) sobre membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm. Se usaron dos tipos de anticuerpos monoclonales, uno de los cuales (MCA-13) reconoce las razas severas y el otro compuesto de la mezcla de dos anticuerpos (3DF1-3CA5), que reconocen todas las razas del CTV. Los análisis indican que siete de los nueve viveros muestreados reaccionaron a ambos anticuerpos, mientras que en las muestras de campo todas fueron positivas a ambos anticuerpos. Estos resultados muestran que el CTV está ampliamente distribuido en las diferentes regiones productoras de cítricos del país. Los resultados de viveros presentan altos niveles de contaminación, indicando que las fuentes de yemas utilizadas por los viveristas están contaminadas. No hubo diferencias en los resultados entre los diferentes anticuerpos utilizados, por lo que las razas severas y no severas están interactuando juntas en la citricultura dominicana.

PALABRAS CLAVES: CTV, anticuerpos monoclonales, análisis serológicos.

The Citrus Tristeza Virus (CTV) in Commercial Orchards and Nurseries in the Dominican Republic

Luis Matos¹ & Julio Borbón² ¹Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), and ²Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), Santo Domingo, Dominican Republic. lmatos@idiaf.org.do

ABSTRACT:

The Citrus Tristeza Virus (CTV) represents the most important disease in Dominican citrus production. From March to September 2007, a survey was carried out to determine the actual status of the CTV. Nine nurseries were sampled taken consisting of 1 or 2 % of

total trees according their size; in total, 700 samples were collected. During the field sampling, 42 orchards were sampled in 18 provinces around the country, with 3200 trees sampled. A plot design of 400 trees (20 rows x 20 trees) was used taking 100 samples from each one. Six different cultivars were sampled: sweet oranges (cv. 'Valencia' and 'Washington Navel'), Persian lime, grapefruit, mandarin and Criollo lime ('Mexican lime'). Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA) using nitrocellulose membranes 0.45 μm was used for serological test. Two types of different monoclonal antibodies were used, one of them (MCA-13) to detect severe strains of the CTV, and a mixture of two antibodies (3DF1-3CA5) for general strains. The nursery surveys showed that seven out of nine were positive to both antibodies, while in the field samples all of them were positive to both antibodies. At the same time the results of the nurseries showed, that budwood used in different nurseries are highly infected with CTV. There were no differences between both antibodies used in these test. These results suggest a relatively homogeneous population of severe and mild strains of CTV dispersed throughout the Dominican Republic.

KEYWORDS: CTV, monoclonal antibodies, serological tests

INTRODUCCION

En la República Dominicana el cultivo de cítricos es uno de los principales rubros frutícolas. Las áreas en producción de los diferentes cultivares de cítricos rondan las 30 mil hectáreas (Prodefrut, 2003), con una producción que supera las 450 mil toneladas métricas por año (*H. Puello, comunicación personal*). De la superficie destinada a la producción de cítricos, más del 50% es cultivada con naranjas dulces (*Citrus sinensis* [L.] Osb.), principalmente de la variedad 'Valencia'. En orden de importancia les siguen el limón Persa (*C. latifolia* Tan.), las mandarinas (*C. reticulata* Blanco), y las toronjas (*C. paradise* Macf.), entre otros.

El sector cítrico nacional, ha tenido grandes dificultades ya que el cultivo es atacado por un gran número de enfermedades, que reducen la producción considerablemente. Los cítricos normalmente son propagados de forma asexual con el uso de injertos, y esta es la principal vía de entrada de patógenos intracelulares cuando los materiales de propagación, que se utilizan, no están libres de enfermedades.

El Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV, por sus siglas en inglés) es una de las principales enfermedades transmitidas por injerto. El CTV, después de haber sido reportado por primera vez en el país por Lee (1990), se ha convertido en la principal limitante en la producción nacional de este rubro motivado principalmente por la presencia del vector *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Hemiptera: Aphididae) (Abud, 1992). La interacción de estos dos eventos produjo una rápida dispersión de las razas suaves del CTV en plantaciones comerciales (Garnsey, 1996). En zonas tradicionales de producción como las provincias de Hato Mayor y Monte Plata y en otros lugares donde se ha usado el patrón de Naranja agria (*C. aurantium* L.), los daños ocasionados por la enfermedad han sido significativos.

Durante la década de los 90's se realizaron en el país monitoreos tendentes a evaluar el desarrollo de la enfermedad con la presencia del vector *T. citricida*. Estos muestreos indicaron una amplia diseminación de un aislamiento suave del CTV, muy similar al existente en Florida. Entre 1996 y 1997 se reportaron dos razas del CTV en

zonas específicas de campos de producción localizados en la provincia de Hato Mayor y una pequeña área de la provincia Monte Plata (Garnsey *et al.*, 2000). Con el objetivo de conocer el estatus del CTV en plantaciones comerciales y viveros en la República Dominicana, fue realizado un muestreo a nivel nacional, en las principales zonas productoras de cítricos del país.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación y Alcance del Estudio:

Para la presente investigación se realizaron muestreos en 18 provincias del país, haciendo mayor énfasis en aquellas donde se concentran las principales plantaciones de cítricos. Además, otras provincias donde no existe un gran desarrollo de este cultivo también fueron muestreadas, entendiéndose que en estas últimas existe un alto potencial de producción. Los análisis de muestras fueron realizados en el laboratorio de Virología del Centro de Tecnologías Agrícolas (CENTA), del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) ubicado en Pantoja, Los Alcarrizos, Provincia de Santo Domingo.

Provincias, Cultivares Muestreados y Número de Muestras:

Las diferentes provincias, cultivares muestreados y el número de muestras colectados a nivel de campo y de viveros se indican en el Cuadro.1.

Cuadro. 1. Provincias, cultivares y número de muestras.

Región/provincia	Cultivares muestreados	No. total de muestras
REGION ESTE		
Hato Mayor	Valencia/Limón Persa/Toronjas/Mandarinas	750
La Altagracia (Higüey)	Mandarinas/Limón Persa	150
El Seybo	Washington Navel	75
San P de Macorís	Limón Persa / W. Navel	100
REGIÓN SUR		
Bahoruco	Limón Criollo	25
Peravia (Baní)	Limón Persa	150
San José de Ocoa	Limón Persa	75
San Juan	Limón Persa	25
San Cristóbal	Valencia/Mandarinas/Limón Persa	250
Azua	Limón Persa	200
REGIÓN CENTRAL		
Santo Domingo	Limón Persa	250
Monte Plata	Valencia/Mandarina/Limón Persa, Toronjas	650
Sánchez Ramírez	Valencia	200
REGIÓN NORTE Y NOROESTE		
Santiago	Limón Persa	90
San Fco. Macorís	Limón Persa	175
La Vega	Limón Persa	110

Monte Cristo	Limón Persa	125
Total muestras de campo		3,200
Muestras de viveros	Valencia, Pineapple, Washington Navel, Limón Persa, Mandarinas	700
Total de muestras		3,900

Muestreos en Viveros:

Los viveros muestreados son representativos de la producción y comercialización de plántulas de cítricos en cada región del país. En los viveros muestreados se seleccionaron el 1% ó 2 % del total de las plantas, de acuerdo al tamaño del vivero los cuales estuvieron en un rango aproximado de 2000 plantas los pequeños y 40,000 los mas grandes, a mayor número de plantas se tomó el 1% y en los viveros pequeños el 2% aproximadamente. En total se muestrearon nueve viveros localizados en las provincias Santo Domingo, San Cristóbal, Monseñor Nouel, y Hato Mayor. El número total de muestras colectadas fue de 700.

Muestreos de Campo:

En plantaciones mayores de 5 ha, las muestras fueron colectadas en bloques de 400 plantas en 20 hileras de 20 plantas. Se tomaron cuatro plantas adyacentes, dos de cada hilera, luego de seis pares de plantas se tomaron cuatro plantas de la misma manera. De esta forma se recolectaron 100 plantas en cada bloque de 400 plantas siguiendo la metodología descrita por (Gottwald *et al.*, 2000 y Hughes *et al.*, 1998). Las muestras consistieron en un brote tierno por planta, y cuando no fue posible obtenerlos se tomó un pedúnculo de frutos nuevos o tiernos por planta. Los cultivares o variedades muestreadas fueron ‘Valencia’, ‘Washington Navel’, limón Persa, mandarinas, toronjas y limón Criollo. Los muestreos fueron realizados desde el mes de marzo a septiembre del 2007.

Procesamiento de las Muestras:

Los brotes tiernos colectados como muestras se les quitaron las hojas dejando solo los tallos, los cuales fueron cortados en los dos extremos y se realizó la impresión de ambos cortes en las membranas de nitrocelulosa. Las membranas de nitrocelulosa fueron cortadas en tamaños de 42 cm² (6 cm x 7 cm) y sub-divididas en 110 cuadrículas de 0.36 cm² (0.8 cm x 0.8 cm). De cada muestra se tomaron impresiones en membranas dobles, una para los análisis de las razas severas con el anticuerpo MCA – 13 y otra para CTV en general con los anticuerpos 3DF1 y el 3CA5. En total se colectaron 3900 muestras en dieciocho provincias del país, donde 3200 corresponden a plantaciones de campo y 700 de viveros.

Análisis de las Muestras:

Los análisis fueron realizados usando la técnica de Impresión Directa del Tejido sobre Membranas de Nitrocelulosa (DTBIA, por sus siglas en Inglés) y conocida también como inmunoimpresión (Garnsey *et al.*, 1994). En este caso se usaron membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm (micrones) (Bio-Rad Corp. Missouri, EE.UU.). Se colocaron 110 muestras por cada membrana de nitrocelulosa de 42 cm² descrita previamente. Para los análisis se usaron dos tipos de anticuerpos monoclonales, el MCA-13 (Nokomis Corp,

Florida, EE.UU.), que solo reconoce las razas severas del CTV (Permar *et al.*, 1990), y otro tipo que reconoce cualquier raza del virus, compuesto por la mezcla de anticuerpos contenidos en un kit comercial (Ingenasa, España). Estos anticuerpos son 3DF1 y el 3CA5 que reconocen cualquier raza del CTV (Vela *et al.*, 1988).

Las membranas de nitrocelulosa que contienen las impresiones de las muestras se colocaron en una placa Petri de 9 cm de diámetro, donde se les adicionó la leche descremada al 2 % por 45 minutos (Sigma Corp., Missouri, EE.UU.) disuelta en un búfer fosfatado salino (PBS por sus siglas en Inglés). Luego se les adicionó el anticuerpo MCA-13 por dos horas, seguido de la adición del antiespecie por una hora, según ha sido descrito por Garnsey *et al.*, 1994. Las muestras fueron leídas después de la adición de Nitro Blue Tetrazolium/ Bromo-Cloro- Indopenil Fosfato (NBT/BCIP, Sigma Corp. Missouri, EE.UU.) en 10 ml de agua destilada. Para facilitar esta reacción, se colocaron las membranas en la oscuridad por cinco minutos y con la ayuda de un estereoscopio se leyeron los resultados tomando como parámetros un testigo positivo y uno negativo colocado al inicio del análisis. Esta coloración desarrollada en las muestras debía coincidir con la del testigo positivo (Garnsey *et al.*, 1994). Para los anticuerpos 3DF1 y 3CA5 que reconocen cualquier raza del CTV, se siguieron las especificaciones del fabricante del kit (Ingenasa, Madrid, España).

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis de muestras de viveros:

Los resultados de los viveros muestreados indican que las fuentes de yemas usadas por la mayoría de los viveristas nacionales están infectadas del CTV. Es preciso señalar, que solo las plántulas procedentes de plantas madres traídas de Martinica en el año 2000 y que son preservadas en túneles anti-insectos no reaccionaron a ninguno de los anticuerpos usados. Borbón *et al.*, (1995) realizaron muestreos en bancos de yemas y de viveros y no reportaron la presencia del CTV en los viveros muestreados. Según los resultados obtenidos en el presente estudio la presencia del CTV en los viveros se ha incrementado en más de un 80% en los últimos diez años. Esta situación de alta contaminación en los materiales de propagación puede considerarse como uno de los principales factores del movimiento y dispersión del CTV en el territorio nacional.

Análisis en muestras de campo:

Los resultados de los análisis serológicos se obtuvieron a partir de los anticuerpos monoclonales MCA-13 y 3DF1 - 3CA5. Todas las muestras colectadas a nivel de campo analizadas con los diferentes anticuerpos fueron positivas al CTV. En ese sentido no hubo diferencias en los resultados obtenidos por anticuerpos utilizados. Es decir, las 1075 plantas muestreadas en la Región Este fueron positivas a la mezcla de anticuerpos 3DF1 y el 3CA5, los cuales reconocen cualquier raza del CTV, mientras que igual número de muestras resultaron positivas al anticuerpo MCA-13 que solo reconoce las razas severas. En la Región Central compuesta de las provincias de Santo Domingo, Monte Plata, Sánchez Ramírez (Cotuí), donde se colectaron 1100 muestras en total, todas fueron positivas a la mezcla de anticuerpos 3DF1 y 3CA5, y además al MCA-13. Igual situación se registró en la Región Sur en las provincias de Peravia, Azua, San Juan de la Maguana, San Cristóbal, Neyba y San José de Ocoa. En total, 675 muestras dieron positivos en ambos análisis serológicos realizados. En la Región Norte y Noroeste donde

se tomaron en conjunto 450 muestras de limón Persa todas fueron positivas a los anticuerpos usados.

La incidencia en áreas tradicionales de producción donde previamente se habían reportados las razas severas del CTV en comparación con las áreas no tradicionales no mostraron diferencias, indicando que tanto los efectos del áfido vector, *T. citricida*, como el uso de material de propagación contaminado pueden ser las principales causas de la dispersión del CTV. En estudios previos, publicados en 1995, Gottwald *et al.*, no reportaron la presencia de razas severas del CTV en cuatro bloques de estudios localizados, dos en Hato Mayor, uno en Bayaguana y otro en Villa Altagracia. No obstante, después de la aparición en 1996 y 97, de los primeros focos con razas que reaccionaron al anticuerpo monoclonal MCA-13, la incidencia fue relativamente baja hasta el año 2000. Por ejemplo, en la sección Sabana Grande, Hato Mayor, la incidencia fue menor al 8% al MCA-13, mientras que en el municipio de Villa Altagracia la incidencia estuvo entre 1 y 4 % (Garnsey *et al.*, 2000). Los niveles de incidencia en ambas plantaciones en este estudio fueron de un 100%. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Gottwald *et al.*, 1995, que indican que la incidencia de la raza suave del CTV, en un período de seis años, alcanzaron más del 90% de incidencia.

Desde el año 1998 no se habían realizado nuevos muestreos del CTV, por lo que, los efectos de este han sido muy notorios en aquellas zonas donde previamente se reportó el virus. En áreas como Hato Mayor un gran número de productores han abandonado la actividad cítrica; igual ha ocurrido en algunas áreas de la provincia de Monte Plata. En este estudio, en total se analizaron 3,900 muestras colectadas en 42 plantaciones y nueve viveros de cítricos localizadas en 18 provincias del país, donde se concentra más del 90% de los cítricos del país. De todas las muestras analizadas solo 180 de las 3,900 muestras no reaccionaron a los anticuerpos usados, lo que representa en términos porcentuales, que el 95.4 % de las plantas están contaminadas, ya sea con la raza severa, con la suave o con ambas.

Todas las muestras de campo fueron positivas a los diferentes anticuerpos utilizados, indicando que la dispersión se ha incrementado considerablemente, si tomamos como referencia los resultados obtenidos por Garnsey *et al.*, (2000), donde se registraron niveles de incidencia entre un 4 y 8 % en diferentes campos de producción. De estos resultados puede inferirse que el *T. citricida* ha sido el principal factor en la dispersión del CTV en el país. Esta inferencia confirma lo expresado por Gottwald *et al.*, (1998), de que el *T. citricida* puede realizar la dispersión del CTV con mayor eficiencia que cualquier otra especie de áfidos. Por ejemplo, en un muestreo inicial realizado en 1992, en un campo de producción de Villa Altagracia en un bloque de 400 plantas (20 hileras x 20 Plantas), 32 de estas plantas resultaron positivas a la razas suaves para una incidencia del 8 %. Este bloque fue muestreado de manera secuencial hasta el año 1998, registrando para ese entonces una incidencia de alrededor 90 %; es decir, 359 de las 400 plantas evaluadas reaccionaron positivamente a las razas suaves.

Los efectos del CTV han sido mayores en plantaciones establecidas sobre el patrón agrio; no obstante, cuando se usan patrones tolerantes la producción de naranjas no es afectada considerablemente. Por otra parte en cultivares como el limón Persa y toronjas los efectos se manifiestan sin importar el patrón utilizado, por lo que la acción del virus en estos cultivares es más notoria que en cualquier otro cultivar. Por su parte las

mandarinas representan uno de los cultivares mas tolerantes al CTV, aún estando injertadas sobre patrones de baja tolerancia al virus, como el *C. macrophylla* Webster.

El Virus de la Tristeza de los Cítricos, (CTV), está distribuido a nivel nacional, basado en los resultados de los análisis serológicos realizados a las muestras colectadas en 18 provincias donde se encuentran los principales viveros y plantaciones de cítricos del país. Los niveles de incidencia y distribución del CTV en la República Dominicana indican una clara necesidad de implementación de un programa de certificación de yemas y semillas de patrones de cítricos que garantice la calidad fitosanitaria de los materiales de propagación. El programa de certificación debe estar sustentado en saneamiento de las variedades comerciales a través del uso de microinjertos de ápices caulinares y una base legal que sustente las regulaciones requeridas para el correcto funcionamiento del programa.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) por aportar parte de los fondos utilizados en esta investigación. Además agradecemos a los citricultores y viveristas nacionales, especialmente al Consorcio Citrícola del Este (CCE), Consorcio Cítricos Dominicanos (CCD) y a la Asociación de Viveristas Dominicanos (AVIDO), por su colaboración.

REFERENCIAS

- Abud, A. J. 1992. Áfido vector de la Tristeza de los Cítricos en República Dominicana. Naturalista Postal. Herbario Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). NP 2/92.
- Borbón, J. C., Matos, L., Garnsey, S M. y Gottwald, T. 1995. Muestreos del Virus de la tristeza de los cítricos en bancos de yemas y viveros de producción en la República Dominicana. *In: Proceeding of the Third International Workshop. Citrus Tristeza Virus and the Brown citrus Aphid in the Caribbean Basin, Management Strategies.* Lake Alfred, Florida. pp 127-132.
- Garnsey S.M., Gottwald, T. R. and Borbón, J. C. 1996. Rapid Dissemination of Mild Isolates of Citrus Tristeza Virus Following introduction of *Toxoptera citricida* in the Dominican Republic. *In: Proceeding of Thirteenth International Organization of Citrus Virologist Conference Riverside California.* pp. 92-103.
- Garnsey S. M, Permar, T. A., Cambra, M. and Herderson C. T. 1994. Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA) for Detection of Citrus Tristeza Virus (CTV). *In: Proceeding of Twelfth IOCV Conference.* Riverside, California. pp. 39- 50.
- Garnsey S. M. Gottwald, T. R., Hilf M E ,Matos, L. and. Borbón, J. C. 2000. Emergence and Spread of Severe Strains of Citrus Tristeza Virus in the Dominican Republic. *In: Proceeding of Fourteenth IOCV Conference.*Riverside, California. pp. 57-68.
- Garnsey S. M., Cambra, M.. 1991. Enzyme – Linked Immunosorbent assays for Citrus Pathogens.p. 193-216, *In: Roistacher, C. Graft-transmissible diseases of citrus. - Handbook for detection and diagnosis of graft-transmissible diseases of citrus.* Food Agriculture Organization, Roma. 286 p.
- Gottwald T. R., Garnsey, S. M. and Borbón, J.. 1998. Increase and Patterns of Spread of Citrus Tristeza Virus Infections in Costa Rica and Dominican the Republic in the

- Presence of the Brown Citrus Aphid, *Toxoptera citricida*. In: The American Phytopathological Society (No. 1998. 0504-01R. Vol.88. No 7: 621-636.
- Gottwald, T.R., and Hughes, G. 2000. A new survey method for citrus Tristeza diseases assessment. In: Proceeding of 14th Conference of IOCV, 77-87. IOCV, Riverside, CA.
- Hughes, G., and Gottwald, T. R. 1998. Survey methods for assessment of citrus tristeza virus incidence when *Toxoptera citricida* is the predominant vector. *Phytopathology* 89: 487-494.
- Lee, R. F. 1990. A survey for virus and virus-like diseases of tropical fruit in the Dominican Republic. Report to Junta Agroempresarial de Consultoría y Coinversiones (JACC), June 3-8, 1990, pp. 7.
- Vela, C., Cambra, M. Sanz, A. and Moreno, P.. 1988. Use of specific monoclonal antibodies for diagnosis of citrus tristeza virus. *In: Proc. 10th Conference International Organization of Citrus Virologist, Riverside. CA. pp. 55-61.*