



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS**  
**AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y**  
**PRODUCTIVIDAD**

**FISIOLOGÍA VEGETAL**

**ANÁLISIS DE SANIDAD Y CALIDAD DE LA PLANTA**  
**EN VIVEROS CITRÍCOLAS**

**MARIA DEL CARMEN PABLO MENDOZA**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2018**

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe María del Carmen Pablo Mendoza, alumno (a) de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realice en esta institución, con la dirección del profesor Dr. Ángel Villegas Monter, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Análisis de sanidad y calidad de la planta en viveros citrícolas y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serian distribuidas entre la institución, el consejero o director de tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Montecillo, Mpio. De Texcoco, Edo. De México, a 21 de Noviembre de 2018.



Firma del alumno(a)



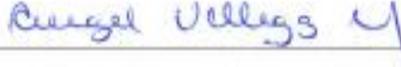
Dr. Ángel Villegas Monter

Vo.Bo. del consejero o director de tesis

La presente tesis titulada “ANÁLISIS DE SANIDAD Y CALIDAD DE LA PLANTA EN VIVEROS CITRÍCOLAS”, realizada por la alumna: **María del Carmen Pablo Mendoza**, con la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO  \_\_\_\_\_

DR. ANGEL VILLEGAS MONTER

ASESOR  \_\_\_\_\_

DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTINEZ

ASESOR  \_\_\_\_\_

DR. ABEL MUÑOZ OROZCO

Montecillo, Texcoco, estado de México, Noviembre de 2018

# ANÁLISIS DE SANIDAD Y CALIDAD DE LA PLANTA EN VIVEROS CITRÍCOLAS

Maria del Carmen Pablo Mendoza, M. C.

Colegio de postgraduados, 2018

## RESUMEN

Los programas de certificación de cítricos de California (USA) y São Paulo (Brasil) han presentado problemas fitosanitarios a lo largo del tiempo; en México han pasado 16 años desde que se implementó el programa de certificación y hasta la fecha no existen reportes de inconsistencias. Sin embargo, en campo es evidente la presencia de enfermedades transmitidas por injerto, por lo que es importante verificar la sanidad de las plantas de cítricos que se propagan en viveros certificados por la NOM-079-SAG/FITO-2017 y no certificados. El objetivo de este estudio fue detectar mediante RT-PCR la presencia de *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus exocortis viroid* - citrus (CEVd-cit) y *Hop stunt viroid*-citrus (HpSVd-cit) en plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osb., *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka, *C. paradisi* Macfad. y *C. clementina* Hort. ex Tan x *C. reticulata* Blanco, provenientes de viveros certificados (VC) y no certificados (VNC). Se utilizaron 10 plantas por especie y ocho viveros (4 VC y 4 VNC). Los porcentajes de muestras positivas en plantas de viveros certificados fueron: para CTV, 0 %, CPsV, 0 %, HpSVd-cit, 18.75 % y CEVd-cit 62.5 %; mientras que para viveros no certificados fueron: CTV 6.25 %, CPsV 0 %, CEVd-cit 93.75 % y HpSVd-cit 100 %.

Otro aspecto evaluado en VC y VNC fue la calidad de planta; las de naranjo Valencia, lima Persa, mandarino Fremont y Pomelo Rio Red injertadas en *C. volkameriana* Ten. & Pasc, provenientes de VC fueron superiores estadísticamente en altura de planta, área foliar, peso de materia fresca y seca de raíz principal y secundarias. Sin embargo, en ambos esquemas de producción se observó el problema denominado comúnmente como “raíz de cochino” en VC 20 % y en VNC 12.5 %

**Palabras clave:** viveros citrícolas, virus, viroides, calidad de planta.

# PLANT'S QUALITY AND HEALTH ANALYSIS AT CITRUS NURSERIES

Maria del Carmen Pablo Mendoza, M. C.

Colegio de postgraduados, 2018

## ABSTRACT

The California (USA) and São Paulo (Brazil) citrus certification programs have presented phytosanitary problems over time; in Mexico, 16 years have passed since the certification program was implemented and to date there have not been any reports of inconsistencies. However, in the field the presence of graft-transmitted diseases is evident, so it is important to verify the citrus plants health, propagated in nurseries certified by NOM-079-SAG / FITO-2017 and in not certified nurseries. The objective of this study was to detect by RT-PCR the presence of *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus exocortis viroid-citrus* (CEVd-cit) and *Hop stunt viroid-citrus* (HpSVd-cit) in *Citrus sinensis* (L.) Osb., *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka, *C. paradisi* Macfad. y *C. clementina* Hort. ex Tan x *C. reticulata* Blanco plants, from certified nurseries (CN) and non certified nurseries (NCN). Ten plants per species and eight nurseries were used (4 CN and 4 NCN). The percentages of positive samples in certified nursery plants were: for CTV 0 %, CPsV 0 %, HpSVd-cit 18.75 % and CEVd-cit 62.5 %; while for non-certified nurseries were: CTV 6.25 %, CPsV 0 %, CEVd-cit 93.75 % and HpSVd-cit 100 %.

Another aspect evaluated in the CN and NCN was the quality of the plant; Valencia Orange, Persian lime, Fremont mandarin and Rio Red grapefruit grafted over *C. volkameriana* Ten. & Pasc, from CV were statistically superior in plant height, leaf area, fresh and dry weight of main and secondary roots. However, in both production schemes problems such as "pig root" are observed in CV 20 % and in NCV 12.5 %.

**Additional keywords: citrus nurseries, virus, viroids, plant quality.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A dios, por brindarme la oportunidad de vivir esta maravillosa experiencia.

Al Colegio de Postgraduados, Programa en Recursos Genéticos y Productividad, Fisiología vegetal, por permitirme formar parte del postgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento brindado.

A mi consejero, el Dr. Angel Villegas Monter, por dedicarme tiempo y brindarme el apoyo para culminar la maestría. Y a todo su equipo de trabajo (Emanuel, David, Judith, Sandra, Rosalba, Doña Ángeles y Don Memo)

A mis asesores, Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez y Dr. Abel Muñoz Orozco, por motivarme y por la paciencia brindada en la realización de esta investigación.

A mi sinodal Dr, Nicacio Cruz Huerta, por la revisión y correcciones realizadas a dicha investigación.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y al Vivero Cazonas, por las facilidades brindadas en el tiempo del experimento.

A mis Amigos y colaboradores Cynthia Guadalupe Rodríguez Quibrera, Candelario Ortega Acosta y Florencio Santiago Luna, por todos los consejos, motivación y apoyo para lograr esta meta.

A Carlos Hernández Guerra, Griselda Contreras Fuentes y Patricia Hernández Cervantes, Cristino Cruz lazo y Isidro Melchor Marroquín por motivarme a seguirme estudiando.

A Edson Jr. Gómez Moran, por su amor, apoyo y paciencia.

A Deysi Yulissa Pablo Luna, por apoyarme en el trabajo de campo.

## **DEDICATORIA**

A todos los que me motivaron para realizar la maestría.

Con amor para mi familia Pablo-Mendoza.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>I.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>6</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>6</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>6</b>
<b>II.REVISION DE LITERATURA</b> .....	<b>7</b>
La citricultura en México.....	7
Programas de certificación.....	7
Programa de certificación de cítricos en California (USA) .....	9
Programa de certificación de cítricos en Valencia (España) .....	13
Programa de certificación de cítricos en São Paulo (Brasil).....	16
Programa de certificación de cítricos en México.....	20
Análisis del esquema de certificación en México.....	23
Ventajas del uso de planta certificada.....	27
Enfermedades virales que afectan a los cítricos .....	27
Tristeza de los cítricos ( <i>Citrus tristeza virus</i> ).....	27
Taxonómica de CTV.....	28
Estructura del Closterovirus.....	28
Organización genómica .....	28
Tristeza de los cítricos en México .....	29
Transmisión.....	30
Síntomas.....	31
Portainjertos tolerantes y susceptibles .....	32
Portainjertos tolerantes a tristeza de los cítricos .....	32
Portainjertos susceptibles a tristeza de los cítricos .....	33
Hipersensible.....	33
Control .....	33

Psorosis ( <i>Citrus psorosis ophiovirus</i> ) .....	34
Taxonomía .....	34
Organización genómica .....	34
Estructura de CPsV .....	35
Transmisión.....	35
CPsV en México .....	36
Síntomas.....	36
Portainjertos tolerantes a psorosis.....	37
Portainjertos susceptibles a psorosis .....	37
Controversia.....	37
Control .....	37
Viroides en cítricos .....	37
Exocortis ( <i>Citrus exocortis viroid-citrus</i> ) .....	38
Exocortis en México .....	38
Síntomas.....	39
Transmisión.....	40
Portainjertos tolerantes a exocortis .....	40
Portainjertos susceptibles a exocortis .....	40
Controversia.....	40
Control .....	41
Cachexia o xiloporosis.....	41
Síntomas.....	42
Transmisión.....	42
Portainjertos tolerantes a cachexia.....	42
Portainjertos susceptibles a cachexia .....	43
Controversia.....	43
Control de cachexia.....	43
Calidad de planta de cítricos .....	43
Altura de la planta.....	44
Número de hojas y área foliar.....	45
Materia fresca y seca de la hoja .....	46

Raíces (principal y secundaria).....	47
<b>Análisis general de la revisión de literatura.....</b>	<b>49</b>
<b>III.MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
Experimento 1. Detección de CTV, CPsV, CEVd-cit y HpSVd-cit en viveros cítricos certificados y no certificados; Veracruz, México .....	51
Área de estudio .....	51
Material biológico.....	51
Extracción de ácidos nucleicos .....	53
Retrotranscripción – Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) .....	54
Electroforesis .....	55
Secuenciación .....	56
Experimento 2. Evaluación de la calidad morfométrica en plantas de cítricos de viveros certificados y no certificados. ....	56
Metodología .....	56
Área de estudio .....	56
Material vegetal .....	56
Diseño experimental y análisis estadístico .....	56
Variables evaluadas .....	57
Altura de planta.....	57
Número de hojas .....	57
Área foliar .....	57
Materia fresca y materia seca de la raíz principal y secundarias .....	57
<b>IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>59</b>
Experimento 1. Detección de CTV, CPsV, CEVd-cit y HpSVd-cit en viveros cítricos certificados y no certificados; Veracruz, México .....	59
Tristeza de los cítricos [ <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)] .....	59
Psorosis [ <i>Citrus psorosis virus</i> (CPsV)] .....	61
Exocortis [ <i>Citrus exocortis viroid-citrus</i> (CEVd-cit)] .....	61
Caquexia [ <i>Hop stunt viroid-citrus</i> (HpSVd-cit)] .....	64
Experimento 2. Evaluación de la calidad morfométrica en plantas de cítricos de viveros certificados y no certificados .....	66

Altura de la planta.....	67
Número de hojas y área foliar.....	68
Peso de raíz principal .....	69
Peso de raíces secundarias .....	70
<b>V.CONCLUSIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Periodo en años que debe cumplir cada Unidad de Producción de material propagativo certificado (UPMPC), para verificar la sanidad del mismo. .... 25
- Cuadro 2. Portainjertos utilizados en la propagación de planta de cítricos en vivero certificados y no certificados..... 52
- Cuadro 3. Resumen de valores de probabilidad asociados a los análisis de la varianza para las variables altura de planta, número de hojas, área foliar, peso de materia fresca y seca de raíz principal, peso de materia fresca y peso de materia seca de raíces secundarias en plantas de cuatro especies de cítricos, provenientes de viveros certificados y no certificados. .... 67
- Cuadro 4. Medias de las variables evaluadas en plantas de naranjo Valencia, lima Persa, mandarino Fremont, pomelo Rio Red injertadas en limón Volkameriano, provenientes de viveros certificados y no certificados. .... 68

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representación gráfica de la organización del genoma de CTV. Se muestran los ORFs con sus respectivos productos proteicos, así como los dominios homólogos de metiltransferasa (MT), proteasa (PRO), helicasa (HEL) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Se indican también los extremos 5' y 3' no traducibles (UTR) (Ruiz, 2009). ..... 29
- Figura 2. Representación esquemática del genoma de CPsV (Martín et al., 2006). ..... 34
- Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para CTV (~273 pb). P: control positivo, 2N: Naranjo Valencia, N: control negativo. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®). ..... 59
- Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR con los iniciadores específicos para CEVd-cit (~370 pb). Cada carril corresponde a una muestra. P: testigo positivo y N: testigo negativo agua. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®).62
- Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR con iniciadores específicos para CEVd-cit (~370 pb). Cada carril corresponde a una muestra. P testigo positivo y N: testigo negativo. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®). ..... 63
- Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR con los iniciadores específicos para HpSVd-cit (~300 pb). P: Control Positivo, 9LP: Lima Persa, 10NV: Naranjo Valencia, 11MF: Mandarino Fremont, y N: control negativo. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®). ..... 64
- Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR con iniciadores específicos para HpSVd-cit (~300 pb). P: control positivo, 1: LP, 2: N, 3: P, 4: M, 5: LP, 6: N, 7: P, 8: M, 9: LP, 10: N, 11: P, 12: M, 13: LP, 14: N, 15: P, 16: M, y N: control negativo. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®). ..... 65
- Figura 8. Raíz de pomelo Rio Red con “cola de cochino” proveniente de vivero certificado (a) y vivero no certificado (b). ..... 71

## I. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son importantes en diversas áreas del mundo y México es de los principales países productores. En 2016, se encontraba en segundo lugar en producción de limas y limones, cuarto en pomelo y quinto en naranjas (Anónimo, 2016a). Las especies del género *Citrus* son afectadas por enfermedades causadas por virus, viroides, bacterias y fitoplasmas; por lo que fue necesario la implementación de programas de saneamiento y certificación, iniciando en California (USA) en 1933, y posteriormente en Texas en 1948, con el propósito de obtener plantas de cítricos “libres de psorosis” (Sleeth, 1959); Florida inició en 1952, debido a que los productores tomaron conciencia de las pérdidas causadas por virus y viroides (Norman, 1959).

En São paulo (Brasil), el programa de certificación se estableció en 1960 para hacer frente a tristeza de los cítricos que afectaba seriamente al naranjo Pera (*Citrus sinensis*), además de la presencia de psorosis, exocortis y caquexia (Rossetti y Salibe, 1961). España lo implementó en 1975 debido a los daños causados por tristeza de los cítricos, debido al uso generalizado de naranjo agrio, muy susceptible cuando se encuentra injertado, además, el material vegetal se encontraba infectado por psorosis, exocortis y caquexia por lo que no podía ser injertado en portainjertos como Carrizo o Troyer (Villalba, 2000).

Los programas de certificación a nivel mundial han presentado problemas de aplicación como lo reportado en 1961 en California (USA), donde se propagaron y establecieron más de 10,000 plantas infectadas con *Citrus tristeza virus* (CTV), las cuales posteriormente se eliminaron (Pratt *et al.*, 1972). En enero de 2006 se identificó en el lote de fundación de Lindcove, California, un árbol positivo a CTV, por indexado biológico en lima mexicana y corroborado por Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA); como medida de precaución suspendieron la distribución de yemas. Mientras se revalidaba la sanidad de las plantas, reanudando actividades de corte de material vegetal en junio del mismo año (Anónimo, 2006). El programa de certificación de São Paulo (Brasil) han mantenido evaluaciones a lo largo del tiempo, en 1991-92 reportaron la presencia de CTV en 297 plantas de origen nacional y extranjeras pertenecientes al banco de germoplasma (Orlando *et al.*, 1993). En 2006, FUNDECITRUS, reporto en São Paulo una planta con cancro en un vivero

protegido, cuya presencia pudo deberse al descuido o introducción de material no autorizado por las normas vigentes (Anónimo, 2010).

En México, el programa de certificación se dio a conocer en 2002, debido a diferentes reportes de *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus exocortis viroid-citrus* (CEVd-cit) y *Hop stunt viroid-citrus* (HpSVd-cit), por lo que fue necesario sanear material vegetal mediante termoterapia y microinjerto (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2002). Estos procesos se realizaron para obtener material vegetal libre de virus y viroides; sin embargo, no se eliminó la producción de planta en viveros no certificados, que hasta la fecha siguen operando.

Dicho programa denominado, “Reconversión citrícola”, tuvo el objetivo de transformar la citricultura mexicana en una citricultura tecnificada, competitiva y eficiente; cumpliendo con parámetros de sanidad y calidad; se adoptaron estrategias que permitieran minimizar el efecto del daño de la tristeza de los cítricos, por lo que se implementó la sustitución de variedades comerciales de fruta sobre portainjertos tolerantes; dentro de los que destacan mandarina cleopatra, Sun Chu Sha, Sunki, Shekwasha; Citrange troyer y carrizo, limón Volkameriano, limón Macrophylla; naranjo trifoliado y lima Rangpur. Con la finalidad de ofrecer al productor planta certificada libre de virus y viroides, para la obtención de elevados rendimientos y calidad de frutos (Varela *et al.*, 2006). Sustentado por normas oficiales mexicanas como la NOM-031-FITO-2000, que estableció la campaña contra el virus tristeza de los cítricos, (SAGARPA, 2001), vigente hasta 2007 (SENASICA, 2014, citado por Rivas-Valencia *et al.*, 2017) y la NOM-079-FITO-2002, con modificaciones en 2018, actualmente NOM-079-SAG/FITO-2017: requisitos fitosanitarios, especificaciones y procedimiento que deben cumplir los establecimientos productores y comercializadores de material propagativo de cítricos libre de plagas reglamentadas, así como aquellos que acopian, empacan y procesan frutos de cítricos para obtener la certificación fitosanitaria, las disposiciones de la presente con aplicación en zonas citrícolas del territorio nacional (SAGARPA, 2018).

El programa de certificación de México inició con seis unidades de Producción de Material Propagativo de Cítricos (UPMPC), en 2008 se registraron 100 UPMPC. Para 2018 se

certificaron 98 UPMPC de las cuales 58 pertenecen a viveros productores de planta certificada, 23 lotes productores de yema, 13 huertas productoras de semilla, tres lotes fundación y un banco de germoplasma (Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria [SENASICA], 2018). Los análisis necesarios para obtener la certificación o recertificación son realizados por laboratorios de diagnóstico fitosanitario aprobados por la Dirección General de Sanidad Vegetal; en 2016, se encontraban vigentes 12 laboratorios acreditados en virología (SENASICA, 2016).

El objetivo principal de los programas de certificación es el saneamiento de material vegetal para obtener plantas libres de patógenos transmisibles por injerto de variedades nativas e introducidas de cualquier parte del mundo con fines de investigación o mejorar las variedades del país (Anónimo, 2016b), sin embargo, Navarro y Juárez (2003) señalaron que ningún método de saneamiento garantiza la eliminación de patógenos en todas las plantas. Por ello es imprescindible aplicar métodos de diagnóstico específicos para comprobar que las plantas resultantes estén realmente sanas; aclaran que el término habitualmente usado como planta “sana”, “libre de virus” o “planta libre de patógenos, son coloquiales, que lo único que puede asegurarse es que la planta está libre de patógenos para los que se han realizado pruebas específicas de diagnóstico con resultados negativos e incluso está condicionada por la fiabilidad de las pruebas diagnósticas utilizadas.

Eiras *et al.* (2013), sugirieron la necesidad de realizar esfuerzos para aumentar y estimular los programas de indexación, mantener plantas con prueba negativa y desarrollar programas sanitarios con la finalidad de reducir la propagación de patógenos y otros agentes transmisibles por injertos.

El estado de Veracruz es el único que cumple con el esquema de certificación completo el cual consta de un banco de germoplasma y un lote fundación, 10 lotes productores de yemas, cinco huertas productoras de semillas y 24 viveros productores de planta certificada) (SENASICA, 2018). A diferencia de otros países donde las UPMPC se encuentran a cargo

de instituciones de gobierno, universidades y/o asociaciones citrícolas, en México son manejadas por empresas particulares.

Han pasado 16 años desde la implementación del programa de certificación de cítricos, en el cual no se han reportado problemas fitosanitarios, como ha sucedido en programas citrícolas de otros países. Sin embargo, en la zona citrícola de Martínez de la Torre, Veracruz, se encuentran más de 400 viveros no certificados (Villegas, 2018<sup>1</sup>, comunicación personal), y aun con base en la NOM-079-FITO-2002, estos viveros no deberían existir debido a que pueden estar propagando material vegetativo infectado, desde 2002 a 2018 no se han realizado acciones legales para la eliminación y erradicación de viveros de cítricos no certificados, poniendo en duda la sanidad del material empleado en huertos citrícolas y no se cuenta con información referente a problemas fitosanitarios en material propagativo, como ha sucedido en otros países.

Lo que no se consideró en el programa de reconversión citrícola, fue cuidar parámetros morfométricos que determinan la supervivencia, desarrollo y producción de la planta. Existen reportes por Davoglio *et al.* (2006), en Cafelândia – São Paulo, donde evaluaron plantas de 4.5 años de haberse establecido en campo, y encontraron que las plantas provenientes de viveros a “cielo abierto” (no certificados) fueron superiores en altura de planta, perímetro de tronco, volumen de copa y diámetro de copa en comparación con plantas que fueron producidas en espacio protegido. Lo cual muestra que aun en esquemas de producción donde se cuida la sanidad y pureza varietal, no se verifican parámetros morfológicos de la planta, que determinan la sobrevivencia y producción en campo.

Siendo que la planta de vivero se considera la base de la citricultura (Alves, 2005), es importante cuidar características fisiológicas y morfológicas que permiten definir la calidad de la planta (Orozco *et al.*, 2010).

---

<sup>1</sup> Dr. Ángel Villegas Monter, Profesor Investigador Titular PRGP-Fruticultura Campus Montecillo Colegio de Postgraduados.

Existen reportes de diagnósticos de calidad de planta en los viveros forestales realizados en: Colima el diagnóstico se llevó a cabo en ocho especies forestales, producidas en cuatro viveros (Orozco *et al.*, 2010), en Michoacán se realizó en viveros forestales de clima templado (Sáenz *et al.*, 2010), en Nayarit en 11 especies arbóreas de climas tropical y templado, en siete viveros forestales (Rueda *et al.*, 2014). De acuerdo, con Orozco *et al.* (2010), “El éxito o fracaso de las plantaciones depende en gran medida de la calidad de planta utilizada. Una planta de calidad es aquella que es capaz de sobrevivir en el terreno con altas tasas de supervivencia y crecimiento inicial”. Sin embargo, no se han realizado evaluaciones de la sanidad y calidad de la planta que se está produciendo en viveros certificados por la NOM-079-SAG/FITO-2017 y no certificados.

## **Objetivo general**

Evaluar la sanidad y calidad de planta de *Citrus sinensis* (L.) Osb., *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka, *C. paradisi* Macfad. y *C. clementina* Hort. ex Tan x *C. reticulata* Blanco, provenientes de viveros certificados (VC) y no certificados (VNC) de la zona de Martínez de la Torre, Veracruz.

## **Objetivos específicos**

- 1) Detectar mediante RT-PCR la presencia de CTV, CPsV, CEVd-cit y HpSVd-cit en plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osb., *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka, *C. paradisi* Macfad. y *C. clementina* Hort. ex Tan x *C. reticulata* Blanco, provenientes de viveros certificados (VC) y no certificados (VNC)
- 2) Evaluar la calidad de planta de naranjo Valencia, lima Persa, Pomelo Rio Red y Mandarino Fremont producida en viveros de cítricos certificados y no certificados de la zona de Martínez de la Torre, Veracruz.

## **Hipótesis**

- 1) En los viveros certificados no existen plantas positivas a CTV, CPsV, CEVd-cit y HpSVd-cit.
- 2) Las plantas que se producen en viveros certificados son superiores en parámetros morfométricos a las de los viveros no certificados.

## II. REVISION DE LITERATURA

### Definición de conceptos

\* *Citrus latifolia* Tanaka. es denominado en diversas áreas citrícolas con nombres comunes: en Brasil se conoce como lima ácida Tahití, en California como limón Bearss, en México como lima Persa o limón Persa y en estadísticas nacionales es denominado limón Persa, para evitar confusión en el presente escrito se empleara el término lima Persa para referirse a este especie.

\* El viroide *Hop stunt viroid-citrus* (HpSVd-cit), es causante de la enfermedad caquexia o también denominada por otros autores Xiloporosis, en el presente usaremos “caquexia” para referirnos a esta enfermedad.

### La citricultura en México

En 2017 las exportaciones de cítricos representaron para México un ingreso de 557,678,929 USD (Anónimo, 2017a). A nivel mundial México ocupó el segundo lugar en producción de limas y limones, cuarto en pomelo y quinto en naranja (Anónimo, 2016a). La producción nacional en 2017 se distribuyó de la siguiente forma: naranja 4,629,758 t, lima Persa 1,237,629 t, lima Mexicana 1,008,659 t, pomelo 438,056 t, mandarina 269,349 t y otros en menor cantidad; En este año Veracruz destaco a nivel nacional como el mayor productor en naranja con 2,331,659 t; en lima Persa 657,349 t; en pomelo 242408 t; en mandarina 133994 t y tangelo 116 838 t (Anónimo, 2017b). Por lo que la economía del estado depende considerablemente de la cadena de producción citrícola.

### Programas de certificación

Debido a la importancia que tiene el cultivo de cítricos en diversas áreas del mundo y a la presencia de enfermedades ocasionadas por virus, viroides, bacterias y fitoplasmas, se inició en California (USA) el primer programa de saneamiento con el propósito de obtener plantas de cítricos “libres de psorosis” implementado por el Dr. H. S. Fawcett de la Estación de

Experimentos de cítricos en Riverside en 1937 (Anónimo, 2016c); posteriormente Texas (USA) en 1948 para la obtención de material libre de psorosis implementado por el Dr. J. M. Wallace (Sleeth, 1959); en Arizona en 1955 el Dr. John B. Carpenter, introdujo plantas nucelares para obtener plantas libres de tristeza (Streets, 1959); en Florida inició en 1952 debido a que los productores tomaron conciencia de las pérdidas causadas por virus y viroides por lo que fue necesario seleccionar plantas madres para realizar saneamiento, encontrando 72 % infectados por caquexia, 40 % exocortis, 6.7 % psorosis y 5.5 % tristeza, lo encontrado reflejó que muchos de los árboles estaban infectados por dos o más virus (Norman, 1959); en São Paulo (Brasil) en 1960 para hacer frente a tristeza de los cítricos que estaba afectando seriamente al naranjo Pera (*C. sinensis*), además de la presencia de psorosis, exocortis y caquexia (Rosetti y Salibe, 1961); en España inicio en 1975, debido a la presencia de tristeza de los cítricos, y al uso generalizado del portainjerto naranjo agrio, por lo no se podía seguir usando como portainjerto; sin embargo, el materia vegetal estaba infectado por psorosis, exocortis y caquexia por lo que no podían injertarlo sobre Carrizo o Troyer (Navarro, 1976 y Villalba, 2000); en México el programa inicio en 2002 y al igual que en la mayoría de los países citrícolas se tenían reportes de tristeza de los cítricos, psorosis, exocortis y caquexia, por lo que fue necesario sanear material vegetal mediante termoterapia y microinjerto (SAGARPA, 2002), cabe señalar que no se reguló la producción de planta en viveros no certificados, que hasta la fecha siguen produciendo y comercializando plantas.

El programa de saneamiento tiene la finalidad de obtener material vegetal libre de patógenos “sano” con alto potencial genético, siendo este el componente clave para mantener la producción, lo cual, solo se logra con un programa de certificación funcional que incluya cuarentena, saneamiento y certificación (Lee, 2008).

El intercambio de material vegetal vegetativo puede conducir a la introducción de nuevas plagas y enfermedades que, en algunos casos puede ser devastador para la industria de cítricos (Navarro *et al.*, 1983). Específicamente en plantas de vivero, la diseminación de enfermedades puede ocurrir por injerto por el uso de yemas infectadas; insectos vectores; patógenos presentes en el sustrato como nemátodos (*Tylenchulus semipenetrans* y

*Pratylenchus jaehn*) y oomycetos (*Phytophthora* spp.); patógenos que requieren exceso de humedad como mancha negra (*Guignardia citricarpa*), todos los anteriores no causan síntomas en vivero, sin embargo el cancro bacteriano (*Xanthosomas* spp.), si es posible que exprese síntomas en etapa de vivero (Bremer *et al.*, 2015). Aunado a lo anterior, la no desinfección de la herramienta de corte constituye un factor de diseminación de enfermedades en esta etapa de la planta.

### **Programa de certificación de cítricos en California (USA)**

El Citrus Clonal Protection Program tiene sus orígenes en 1933 cuando el Dr. H. S. Fawcett, investigador de la Estación de Experimentos de cítricos en Riverside, descubrió el virus causante de psorosis en cítricos. Este descubrimiento desencadenó en 1937 el establecimiento por el Departamento de Agricultura de California, el programa libre de psorosis, debido a que el único método de propagación de esta enfermedad es por transmisión de yemas, injertos de raíces u ocasionalmente por semillas y no hay vectores de la enfermedad; se inició un programa opcional de registro de árboles, registrándose 2023 árboles, cabe señalar que para 1957, disminuyó a 182 árboles, siendo insuficientes para la propagación, por lo que reconocieron que el programa de registro de psorosis no era eficiente para cumplir las necesidades de los viveros y agricultores de California, debido a que solo consideraba una enfermedad y no proporcionaba la certificación oficial de vivero (Hiltabrand, 1957).

Debido a lo anterior el departamento de Agricultura de California solicitó a la industria cítrica y a la Universidad de California, desarrollar un programa que cubriera más enfermedades y plagas, y en 1957 iniciaron el programa de mejoramiento de variedades de cítricos, cada instancia tomó obligaciones con el objetivo de brindarle a los productores la seguridad de recibir árboles libres de virus hasta la fecha conocidos y garantizando pureza varietal de la especie, requirió una estrecha cooperación de la Universidad de California, el Departamento de Agricultura, viveristas interesados y agricultores, todos trabajando para mejorar la calidad y sanidad de plantas en vivero (Hiltabrand, 1957).

Reuther (1960), señala que dieron positivo a psorosis 30 muestras de plantas candidatas para constituir el programa de variedades de cítricos de California, 25 de estas accesiones

provenían de países diferentes, lo que mostró la amplia distribución de la enfermedad en países citrícolas, así como en diversas especies del género *Citrus*; además, reportaron por primera vez tres plantas positivas a tristeza de los cítricos.

Como parte del programa de mejoramiento de cítricos, se eliminaron todas las plantas positivas a tristeza de los cítricos; en 1961 se reportó que más de 10,000 plantas infectados con el virus habían sido propagados por injertos y sembradas en Valle de San Joaquín, California, USA, todas las plantas se eliminaron (Pratt *et al.*, 1972).

En 1969, se reportaron resultados obtenidos por el programa de mejoramiento de variedades de cítricos, de 315 selecciones de portainjertos de origen nacional y seleccionadas para la posible inclusión en el lote fundación, 87 fueron descartados por estar infectados de tristeza de los cítricos, exocortis, venas corchosas, psorosis y 11 por otras razones, las 217 restantes aparentemente estaban libres de infección por virus conocidos y eran candidatas a formar la estación del campo de Lindcove. Respecto, a las 240 selecciones de variedades de naranjas, mandarinos, pomelos, limones y otros híbridos; 42 eran de origen antiguo, 168 de origen nucelar y 30 de origen desconocido, solo 16 de las 42 selecciones antiguas aparentemente no tenían virus conocidos, mientras que 142 de 168 selecciones nucelar y 18 de 30 selecciones desconocidas se encontraron libres de virus; lo que demostró que no era posible asegurar la sanidad de las plantas basado en la inspección visual, por lo que las pruebas biológicas (indexación) tenían que ser esenciales. Incluso en materiales de origen nucelar, ya que no aseguraban la sanidad del material vegetal (Reuther *et al.*, 1972).

En 1971, iniciaron con el registro de cítricos y certificación teniendo un total de 137 árboles registrados en la Fundación Lindcove de la Universidad de California y 377 árboles candidatos. Y debido a reportes donde se señalaba la posible transmisión de psorosis por semilla en 1972, se estableció el reglamento para registrar plantas productoras de semilla, contando con 200 árboles que se había comprobado como negativos a dicho patógeno, por lo que los programas de registro y certificación redujeron la incidencia de enfermedades virales (Mather & McEachern, 1974).

Entre 1977-1980, encontraron aislados de CTV que inducían síntomas de amarillamiento de nervaduras y picado de tallo, extendiéndose naturalmente en huertos del centro de investigaciones de cítricos de la universidad de California Riverside, por lo que realizaron experimentos de preinmunización pero no se obtuvo el éxito esperado (Roistacher & Dodds, 1993).

Krueger *et al.* (2005), señala que el programa de certificación y registro para viveros de cítricos en California es uno de los más antiguos del mundo y ha servido como modelo para programas de otros países, sin embargo se han realizado modificaciones o mejoras al programa de acuerdo a la problemática que se presente. Para esta fecha contaban con 1,000 árboles, representando alrededor de 200 variedades disponibles para viveros comerciales autorizados, los cuales se analizan anualmente para tristeza de los cítricos, cada 3 años para viroides y 5 años para psorosis.

El programa implementado como libre de psorosis y de acuerdo a las modificaciones realizadas en la actualidad se denomina Citrus Clonal Protection Program (CCPP), con el objetivo de proporcionar un mecanismo seguro para la introducción de nuevas variedades de cítricos, provenientes de cualquier parte del mundo, con fines de investigación, mejorara de variedades para uso industrial y cuidar los materiales incluidos en el programa (Krueger & Lee, 2005). El programa incluye: diagnóstico de enfermedades, eliminación de patógenos, mantenimiento y distribución de material propagativo de cítricos. La detección de enfermedades transmisibles por injertos de cítricos se lleva a cabo en la estación cuarentenaria de Rubidoux, donde realizan identificación biológica, injertando tejido de importación en plantas cítricas indicadoras específicas, y otra yema es injertada en un portainjerto de limón volkameriano para preservar el material de donde se obtiene brotes vegetativos para la realización de microinjerto. Un alto porcentaje de las importaciones llegan infectados con una o más de estas enfermedades que son transmisibles por injerto. El tiempo desde la introducción de una variedad hasta la liberación de la cuarentena es aproximadamente tres años, pero puede variar según la presencia de enfermedades en el material vegetal (Anónimo, 2009).

Los viveros cítricos de California son regulados por el Departamento de Alimentos y Agricultura de California, el material otorgado a los productores para la propagación de planta cítrica es otorgado por el CCPP, el cual es obtenido tres veces al año (enero, junio y septiembre), o puede modificarse de acuerdo a condiciones ambientales presentes (Anónimo, 2018).

Al ordenar yemas vegetativas proporcionadas por el CCPP, el viverista acepta los términos y condiciones impuestos. Se les notifica por escrito a los interesados un mes antes del corte vegetativo y disponibilidad de material; la entrega de material es “condicionada” lo que significa que si CCPP le notifica por escrito que un árbol perteneciente al lote fundación del cual se cortaron yemas resulta positivo a tristeza o a cualquier otra enfermedad conocida, se tendrán que destruir todos los árboles propagados con las yemas provenientes de la planta enferma, contará con un lapso de quince días posteriores a recibir el aviso por escrito del CCPP e informar por el mismo medio al CCPP que se realizó la acción de eliminación, el CCPP reemplazará al viveristas, yemas de árboles que dieron negativos para la enfermedad (Anónimo, 2018).

En enero 2006, la Fundación de Lindcove identificó mediante indexado biológico en lima mexicana y corroborado por ELISA un árbol positivo a tristeza de los cítricos, por lo que tuvo que ser eliminado, señalan que fue el primer árbol que se encontró como positivo en los últimos 10 años e indican que la infección se encontraba en etapas iniciales dado que para realizar el indexado se tomó tejido en los cuatro cuadrantes de cada árbol a analizar y se inoculan en dos plantas de lima mexicana, y solo una de las dos limas inoculadas fue positiva. Como medida de precaución suspendieron la distribución de yemas programadas. Posterior a la eliminación del árbol positivo a CTV, se analizaron los árboles circundantes para verificar los resultados negativos a tristeza, encontrando en febrero de 2006 un segundo árbol positivo, plantado en 1996 y no registrado para la distribución de yemas; la infección pudo deberse a la diseminación natural del virus mediante áfidos y los resultados negativos en enero 2006 a la baja concentración del virus. El árbol fue eliminado y en abril, corroboraron resultados negativos mediante ELISA, reanudando el corte de material vegetal en Junio 2006 (Anónimo, 2006).

El director del CCP, profesor de la Universidad de California en Riverside, Georgios Vidalakis, señala que el programa sirve como un valioso y prestigioso recurso para los científicos de todo el mundo que están interesados en la mejora de variedades de cítricos (Wilcon, 2018).

### **Programa de certificación de cítricos en Valencia (España)**

España, introdujo plantas de naranjo dulce procedentes de Italia y Portugal en el siglo XV y XVI, para el establecimiento de las primeras plantaciones en diversas localidades de la comunidad Valenciana. En 1910 introdujeron de Estados Unidos la variedad Washinton Navel y entre 1920 y 1930 las variedades de pomelo, satsumas y navelinas (Villalba, 2000). Todas las plantaciones se establecieron de pie franco, sin embargo a mediados del siglo XIX, se presentó *Phytophthora*, como una epidemia en diversos países cítricos incluyendo España, por lo que fue necesario sustituir plantaciones con portainjertos tolerantes, siendo naranjo Agrio resistente a dicho patógeno y clave para la expansión de la citricultura comercial (Moreno y Ambros, 2011).

La tristeza de los cítricos se reportó en España en 1972 afectando 82,000 hectáreas de cítricos, por lo que naranjo agrio, no se podía seguir utilizando como portainjerto en las plantaciones debido a la susceptibilidad a dicho patógeno, y fue necesario sustituirlo por portainjertos tolerantes como los Citranges y mandarino Cleopatra, sin embargo el 100 % de las selecciones locales se encontraban infectados por uno o más virus, por lo que se implementó en 1975 el programa de mejora de variedades de cítricos en España, con el objetivo de obtener plantas libres de virus y viroides, en un tiempo aproximado de seis años, mediante termoterapia y microinjerto; simultáneamente al programa mencionado e iniciaron con la obtención de plantas nucelares de las especies más importantes (Navarro, 1976); transcurrieron cuatro años y el programa de saneamiento, así como la obtención de plantas nucelares fue validado obteniendo los resultados siguientes: de 94 árboles seleccionados para ser indexados de naranja dulce, mandarina y limón; se encontró en las variedades Borrull, Arrufatina y clementina gigante, tristeza de los cítricos; venas corchosas en el 28 % de las plantas, caquexia hasta la fecha era del 55 %; naranjo y mandarino mostraron síntomas

asociados a psorosis; dos árboles Navelate estaban infectados de impietratura, dos clementinas de “concave gum”, una Satsuma de cristacortis y todos los materiales enfermos de exocortis (Navarro *et al.*, 1980).

Como resultado del microinjerto lograron obtener casi el 100 por ciento de las plantas evaluadas libres de tristeza, exocortis, venas corchosas y caquexia; Sin embargo seguían presentando síntomas asociados a psorosis, por lo que tuvieron que realizar modificaciones al programa y para 1978, lograron obtener y propagar por viveros certificados plantas de naranjos navel (Navelate, Navelina y Newhall), Clausellina Satsuma; limones fino y Vena (Navarro *et al.*, 1980).

La obtención de plantas nucelares se realizó por siembra de semillas y selección de plantas nucelares y en las especies sin semillas como Navelate, Washington navel temprana, Navelina, Washington Foyos, Navel Newhall y mandarina Satsuma temprana, mediante cultivo de óvulos *in vitro*, las plantas obtenidas se mantuvieron en invernadero por 2 años para estudiar caracteres morfológicos; lograron obtener plantas nucelares de los cultivares de clementina Fina, Nules, Reina, Oroval, Tomatera, Borrull, Hernandina, Bruno, Esbal y Guillermina. Posteriormente se injertaron sobre Citrange troyer y mandarino cleopatra para estudiar el rendimiento hortícola; las plantas nucelares no se pueden usar para propagación hasta que pierdan los caracteres juveniles, que puede llevar hasta 30 años, A pesar del inconveniente, es importante tener un reservorio de plantas nucelares libres de virus para estudios futuros (Navarro *et al.*, 1980).

En 1982 establecen la estación de cuarentena con la finalidad de regular la introducción segura de material vegetal, que consiste en los siguientes pasos: a) inspección preliminar del material vegetal; b) desinfestación, c) cultivo de yemas *in vitro* a 32 ° C, d) microinjerto, e) injerto obtenido del proceso de microinjerto); trasplante de plantas microinjertadas a un invernadero de cuarentena; f) indexación del material obtenido; g) liberación de yemas. Cualquier tejido que presente anormalidades o síntomas en el proceso de saneamiento, debe ser destruidos (Navarro *et al.*, 1983). Para 1983 los objetivos del programa se ampliaron a la

importación de material vegetal de otras áreas cítricas a través de una estación de cuarentena para formar el banco de germoplasma; sesenta y tres especies y variedades se introdujeron de otros países. Hasta esa fecha el programa de mejora de variedades de cítricos tenía 267 accesiones y 112 se habían liberado de virus y enfermedades similares a virus y estaban disponibles para los 16 viveros certificados de cítricos y se habían plantado 12 millones de árboles sanos en huertos comerciales (Navarro *et al.*, 1988).

En 2001, el banco de germoplasma contaba con 428 genotipos, 237 seleccionados en España y 191 importados de otros países, representando 43 especies de cítricos y 32 especies de 17 de géneros afines; la cantidad de viveros habían aumentado a 39 unidades certificadas y desde el inicio del programa al 2000 se habían producido más de 85 millones de planta certificadas, representando un 70 % de la superficie cítrica (Navarro *et al.*, 2002).

En 2011 la superficie cultivada sobre naranjo agrio fue de 10%. Desde la aparición del virus de la tristeza de los cítricos en 1975 se restringió su uso y solo se permite para lima mexicana y plantas ornamentales; las nuevas plantaciones de naranjo, mandarina y pomelo están aproximadamente distribuidas de la siguiente forma: 5% sobre citrange Troyer (*C. sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.), 76% en citrange Carrizo y 9% en mandarina Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.). Para España, las plagas no constituyen graves problemas, debido a que las nuevas plantaciones están en portainjertos tolerantes a CTV y con variedades libres de enfermedades transmitidas por injerto (Zaragoza *et al.*, 2011).

En 2016 el Instituto Valenciano de investigaciones Agrarias (IVIA) informó que contaban con tres colecciones de cítricos usadas para proyectos de investigación.

- 1.- En Campo, para la caracterización y evaluación de genotipos.
- 2.- Espacio protegido para evitar pérdidas por estrés abiótico, así como reinfección de los genotipos. Y constituye el origen de todo el material utilizado para la propagación comercial en los viveros comerciales de cítricos.
- 3.-Criocongelacion, para mantenimiento a largo plazo (Anónimo, 2016b).

El banco de germoplasma del IVIA consta aproximadamente de 471 materiales libres de patógeno, distribuidos en: clementinas, satsumas, otras mandarinas, híbridos, papedas, cidros, zamboas y sus híbridos, naveles, blancas, sangre, sucreñas/naranjas sin acidez, naranjas amargas, limones, lima, pomelos y sus híbridos, otras especies de cítricos, kumquats, poncirus y sus híbridos, limas australianas y sus híbridos y otros géneros afines (Anónimo, 2016b).

### **Programa de certificación de cítricos en São Paulo (Brasil)**

Los primeros reportes de cítricos en Brasil, mencionan el litoral de São Paulo en 1540 y Bahia en 1567, a partir de 1760 plantaciones en Rio Grande del Sur, todas propagadas de pie franco (Koller, 1994); en 1912, en la finca Santa Cruz iniciaron actividades en vivero para propagar plantas injertadas (Hasse, 1987), y a partir de esta fecha hasta la década de los 20s el principal portainjerto fue el naranjo Caipira (Sempionato et al., 1997).

En 1921, el gobierno brasileño estableció leyes para la inspección de viveros de plagas y enfermedades en vivero. En 1938 se propuso la certificación de árboles de cítricos en diferentes combinaciones (injerto-portainjerto), en el mismo año se reportó por primera vez en Brasil la presencia de caquexia, debido a ello los investigadores se interesaron por la sanidad de la citricultura y en 1939 se estableció regulaciones para la venta de cítricos vivero. Los viveros fueron registrados obligatoriamente e inspeccionado periódicamente (Rossetti *et al.*, 1963). Debido a la presencia de caquexia en 1940 se prohibió el portainjerto lima dulce de palestina (Müller y Costa, 1977).

Salibe (1960) reporta por primera vez lo observado en plantaciones citrícolas de Brasil y que denominó incompatibilidad, desconociendo el agente causal y suponiendo que lo observado podría ser genético o por la presencia de un virus que se diseminaba rápidamente. Posteriormente se determinó que el causante era el *Citrus tristeza virus*.

En 1960, evaluaron la sanidad de las plantaciones del estado de São Paulo, la mayoría de los árboles de Naranja Baianinha y Hamlin estaban infectados por exocortis; las variedades Baianinha y Valencia, infectadas de psorosis; y la variedad Barão por caquexia, debido a lo anterior el Departamento de Agricultura designó se formara un programa de certificación de yemas para el estado de São Paulo. El comité se conformó en 1961 por fitopatólogos, horticultores y extensionistas del Instituto Agronómico y el Departamento de Extensionismo, con el objetivo de producir árboles madre y seleccionar árboles en campo libres de virus transmitidos por injerto, incluyendo psorosis, exocortis y caquexia. El programa se estableció de carácter voluntario y sin generar costo al viverista o productor. Y se dividió en dos partes: selección de árboles adultos libres de enfermedades en los huertos y propagación de árboles nucelares (Rossetti *et al.*, 1963).

Se seleccionaron 7,000 árboles de los cuales 227 se postularon como candidatos a ingresar al programa; en el indexado realizado para psorosis, exocortis y caquexia, 104 árboles estaban infectados, por lo que decidieron trabajar solo con árboles de origen nucelar, en 1963-64 se distribuyeron a 122 productores de las diferentes áreas cítricas un total de 9,643 árboles obtenidos de 39 árboles de origen nucelar de variedades de naranjo: Baianinha, Hamlin, Valencia, Bargo y Natal; mandarinos: Ponkan y Cravo. Estos árboles se inspeccionaron periódicamente para detectar psorosis, exocortis y caquexia. Los árboles que mostraron buena productividad, ausencia de síntomas asociados a virus, buena calidad de fruta y pureza varietal los registraron como árboles madre con una duración de cinco años (Rossetti *et al.*, 1963). Las enfermedades sin vector fueron resueltas mediante el uso de clones nucelares y permitió el registro de árboles madre en 1969 (Carvalho *et al.*, 2002).

En 1970, apareció “blight” o declinio de etiología desconocida; en 1987 se detectó clorosis variegada de los cítricos (CVC) causada por *Xylella fastidiosa*, extendiéndose rápidamente y afectando a 2 millones de árboles afectados, por lo que fue necesario realizar cambios en los esquemas de producción de plantas en vivero. Debido a todos los problemas fitosanitarios que enfrentaba el país en 1988 implementaron el programa denominado “super planta” por dos grupos universitarios de la Facultad de Ciencias Agrícolas, UNESP, en Botucatu y el

Centro para la Biotecnología Agrícola, Escuela Superior de Agricultura "Luiz de Oueiroz"-USP, en Piracicaba, con el objetivo de producir plantas libres de virus, alta calidad hortícola y seleccionar material vegetal con características deseables para la industria. El programa se realizó en fases:

- a) Seleccionar árboles de más de 10 años, vigorosos, productivos, pureza varietal y aparentemente libre de todas las enfermedades y anomalías conocidas.
- b) Eliminación de virus mediante microinjerto que se realizó en el Centro de Agricultura Biotecnología, en Piracicaba.
- c) Propagación de plantas provenientes de microinjerto en lima Rangpur e inoculación con una raza débil de tristeza para protección cruzada y mantenimiento en espacio protegido.
- d) Proporcionará material vegetal para el establecimiento de lotes fundación. La sanidad se corrobora mediante indexado cada cinco años (Salibe *et al.*, 1993).

Como resultados del periodo de 1989-1992, seleccionaron 110 árboles que representaron el germoplasma de cítricos existentes en Brasil, de los cuales más del 50 % correspondía a naranja Pera, debido a que es la que más se cultiva en el país; se indexaron en plantas indicadoras para detectar virus (tristeza, venas corchosas, agallas leñosas y psorosis) y viroides (exocortis y cachexia), muchos de estos árboles fueron negativos para virus y viroides, sin embargo todos los materiales fueron positivos a tristeza de los cítricos, considerado endémico de Brasil (Salibe *et al.*, 1993).

En 1991-92, el Banco Activo de Germoplasma de Cítricos del Centro de Citricultura Sylvio Moreira, evaluó la presencia de CTV, en 297 variedades de cítricos nacionales y extranjeras, en su mayoría naranjo, mandarino, limones y otras especies, injertadas en lima Rangpur y mandarino Cleopatra; encontraron infección en 100 % de los materiales; respecto a la presencia de acanaladuras en la madera (síntoma típico de tristeza) la mayoría de naranjos, mandarinos y limones presentaron tolerancia a tristeza; existiendo variaciones entre plantas de la misma variedad (Orlando *et al.*, 1993).

En 1992, establecieron en el Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM/IAC), la preinmunización, poniendo el material vegetal a disposición de los viveristas para ser propagado; en 1994, establecieron el programa voluntario de certificación de viveros que requirió entre otras medidas, el uso de mallas a prueba de insectos. En el mismo año el CCSM/IAC estableció un lote para la producción de yemas libres de CVC y otros patógenos transmisibles por injerto. Y en 1998, el Programa de Registro de Árboles Madre de São Paulo se reestructuró para tener en cuenta estas nuevas medidas (Carvalho *et al.*, 2002). En 1999, la Secretaria de Agricultura y Abastecimiento del Estado de São Paulo, publicó normas con el objetivo de garantizar la calidad, sanidad y pureza genética del material multiplicado y comercializado en Brasil (Bremer *et al.*, 2015).

En 2000, detectaron la enfermedad de muerte súbita y se obligó a la producción de portainjertos en espacio protegido; en 2001, se inició la producción de plantas en viveros en espacio protegido; en este año São Paulo, produjo 20 millones de plantas de cítricos, siendo 3.5 millones en ambiente protegido, de los cuales 2.5 millones se produjeron por la Asociación Paulista de Viveros Certificados de Cítricos (Dibbern *et al.*, 2001).

En 2001, reportaron la presencia de CTV en 97 % de los clones viejos y nucelares (30% razas severas), además de psorosis, exocortis y cachexia en 16 %, 19 % y 9 %, respectivamente; estos resultados formaron parte de pruebas realizadas en el 80 - 90 % de 358 plantas pertenecientes al banco de germoplasma; siendo naranjo, mandarino y limones/limas ácidas las especies con mayor presencia de razas severas de CTV. Exocortis se encontró en mayor proporción en naranjo, limón, limas ácidas y pomelos; psorosis fue frecuente en naranjo, mandarino, limas ácidas; cachexia predominó en naranjo, mandarino, pomelo. Los materiales fueron saneados por termoterapia y microinjerto, obteniendo el 100 % libre de las enfermedades a las que fueron indexadas (Alves *et al.*, 2001).

De enero 2003, la producción de plantas de vivero de cítricos en espacio protegido se convirtió en obligatoria. Y como resultado de las modificaciones realizadas en el viverismo, reportaron que en el periodo de 1994 a 2000, la producción de yemas para la distribución en viveros certificados creció de 300,000 a 10 millones (Carvalho *et al.*, 2002).

El esquema de certificación está fundamentado en el concepto de circuito de producción cerrado, desarrollado por los viveristas del Estado de São Paulo y consiste en producir y controlar todo el material genético utilizado en el proceso de producción de plantas de cítricos en vivero (Dibbern, 2008). Las semillas deben provenir de plantas madres que se desarrollen en viveros protegidos o en espacios abiertos y las yemas deben tener como origen plantas madres del Centro APTA Cítricos “Silvio Moreira” (Dibbern, 2010). En 2004 se reportaron los primeros casos de HLB. En 2008 se crea la fundación de viveristas VIVECITRUS. Los requisitos necesarios para el registro de un vivero, distancia mínima de 20 m de plantas de cítricos, área con buen drenaje, invernadero cubierto con malla de 1 mm<sup>2</sup> y contar con antesala, bancales a 30 cm del suelo o capa de 5 cm de piedra triturada, tapete sanitizante y lavabo para desinfección de calzado y manos, muro lateral que impida la entrada de aguas invasoras, tratamiento de agua con cloro a 5 ppm o de pozo artesanal (Dibbern, 2001).

Con todas las medidas de control señaladas, en 2006 se presentó en São Paulo un caso de cancro cítrico en vivero protegido, y se considera que pudo ser debido al descuido o introducción de material no autorizado por las normas vigentes (Anónimo, 2010). En 2008 contaban con 481 viveros en espacios protegidos; con capacidad de producción de 36,285,322 plantas. El cambio estructural rápido y eficiente del eje de la cadena productiva citrícola se logró a la actitud positiva de los productores (Anónimo, 2010).

### **Programa de certificación de cítricos en México**

Los cítricos se introdujeron a México en 1518, por Bernal Díaz del Castillo, a la región de Tonalá, Veracruz, México (San Martín y Curti-Díaz, 2007), fue durante el siglo XX que la citricultura se convirtió en una actividad comercial, presentando dos periodos con incrementos importantes en la superficie citrícola, principalmente en la década de los 1960, impulsados por la helada ocurrida en Florida y Texas, que destruyó las plantaciones de los estados norteamericanos y el segundo periodo ocurrió a final de la década de 1980 (Gómez, 2003, Gómez-Cruz *et al.*, 1994).

En 1983, se detectó a CTV en Tamaulipas, en 1986 en Veracruz, ambos brotes se eliminaron oportunamente. En 1992-93, nuevamente se detectó en Veracruz, las cuales fueron destruidas por incineración como parte de la erradicación oficial del programa (SAGARPA, 2002).

Además de la presencia de CTV en México; están presentes viroides, en muestreos realizados en 1996-97, realizados en plantaciones de lima Persa de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán, 33 de 35 muestras analizadas presentaron infección mixta por CEVd-cit y HpSVd-cit; lo anterior indica el uso constante de yemas infectadas para el establecimiento del cultivo, las dos muestras que resultaron negativas, señalan que pudo deberse a material proveniente del extranjero y negativo a dichos viroides (Alvarado-Gómez *et al.*, 2000).

En 2000, reportaron por primera vez la presencia del pulgón café en Quintana Roo, a finales del mismo año se encontraba en Campeche, de donde se distribuyó a zonas citrícolas de la península de Yucatán (Michaud y Álvarez, 2000). Considerando la presencia de tristeza de los cítricos y su vector en zonas citrícolas del país y teniendo como referencia las epifitias ocurridas en otros países, donde las plantaciones se encontraban injertados en naranjo agrio y como consecuencia afectaciones en la captación de divisas. En 2001 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, estableciendo la campaña contra el virus tristeza de los cítricos, con el objetivo de establecer las medidas fitosanitarias que debían aplicarse para prevenir, controlar o erradicar al virus tristeza de los cítricos y/o a su principal vector el pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida*. Las disposiciones de la presente con aplicación en zonas citrícolas del territorio nacional (SAGARPA, 2001).

México, como parte de las acciones que realizó para enfrentar la problemática fitosanitaria, se realizaron investigaciones con la finalidad de definir portainjertos que podían adaptarse a distintas regiones productoras del país. Además de estos estudios, inició el programa nacional de reconversión productiva de la cadena citrícola, cuya principal estrategia fue la utilización de plantas certificadas con portainjertos tolerantes a tristeza de los cítricos y utilización de material vegetal libre de enfermedades para el establecimiento de nuevas plantaciones (Martín y Curti-Díaz, 2007).

Como complemento a las normas NOM-031-FITO-2000, NOM-011-FITO-1995 y NOM-007-FITO-1995, en 2002 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-079-FITO-2002, Requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo libre de virus tristeza y otros patógenos asociados a cítricos. La cual tiene por objetivo establecer la regulación fitosanitaria para la producción y movilización de material propagativo libre de virus tristeza y otros patógenos asociados a cítricos (SAGARPA, 2002).

En 2005, se detectó leprosis de los cítricos (*Citrus leprosis virus*), en la línea fronteriza entre Chiapas y Guatemala; por lo anterior el Gobierno del Estado y la Junta Local de Sanidad Vegetal de Fruticultores del Soconusco, implementaron el programa emergente para la erradicación de leprosis de los cítricos, y consistió en la eliminación de plantas positivas de naranja dulce localizadas en huertos y traspatios, control químico del ácaro vector y la divulgación masiva del programa (Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV), 2005).

En 2005, se reportó la presencia de razas severas en muestras de Nuevo León y Veracruz, mostrando 96 % de similitud con el aislado CTV H33 caracterizado como severo; dos muestras de Tamaulipas y Veracruz, respectivamente, mostraron 99 % de identidad con razas tipo T30 (Mendoza *et al.*, 2005).

En 2007, SENASICA reportó que el pulgón café, colonizó el norte de Veracruz y a partir de entonces se dispersó a estados con producción comercial de cítricos. El pulgón café es una de las principales plagas de los cítricos; de manera directa causa daños en el follaje y es considerado el vector más eficiente en la transmisión del CTV (SENASICA, 2013). Sin embargo, en el mismo año, San Martín y Curti-Díaz, 2007, reportaron que alrededor del 85 % de las plantaciones comerciales estaban injertadas sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), portainjerto considerado altamente susceptible a *Citrus tristeza virus*, situación que puso en riesgo la citricultura nacional. Ya que se tenían reportes de presencia de razas severas y a la amplia distribución del vector. En 2007, el gobierno federal destinó 100 millones de pesos para la compra de árboles de plantas de cítricos certificados, que se distribuyeron a productores de distintas regiones del país (San Martín y Curti-Díaz, 2007). En 2007, dejó de operar la campaña NOM-031-FITO-2000, argumentando que se contaba con suficientes viveros certificados para abastecer la demanda de plantas con portainjertos tolerantes a CTV,

así mismo, hasta ese año se había detectado sólo la presencia de razas débiles (SENASICA, 2016, SENASICA, 2014, citado por Rivas-Valencia *et al.*, 2017).

En 2016, SENASICA, reportó la detección de CTV en Cazones de Veracruz y Tuxpan. Y en 2017 reconocieron que correspondía a razas severas. Aunado a lo anterior, en 2018 reportaron la presencia de HLB en 25 municipios de Veracruz.

### **Análisis del esquema de certificación en México**

El programa de certificación inició en 2002, con seis unidades de producción de material propagativo certificado (UPMPC), en 2003 se sumaron ocho; en 2004 11; 2005 24; 2006 38; siendo este el año donde se certificaron más UPMPC, 2007 siete; para 2008, se encontraban registradas en el SENASICA, 100 unidades de producción de material propagativo de cítricos en los que se encontraba un banco de germoplasma, cuatro lotes fundación, 21 lotes productores de yema, 15 huertas productoras de semilla y 59 viveros productores de plantas; en las que se podía adquirir yemas y plantas de 75 variedades de cítricos y se disponía semilla de 15 portainjertos tolerantes a CTV (Robles *et al.*, 2008), para 2018 se certificaron 98 UPMPC de las cuales 58 pertenecen a viveros productores de planta certificada, 23 lotes productores de yema, 13 huertas productoras de semilla, tres lotes fundación y un banco de germoplasma (SENASICA, 2018).

El número de registros de UPMPC ha sido variable a lo largo de los años, sin embargo, no se ha visto un aumento considerado en la cantidad de unidades certificadas como en otros países citrícolas, donde toda la planta es producida en viveros certificados como se realiza en California, Florida (Douhan *et al.*, 2016), España (Martínez, 2006) y São Paulo (Santos *et al.*, 2000). En México, se desconocen las causas del porque no se ha regulado el viverismo no certificado, aunque, pudiera ser debido a diversos factores: precio de la planta que maneja los viveros certificados ya que los productores buscan establecer un huerto al mínimo costo y considerando que la planta certificada osciló en 2016 de los 18 a los 35 pesos y en los viveros no certificados de 8 a 15 pesos, el productor posiblemente busca establecer el huerto con material “económico”. Otro supuesto puede ser la preferencia que tienen los agricultores

por el portainjerto naranjo agrio que solo se comercializa en los viveros no certificados, además, que muchos productores tienen la costumbre de que el material vegetal usado para injerto sea de plantas conocidas en producción, desconociendo la sanidad, mismo servicio que solo se brinda en viveros no certificados, aunado a lo anterior, el costo de la certificación de las UPMPC pudiera causar que viveristas certificados decidan no renovar la certificación, y sumarse a viveristas no certificados, debido que para 2018 no está regulado por leyes mexicanas que impidan esta actividad. Aunado a lo anterior, otro supuesto del no aumento de viveros certificados, pudiera ser la desinformación del productor respecto a la sanidad y calidad que puede obtenerse en viveros certificados.

Para obtener la certificación o recertificación como UPMPC, es necesario realizar análisis por laboratorios de diagnóstico fitosanitario aprobados por la Dirección General de Sanidad Vegetal; en 2016, se encontraban vigentes 12 laboratorios acreditados en virología (SENASICA, 2016).

El estado de Veracruz es el único que cumple con el esquema de certificación completo el cual consta de un banco de germoplasma y un lote fundación, 10 lotes productores de yemas, cinco huertas productoras de semillas y 24 viveros productores de planta certificada (SENASICA, 2018). A diferencia de otros países donde las UPMPC se encuentran a cargo de instituciones de gobierno, universidades y/o asociaciones citrícolas, en México son manejadas por empresas particulares.

De acuerdo a la normatividad aplicada en cítricos, los interesados en certificar o renovar la certificación de bancos de germoplasma (BG), el material genético nacional o de importación que se desee forme parte, deberá provenir de otro banco de germoplasma nacional o extranjero certificado y autorizado por la Secretaría, y comprobar que pasó por un proceso de saneado que involucre microinjerto y termoterapia; posterior a esto, deberá presentar resultados negativos a tristeza, psorosis, exocortis, cachexia y demás plagas que determine la Secretaría, mismos que deben ser obtenidos por un laboratorio de pruebas o por la estación cuarentenaria aprobada. Simultáneamente, deben presentar pruebas negativas a estos virus y viroides por el proceso de indexación. El banco de germoplasma estará formado por lo menos

de dos plantas por cada variedad, plantadas dentro de una estructura con malla antiáfido impidiendo la introducción de insectos, antesala de doble puerta y con tapete fitosanitario. Deberá contar con réplica a cielo abierto con mínimo de 4 plantas por cada variedad. Después de obtener el registro, se verificará la fitosanidad para cada planta como se señala en el Cuadro 1 (SAGARPA, 2002).

Cuadro 1. Periodo en años que debe cumplir cada Unidad de Producción de material propagativo certificado (UPMPC), para verificar la sanidad del mismo.

Patógeno	Banco de germoplasma	Lote de fundación	Lote productor de yemas	Huerta productora de semillas	Vivero	Diagnóstico
Tristeza	Cada dos años <sup>+</sup>	Cada dos años <sup>+</sup>	Anual <sup>+</sup>	-----	2 % de las plantas a movilizar	5 muestras simples=1 muestra compuesta
Psorosis	Cada tres años <sup>+</sup>	-----	20 muestras simples=1 muestra compuesta			
Exocortis				-----	-----	20 muestras simples=1 muestra compuesta
Cachexia	Cada ocho años <sup>+</sup>	Cada ocho años <sup>+</sup>	Cada tres años <sup>+</sup>	-----	-----	20 muestras simples=1 muestra compuesta
Vigencia de UPMPC	Indeterminada	15 años	5 años	Indeterminada	-----	-----

\* Técnica de diagnóstico a utilizar: \* indexado biológico, + PCR convencional.

<sup>1</sup>: el diagnóstico deberá realizarse sobre el 10% de las plantas.

Fuente. Elaboración propia con información tomada del DOF, 2018.

Los interesados en certificar o renovar la certificación de lotes fundación (LF) deben utilizar portainjertos provenientes de semillas de huertas productoras de semillas nacionales o extranjeras, certificadas por la secretaría. Las yemas deben provenir de bancos de germoplasma nacionales o extranjeros siempre y cuando estén certificados por la secretaría. El representante del LF debe presentar copia de resultados negativos de las pruebas de verificación de sanidad, para tristeza, psorosis, exocortis, cachexia y demás plagas que determine la secretaría, efectuado por un laboratorio de pruebas o por la estación cuarentenaria aprobada. El LF debe estar formado al menos por dos plantas de cada variedad

bajo protección de malla antiáfidos, antesala de doble puerta y tapete fitosanitario. Después de obtener el registro, para cada planta se verificará la fitosanidad como lo indica el Cuadro 1 (SAGARPA, 2002).

Los interesados en certificar o renovar la certificación de huertas productoras de semillas (HPS), deben cumplir los siguientes requisitos: los portainjertos utilizados deben provenir de semillas nacionales o extranjeras certificadas por la secretaria y tolerantes al CTV. Las yemas para injertar los portainjertos de la HPS, deben provenir de árboles establecidos en lotes fundación o bancos de germoplasma nacionales o extranjeros, certificados por la secretaría. Las HPS ya establecidas que nunca han estado certificadas, deberán presentar documentación que compruebe el origen de la planta (portainjerto y especie) y prueba negativa del 100% de las plantas a psorosis. Después de obtener el registro, la sanidad se verificará como se señala en el Cuadro 1. En el 10% de las plantas de cada especie (en cada ocasión deben ser plantas diferentes) (SAGARPA, 2002).

Los interesados en certificar o renovar la certificación del lote productor de yemas (LPY), los portainjertos deben provenir de semillas de especies tolerantes al CTV, producidas en huertas productoras de semillas nacionales o importadas autorizadas por la Secretaría, injertados con yemas de las variedades de interés provenientes de un lote fundación o banco de germoplasma nacionales o extranjeros certificados por la secretaría. Posterior a la obtención de la certificación la fitosanidad se realizará como se señala en el Cuadro 1 (SAGARPA, 2002).

Los interesados en certificar o renovar la certificación de viveros, deben utilizar portainjertos tolerantes al CTV, a excepción de aquellos que sean injertados con *Citrus aurantifolia* y *Citrus limon*, donde se podrá utilizar cualquier portainjerto, siempre y cuando se cuente con diagnóstico negativos a virus y demás plagas que determine la secretaría, presentar información que avale que las yemas utilizadas para injertar los portainjertos provienen de LPY nacionales o extranjeros certificados. Para verificar y comprobar la fitosanidad del vivero a CTV, se realizará como se indica en el Cuadro 1 (SAGARPA, 2002).

## **Ventajas del uso de planta certificada**

Utilización de plantas de alta calidad genética y fitosanitaria, libres de enfermedades; mayor volumen de raíces, menores pérdidas de plantas en la siembra; disminución de riesgos de diseminación de enfermedades que aumentan los costos de producción; menor costo de establecimiento de huerta; retorno más rápido de la inversión (Zanetti, 2008).

## **Enfermedades virales que afectan a los cítricos**

De acuerdo con el International Committee on Taxonomy of Viruses (2018), los virus que afectan a los cítricos son: *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis ophiovirus* (CPsV), *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), *Citrus leprosis virus C2* (CiLV-C2), *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV), *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV), *Citrus leaf blotch virus* (CLBV), *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV), *Citrus leaf rugose virus* (CiLRV), *Citrus variegation virus* (CVV), *Citrus chlorotic dwarf associated virus* (CCDaV), *Citrus yellow mosaic virus* (CiYMV).

### **Tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*)**

El *Citrus tristeza virus* (CTV) se encuentra distribuido en todas las áreas citrícolas del mundo y es el agente causal de una de las enfermedades de mayor importancia económica que afecta a cítricos (Rubio *et al.*, 2001).

Se reportó por primera vez a inicios de la década de 1890 en Sudafrica, afectando plantaciones injertadas en naranjo Agrio, donde la denominaron incompatibilidad; posteriormente la enfermedad se presentó en Argentina en 1930, Brasil (alrededor de 1937) y en California (1939), generando pérdidas cuantiosas lo que indicaba la gravedad de la enfermedad y la causa era atribuida a un virus (Wallace, 1959). En 1957, se reportó tristeza de los cítricos en la comunidad Valenciana, España, afectando a 10 millones de árboles injertados en naranjo agrio (Cambra *et al.*, 1988). Moreno y Cambra (2016) señalaron que CTV causó la muerte de más 100 millones de árboles injertados sobre naranjo agrio.

## **Taxonómica de CTV**

Según datos reportados por el International Committee on Taxonomy of Viruses, el *Citrus tristeza virus* (CTV), es miembro de la familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus* (ICTV, 2011).

## **Estructura del Closterovirus**

Las partículas virales son flexibles, con tamaño de 2.000 x 12 nm, están formados por una molécula de RNA genómico (RNAG) de cadena sencilla y sentido mensajero de 20 kb (Satyanarayana *et al.*, 2004). La cubierta del virus está constituida de dos proteínas que forman la cápside, de 25 kDa (p25) que cubre aproximadamente 95% de la longitud del virión y de 27kDa (p27) que cubre el 5% restante (Ayllon *et al.*, 2001) resultando en viriones con estructura polar (Febres *et al.*, 1996). Su peso molecular aproximado es de 6.5 x 10 KDa. La partícula viral no posee cola poli-A en el extremo 3' (Bar-Joseph *et al.*, 1979).

## **Organización genómica**

El genoma completo de CTV se constituye de 19.226 a 19.296 nucleótidos, dependiendo del aislado (Ayllon *et al.*, 2001), consiste de 12 *Open Reading Frames* (ORF<sub>s</sub>) con capacidad para codificar 19 proteínas que varían de 6 a 349 KDa (Rubio *et al.*, 2001) y zonas no codificables (“*Untranslated Regions*” UTR) de 107 y 296 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente (Dawson *et al.*, 2013). Los aislados de tristeza de los cítricos se clasifican de acuerdo a la sintomatología que manifiesta el huésped: T30 leve, T36 intermedio y VT severo (ICTV, 2017).

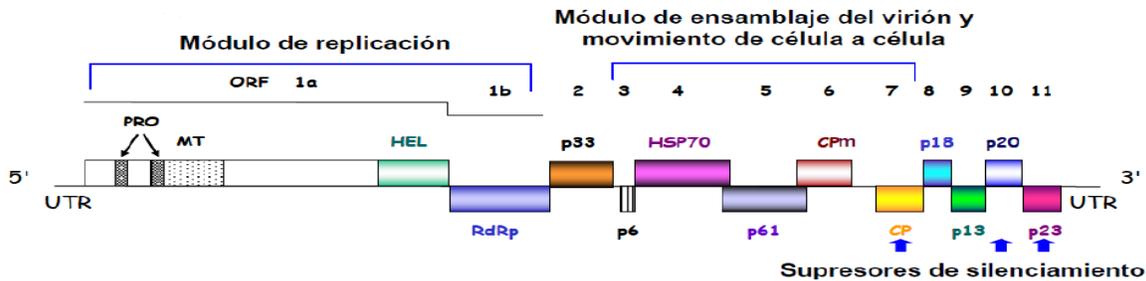


Figura 1. Representación gráfica de la organización del genoma de CTV. Se muestran los ORFs con sus respectivos productos proteicos, así como los dominios homólogos de metiltransferasa (MT), proteasa (PRO), helicasa (HEL) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Se indican también los extremos 5' y 3' no traducibles (UTR) (Ruiz, 2009).

### Tristeza de los cítricos en México

La tristeza de los cítricos se detectó por primera vez en 1983 en Tamaulipas en tres especies de cítricos las cuales se encontraban en etapa de vivero, posteriormente se realizaron más detecciones en 1986-87 en un campo agrícola experimental y lote demostrativo de 21 variedades, ubicados en Veracruz, en 1992 se detectó nuevamente en Veracruz en los mismos sitios sobre 26 plantas y dos viveros; en 1993 se detectó en 14 viveros (4 de Martínez de la Torre, 7 de Tlapacoyan, 1 de Tuxpan y 2 de Álamo) en todos los casos se eliminaron las plantas infectadas (Colli y Cárdenas, 1995).

En 1995 se inició la campaña para la detección del CTV (SAGAR, 1997), para 2008 el CTV se encontraba en 20 entidades citrícolas del país (SAGARPA, 2006) y se habían reportado 14,000 plantas positivas (Robles, 2008). En el mismo año se dejó de eliminar plantas positivas debido a que no se presentó muerte masiva de plantas como ocurrió en otros países citrícolas

([https://www.nappo.org/files/6214/3744/6322/2\\_B\\_Luis\\_Angel\\_Villareal\\_y\\_Robert\\_Krueger\\_Historia\\_y\\_Situacion\\_de\\_VTC\\_en\\_Mexico.pdf](https://www.nappo.org/files/6214/3744/6322/2_B_Luis_Angel_Villareal_y_Robert_Krueger_Historia_y_Situacion_de_VTC_en_Mexico.pdf)). Sin embargo, en algunos reportes señalan que la eliminación de plantas se dejó de realizar en 2007 (SENASICA, 2016).

Mendoza *et al.* (2003), realizó diferenciación molecular de razas débiles y severas de aislamientos de CTV obtenidas de naranjo dulce, procedentes de Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz, señalan que de 5 muestras analizadas “CBG-NL1, CBG-NL2 (Nuevo León), CBG-

V1, CBG-V2 (Veracruz) y CBG-T2 (Tamaulipas)”, las procedentes de Nuevo León y CBG-V1 de Veracruz, presentan 96% de similitud con razas que ocasionan picado de tallo y declinamiento.

Rivas-Valencia *et al.* (2008) señalaron que en México no existen aislamientos severos de CTV con alta prevalencia, sin embargo, el riesgo de epidemias de alta intensidad ante la introducción de *Toxoptera citricida*, vector eficiente en la transmisión de variantes severas del CTV, obliga a estudiar los mecanismos intrínsecos del patógeno para adaptarse e inducir epidemias.

Rivas-Valencia *et al.* (2010) reportaron la presencia de aislados de CTV caracterizados como de tipo moderado, en muestras analizadas de Yucatán y Tamaulipas, señalando que por este motivo pudiera justificar la ausencia de síntomas atribuible a tristeza. Sin embargo, existe controversia entre los tipos de variantes del CTV que existen en México, Xiao *et al.* (2017), mencionaron que la variante presente de CTV está clasificado como T30 considerada como débil y asintomática, no obstante, es posible la presencia de un solo genotipo o mezclas de varios genotipos. Cabe señalar que nada garantiza que esta situación se mantenga estable en el futuro y no aparezcan o aumenten la frecuencia de razas severas de CTV, similares a la de otros países donde han inducido pérdidas importantes por el síndrome de acanaladuras en la madera (Moreno y Ambros, 2011).

Contreras-Maya (2016) reportó la presencia de CTV en 12 muestras compuestas de lima Persa provenientes de Martínez de la Torre, Atzalan, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes, Ver. En ese año la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) reconoció 28 muestras positivas a CTV, identificando molecularmente una raza catalogada como severa provenientes de Cazonas de Herrera y Tuxpan, Veracruz (SENASICA, 2017).

## **Transmisión**

El CTV se encuentra limitado al floema (tubos cribosos, células de acompañamiento, parénquima de floema (ICTV, 2011), parece ser que el virus se limita a unas cuantas células

de floema en cada haz vascular y esto explica la capacidad que tiene el virus para infectar la misma planta propagándose en algunas de las células restantes del floema (Agrios, 1998), es transmitido por áfidos de manera semipersistente (Rubio *et al.*, 2001), siendo el pulgón café (*Toxoptera citricida*) (Kirkaldy) el vector más eficiente (Mendoza *et al.*, 2005), no presenta periodo de latencia y después de 48 horas de haberlo adquirido pierde la virulencia (Lee *et al.*, 1996). Otra vía de dispersión de CTV es el movimiento no controlado de material propagativo y la distribución por viveristas (Moreno y Cambra, 2016).

En 2000, el pulgón café fue detectado en Quintana Roo, de donde se dispersó a Campeche y Yucatán; en 2007 colonizó la zona citrícola del norte de Veracruz, de donde se dispersó a todos los estados con producción comercial (SENASICA, 2013), en 2008 se encontraba en 8 estados de la República (Robles, 2008). En 2013 se reportó en Quintana Roo, Yucatán, Campeche, Tabasco, Veracruz, Chiapas, Puebla, Hidalgo, Guerrero, Oaxaca, Morelos, Querétaro, San Luis Potosí, Jalisco y Tamaulipas. Y en 2018 se reportó en siete estados más: Oaxaca, Colima, Nayarit, Zacatecas, Tabasco y Edo. de México (<http://sinavef.senasica.gob.mx/mdf/>).

## **Síntomas**

Los síntomas provocados por tristeza de los cítricos, en campo es variable dependiendo de la variante de virus y de la combinación injerto/portainjerto (Bremer *et al.*, 2015), existen aislamientos de CTV, considerados de importancia económica debido a que causan declinamiento, picado de tallo y muerte de plantas de naranjo dulce y pomelo, cuando se encuentran injertadas sobre naranjo agrio (Bar-Joseph *et al.*, 1989), sin embargo algunas variantes débiles no causan efectos visibles en los hospederos que infectan, aún en aquellos injertados en naranjo agrio (Lee y Rocha-Peña, 1992).

Chaparro *et al.* (2013) señalaron que el CTV disminuye la longevidad y rendimiento de las plantas, afectando indicadores económicos del cultivo, Albiach-Martí *et al.* (2000) compararon secuencias genómicas completas de aislados de CTV T30 (Florida) y T385 (España), señala que no se sabe si los síntomas inducidos por un aislado de CTV son

inducidos por la secuencia genómica predominante, la población viral, combinación de ARN genómicos y ARNd, u otros factores. Estos aislamientos no inducen síntomas notables en árboles de campo, y solo causan síntomas leves en plantas indicadoras de lima mexicana.

### **Portainjertos tolerantes y susceptibles**

Un portainjerto es considerado susceptible cuando manifiesta síntomas debido a la presencia del patógeno; y tolerante cuando no manifiesta síntomas (Alves *et al.*, 2005); las plantas tolerantes permiten que el patógeno se desarrolle y propague en ella sin afectar el rendimiento de manera considerable. En cambio, una planta es susceptible cuando permite que el patógeno se desarrolle en el hospedante causando pérdidas económicas considerables (Agrios, 1998).

### **Portainjertos tolerantes a tristeza de los cítricos**

Lima Rangpur (*C. limonia* Osbeck); limón Rugoso (*C. jambhiri* Lush.), limón Volkameriano (*C. volkameriana* Ten. & Pasc); mandarino Sunki (*C. sunki* Hort. ex. Tan.), Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex. Tan.), Oneco y Sun Chu Sha (*C. reticulata* Blanco); Citrumelo Swingle, 4477 (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*); Citrange Troyer, Carrizo (*C. sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata* (L.) Raf.), naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata*) (Bremer *et al.*, 2015), Morton, citrange Fepagro C 13; tangelo Orlando (*C. tangerina* Hort. ex Tan. × *C. paradisi* Macf.) (Efrom y Souza, 2018), Citranges C-32, C-35 y Benton (*P. trifoliata* (L.) Raf.] x [*C. sinensis* (L.) Osbeck] cv. Ruby, Citrandarin X-639 (*C. reshni* hort. ex Tanaka x *P. trifoliata* (L.) Raf.), pomelos (*C. paradisi*)\*\*, naranjo Goutoucheng (*C. aurantium*); Kinkoshi (*C. obovoidea* hort. ex I. Takah.), Nanshōdaidai (*C. taiwanica* Tanaka & Y. Schimada) (Alves *et al.*, 2005).

## **Portainjertos susceptibles a tristeza de los cítricos**

Naranja Valencia (*C. sinensis*)<sup>\*\*</sup>; lima persa (*C. latifolia* Tanaka)<sup>\*\*</sup>, mandarino (*C. reticulata* Blanco)<sup>\*\*</sup>, lima de Persia (*C. limettioides*), naranja agrio (Alves *et al.*, 2005) (Bremer *et al.*, 2015), Yamamikan (*C. intermedia* hort. ex Tanaka), citradias (*C. aurantium* x *P. trifoliata*), limón Macrophylla (*C. macrophylla* Wester), pomelo New Zealand (Pompeu, 2005), Murcott Honey tangor, naranja Navel, Pera, Jaffa (Moreira *et al.* 1965)

<sup>\*\*</sup>=especie usada como injerto

## **Hipersensible**

Naranja agrio (*C. aurantium*) (Alves *et al.*, 2005). Y Bremer *et al.* (2015), considera a naranja Agrio como Tolerante a CTV; así también limón siliciano y Eureka son hipersensibles, impidiendo la multiplicación del virus (Alves *et al.*, 2005).

## **Control**

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 es la propagación de yemas certificadas libres del virus e injertadas en portainjertos tolerantes (Moreno y Ambros, 2011).

Otro método para reducir el impacto de CTV es el uso de protección cruzada, consiste en infectar plantas con una raza débil del virus que impida o retrase la acumulación de razas severas y por lo tanto proteja al huésped, esta técnica sea utilizado masivamente para cultivar el naranja Pera en Brasil, pomelo en Sudafrica (Moreno y Ambros, 2011), limón en la India, limón y pomelo en Venezuela (Becerra *et al.*, 1996). Es importante conocer de una región productora de cítricos el tipo de raza presente (débil, intermedia y severa), para hacer uso de la protección cruzada a nivel regional (Xiao *et al.*, 2016).

## Psorosis (*Citrus psorosis ophiovirus*)

### Taxonomía

Según datos reportados por el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus, el *Citrus psorosis ophiovirus* (CPsV), pertenece a la familia *Ophioviridae*, género *Ophiovirus* (ICTV, 2017).

### Organización genómica

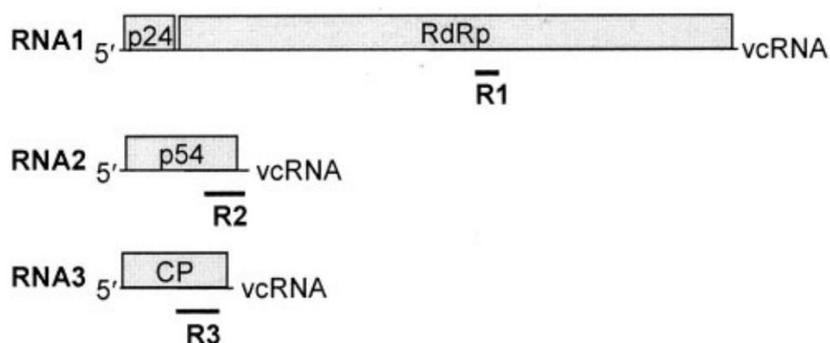


Figura 2. Representación esquemática del genoma de CPsV (Martín *et al.*, 2006).

El nombre de psorosis es usado para designar a enfermedades virales de los cítricos que tienen ciertas características en común, especialmente los síntomas que se producen en hojas jóvenes. Este nombre fue utilizado por Swingle y Webber en 1986, cuando por primera vez describieron la enfermedad que afectaba a plantaciones cítricas en Florida, denominándola gomosis; en California le llamaron corteza escamosa o enfermedad de la corteza. En 1932, Fawcett le dio el nombre de psorosis "A" a la forma común de la enfermedad para distinguirla de un tipo menos común pero más activo que describió como psoriasis "B", se han descrito otros cuatro tipos de psorosis: concave gum, blind pocket, crinkly leaf, y infectious variegation, que se distribuyeron por zonas importantes productoras de cítricos (Wallace, 1959). La distribución de psorosis se dio por el uso de material propagativo enfermo. En el sur de California hubo alto porcentaje de árboles muertos, el estudio de 6 mil árboles

productivos mostró que 14% de estas plantas estaban afectadas y producían menos y 6.5% no producían (Sempionato *et al.*, 1997).

### **Estructura de CPsV**

Las partículas virales son filamentosas, pequeñas (300-500 nm) y largas (500 a 2500 nm), constituido de RNA de cadena simple, polaridad negativa, con genoma multipartito (ICTV, 2017), cubierta por monómeros de una proteína de 48 kDa (Derrick *et al.*, 1988); varía según la especie de donde se obtenga el aislado, posee tres RNAs de los siguientes tamaños 8.300 kb, 1.650 kb e 1.500 kb, respectivamente (Müller, 2005). El RNA1 posee 2 ORFs, codifica para proteínas de 280 y 24 KDa. La de 280 KDa posee similaridad con RNA polimerasa del virus y el otro ORFs es de función desconocida. El RNA 2 posee un ORF que codifica una proteína de 54,7 KDa de función desconocida. El RNA 3 posee un ORF y codifica una proteína de 48.6 KDa, identificada como la proteína de la cápside (Derreck y Barthe, 2003; García *et al.*, 2003).

### **Transmisión**

La transmisión se realiza principalmente por el uso de material vegetativo infectado (Müller, 2005). Además, puede ser diseminado por herramienta usada en vivero y/o campo (cuchilla, injertadores o tijeras) (Guerri, 1999).

Childs y Johnson (1966) informaron la transmisión de psorosis a través de semillas de Citrange Carrizo en niveles de 15 a 31 por ciento. Pujol (1966) reportó la transmisión por semilla de Citrange Troyer y Campiglia (1976) agrega que la transmisión por semilla también se puede presentar en naranjo trifoliado en niveles de 1 al 10 %. Debido a esta posibilidad se enfatiza la necesidad de contar con plantas productoras de semilla con prueba negativa. Roistacher *et al.* (2000), señalaron que no hay evidencias en la transmisión de psorosis a través del polen y semillas, en campo existe la sospecha de transmisión horizontal entre árboles (injerto de raíz) (Miao *et al.*, 2003)

## **CPsV en México**

Iracheta (2004), evaluó 11,667 árboles en plantaciones cítricas de Nuevo León, 173 presentaron síntomas asociada a psorosis, de los cuales analizaron 61 muestras (58 sintomáticas y 3 asintomáticas), obteniendo resultados positivos en 32 de las muestras analizadas correspondiente al 52.45 %.

Contreras-Maya *et al.* (2018) reportaron la presencia de psorosis en 16 de 22 huertos analizados de lima Persa, presentando mayor incidencia en Martínez de la Torre (37.5 %), Atzalan (18.8 %), San Rafael (12.5 %), Cuitláhuac (25 %) y Amatlan de los Reyes (6.2 %). Los árboles positivos mostraron descortezamiento de tronco y ramas, follaje escaso y amarillento. Señala que el material con resultado positivo era de viveros no certificados, en plantaciones con material certificado no se presentó CPsV.

## **Síntomas**

La enfermedad presenta periodo de incubación de 8-12 años, para mostrar síntomas en especies susceptibles, donde es posible observar hundimientos circulares en la corteza, formando lesiones que se agrandan paulatinamente hasta cubrir parcial o totalmente el tronco y ramas; la corteza se seca y se desprende dando lugar al síntoma de descortezamiento, (Roistacher, 1993; Navas-Castillo y Moreno, 1995). Generalmente se presenta una sustancia resinosa en la madera y corteza, produciendo decoloración en los tejidos afectados e impidiendo la circulación de la savia (Müller, 2005), provocando pérdida de vigor y con el paso de los años volviéndose improductivos (Roistacher, 1993).

La psorosis A puede ser identificada en campo, cuando se producen descortezamientos localizados afectando tronco y ramas principales mientras que la psorosis B causa descortezamiento en ramas delgadas de los árboles (Roistacher, 1993).

### **Portainjertos tolerantes a psorosis**

Mandarina cleopatra, Sunki, limón Volkameriano y Rugoso, Citrange Troyer y Carrizo, Tangelo Orlando y naranjo Agrio (Schäfer *et al.*, 2006), citrumelo Swingle (Bremer *et al.*, 2015).

### **Portainjertos susceptibles a psorosis**

Naranjo Trifoliado (Bremer *et al.*, 2015).

### **Controversia**

Carlos *et al.* (1997) señalaron a mandarino Cleopatra, Sunki y Citrange Troyer y Carrizo como tolerante y Bremer *et al.* (2015) los señalaron como portainjertos susceptibles.

### **Control**

No se reportan vectores de esta enfermedad (Pompeo, 2005), aunque existen sospechas de que semillas de citrange Carrizo pudieran transmitir el virus (Campiglia *et al.*, 1976) citado por (Pompeu, 2005), por lo que el control es basado en la prevención con la utilización de material propagativo con prueba negativa a CPsV (Carvalho *et al.*, 2002).

### **Viroides en cítricos**

Los cítricos son afectados por los viroides *Citrus exocortis viroid* - citrus (CEVd-cit), *Hop stunt viroid* - citrus (*Citrus cachexia viroid*) (HpSVd-cit), *Citrus bent leaf viroid* – citrus (*Citrus viroid* I) CBLVd-cit), *Citrus dwarfing viroid* (*Citrus viroid* IIIa) y (*Citrus viroid* IIIb), *Citrus bark cracking viroid* - citrus (*Citrus viroid* IV) (CBCVd-cit), *Citrus viroid* V – citrus (CVd V-cit), *Citrus viroid* VI - citrus (*Citrus viroid-original source*) (CVd VI-os) (ICTV, 2011).

### **Exocortis (*Citrus exocortis viroid-citrus*)**

El *Citrus exocortis viroid-citrus* (CEVd-cit) pertenece a la familia *Pospiviroidae*, género *Pospiviroid* (ICTV, 2017), constituido de ácido ribonucleico (RNA) de bajo peso molecular, de 370-372 bases, sin envoltura proteica (Semancick y Weathers, 1972), sin capacidad codificante y capaz de replicarse de forma autónoma utilizando la maquinaria transcripcional de las células que parasitan. El tamaño del genoma es de alrededor de 246-402 nt; presentan forma de varilla o ramificadas (Bagherian y Izadpanah, 2010).

La exocortis de los cítricos, se describió por primera vez en 1948, en California y Australia por Fawcett y Klotz (1948), estos autores propusieron como posible causante un factor genético o virosis.

En 1972, Semancick y Weathers demostraron que el agente responsable de la exocortis, es un viroide denominado (*Citrus exocortis viroid*).

### **Exocortis en México**

En México la ocurrencia de CEVd-cit pasa desapercibida debido al uso generalizado del portainjerto naranjo agrio, sin embargo, es común observar en plantaciones de lima persa síntomas de agrietamiento longitudinal en ramas y troncos de los árboles, esta sintomatología ha sido asociada a la presencia permanente de exocortis y viroides del grupo II y III (Almeyda-León *et al.*, 2002; Alvarado-Gómez *et al.*, 2000).

Almeyda-Leon *et al.* (2002), detectaron a CEVd-cit en 20 de 30 muestras analizadas de lima persa, provenientes de Yucatán, Veracruz, Tabasco, Colima y México; debido a diferentes orígenes geográficos y a la presencia de este viroide en las plantaciones, indica el uso continuo de material propagativo infectado. Gámez *et al.* (2003), reportaron la presencia en 37 de 90 muestras analizadas de naranjo, pomelo, limón y mandarino, no señala cuantas muestras correspondían a cada especie.

Contreras-Maya (2016), mediante RT-PCR y utilizando iniciadores específicos para CEVd-cit, obtuvo como resultado la amplificación del segmento esperado de 370 pb en 20 de las 22 muestras analizadas de lima Persa, provenientes de los municipios de Cazonas de Herrera, San Rafael, Martínez de la Torre, Misantla, Atzalan, Cuitlahuac y Amatlán de los Reyes.

## **Síntomas**

Los síntomas pueden ser visibles en plantas de cuatro o más años (Pompeu y Salibe, 2002), pudiendo observar baja densidad de follaje, alteración en el color de las hojas y reducción del crecimiento (Aguilar *et al.*, 2003).

En portainjertos susceptibles se observa agrietamiento de la parte externa de la corteza, que se levanta formando escamas de tamaño variable, las cuales quedan adheridas al tronco de la planta por la parte superior y en estado avanzado de la enfermedad caen dejando lesiones abiertas de tamaño variable (Mattos *et al.*, 2003); estas lesiones son invadidas por hongos que causan exudación de goma y frecuentemente determinan la muerte de la planta, muchas veces los síntomas de CEVd-cit se confunden con los de gomosis causada por *Phytophthora* spp., si realiza una examinación más detallada permite distinguir los síntomas de las dos enfermedades (Müller, 2005).

Duran-Vila (2004), menciona que lesiones causadas por *Phytophthora*, van acompañadas de exudación de goma y al levantar la corteza, la madera es color marrón, lo que no ocurre en el caso de las lesiones causadas por exocortis. Sin embargo, Contreras-Maya (2016), señala que productores de lima Persa de Veracruz, al observar el exudado de gomoso que genera la infección de *Phytophthora* spp., asocian la muerte de plantas a este patógeno. La infección por CEVd-cit afecta la longevidad de las plantas en huertos comerciales reduciéndola de diez a siete años (Salibe y Moreira, 1965).

## **Transmisión**

El CEVd-cit es transmitido por el uso de material vegetativo infectado, siendo de esta manera diseminado ampliamente por material propagativo asintomático. En campo y vivero, la infección ocurre mecánicamente por instrumentos de poda y corte que previamente se han empleado con plantas infectadas transmitiendo la enfermedad a plantas sanas (Garnsey y Jones, 1967, Carbonell, 2008).

## **Portainjertos tolerantes a exocortis**

Limón Volkameriano, Rugoso; mandarino Cleopatra; naranjo agrio, naranjo Caipira (Bremer *et al.*, 2015); tangelo Orlando (Efrom y Souza, 2018); naranjo dulce\*\*, Smooth Flat Seville; limón Macrophylla (*C. macrophylla* Wester); pomelos (*C. paradisi*)\*\* (Pompeu, 2005).

## **Portainjertos susceptibles a exocortis**

Lima Rangpur; naranjo Trifoliado; citrange Troyer y Carrizo (Bremer *et al.*, 2015); citrange 'Fepagro C 13' (Efrom y Souza, 2018), lima de Pérsia (*C. limettioides* Tanaka), pomelo New Zealand\*\* (Pompeu, 2005).

## **Controversia**

Carlos *et al.* (1997) señalaron a mandarino Sunki como portainjerto tolerante, sin embargo Pompeu (2005) y Bremer *et al.* (2015), lo señalan como susceptible; Carlos *et al.* (1997) señalan a citrumelo swingle como portainjerto susceptible y Bremer *et al.* (2015) como tolerante.

## **Control**

El uso de material libre de exocortis proveniente de viveros certificados, sin embargo, en campo se puede infectar por transmisión mecánica, si son intercaladas plantaciones nuevas con antiguas que pudieran ser portadoras del viroides y permanecer, asintomáticas (Duran-Vila, 2004).

## **Cachexia o xiloporosis**

La xiloporosis se reportó por primera vez en 1934 en el estado de Palestina (Reichert y Perlberger, 1934). El término cachexia fue usado años más tarde en California (Childs, 1950) y en 1977 se identificó el agente causal de la cachexia de los cítricos (Diener, 1979); Palacio-Bielsa (1999), demostró que cachexia y xiloporosis son causados por el mismo patógeno, considerado una variante del *Hop stunt viroid* - citrus (*Citrus cachexia viroid*) (HpSVd-cit) (ICTV, 2011).

El *Hop stunt viroid*-citrus (HpSVd-cit) pertenece a la familia *Pospiviroidae*, género *Hostuviroid* (ICTV, 2017) genoma circular, ssRNA (-), cuyo tamaño oscila entre 296 – 301 nt (Duran-Vila *et al.*, 1986), dependiendo del aislado y la variante. Esta familia presenta estructura secundaria estable en conformación similar a varilla o cuasi varilla con cinco dominios, región central conservada (CCR) y horquilla conservada terminal (TCH). La replicación se produce a través de un modelo de círculo rodante asimétrico, ya que se han encontrado hebras menos largas que la unidad en tejido infectado (ICTV, 2009).

Mediante indexado biológico verificaron que existen variantes patogénica y no patogénicas, comportándose como infecciones latentes en especies consideradas sensibles (Levy y Hadidi, 1993). Eiras *et al.* (2013), cita dos variantes de HpSVd-cit: "variante no patogénicas" (anteriormente incluidas como CVd-IIa) que infectan huéspedes sensibles sin inducir síntomas; y "cepas patogénicas" (antes denominadas CVd-IIb y CVd-IIc).

## **Síntomas**

Cuando el portainjerto utilizado es lima de Persia (*C. limettioides* Tanaka), el síntoma consiste en acanaladuras en el tronco (Reichert y Perlberger, 1934), en Tangelo Orlando (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macfad.), se presentan acanaladuras y proyecciones en la cascara con fuertes impregnaciones de goma (Childs, 1950). En lima Ranpur, se observan hundimientos redondeados en el tronco, los cuales pueden aparecer a los tres o cuatro años del injerto (Pompeu, 2005).

En mandarinos se presentan acanaladuras en la madera e impregnaciones de goma en la zona próxima a la línea del injerto, la madera suele estar engrosada, dando apariencia hinchada a la parte superior del injerto y en cortes transversales de la misma pueden observarse bolsas de goma. La presencia de goma puede encontrarse tanto por encima como por debajo de la unión del injerto, dependiendo de la posición de la especie sensible. En el caso de la combinación mandarino/*C. troyer* el síntoma se observará arriba de la unión del injerto y en la combinación limón/*C. macrophylla* se observa debajo de la unión del injerto, en esta combinación es posible observar escaso follaje y amarillo, detención de crecimiento y finalmente muerte del árbol (Duran-Vila, 2004).

## **Transmisión**

Mediante el uso de material vegetativo infectado, así como cualquier instrumento capaz de producir heridas al árbol (navaja, tijeras, sierra, serrucho, etc.). HpSVd-cit presenta resistencia a la degradación por lo que persisten en los instrumentos de corte y poda, incluso después de tratamientos de desinfección por calor, lo que traduce en que sean transmisibles mecánica mediante herramientas (Duran-Vila, 2004).

## **Portainjertos tolerantes a cachexia**

Limón Rugoso; naranjo Trifoliado, Agrio y Caipira; citrumelo Swingle; citrange Troyer y Carrizo, mandarino Cleopatra y Sunki (Bremer *et al.*, 2015) y Oneco (Pompeu, 2005);

citrange ‘Fepagro C 13’ (Efrom y Souza, 2018), naranjo dulce, naranjo Smooth Flat Seville (*C. aurantium*), pomelos (*C. paradisi*)\*\* (Pompeu, 2005).

### **Portainjertos susceptibles a cachexia**

Lima Rangpur; limón Volkameriano (Bremer *et al.*, 2015), tangelo Orlando (Efrom y Souza, 2018), Mandarino, lima de Pérsia (*Citrus limettioides* Tanaka), limón Macrophylla (*C. macrophylla* Wester), pomelo New Zealand (Pompeu, 2005), clementino\*\*, satsumas\*\*

### **Controversia**

Carlos *et al.* (1997), señalaron a limón volkameriano como tolerante y Efrom y Souza (2018), lo señalan como susceptible.

### **Control de cachexia**

El control se basa en medidas de prevención, utilizando material de propagación libres de cachexia, así como evitar la infección por transmisión mecánica durante las operaciones de injerto, poda y recolección (Duran-Vila, 2004).

### **Calidad de planta de cítricos**

Al inicio de la citricultura, las plantaciones se establecieron en pie franco, pero debido a la susceptibilidad a gomosis causada por *Phytophthora* spp., fue necesario realizar injertos, donde el portainjerto es un elemento clave para la producción de cítricos, debido a que confiere tolerancia a diversos factores bióticos (Ruiz *et al.*, 2018).

Las plantas utilizadas para la producción al injertarse establecen una interacción cultivar - portainjerto (Pérez-Zamora, 2004). El portainjerto induce en el injerto alteraciones en el crecimiento, tamaño, precocidad, producción, maduración y peso del fruto, coloración de

casaca y del jugo, cantidad de azúcares - acidez y otros componentes del jugo; permanencia del fruto en la planta y postcosecha, fertilidad del polen, absorción y síntesis de nutrientes, transpiración y composición química de las hojas; tolerancia a la salinidad, seca, frío, plagas y enfermedades. El injerto influye sobre el portainjerto en el desarrollo del sistema radical, resistencia al frío, seca y plagas y enfermedades (Pompeu, 2005).

“La calidad de planta se define como la capacidad que tienen los individuos para adaptarse y desarrollarse en las condiciones climáticas y edáficas del sitio, y depende de las características genéticas del germoplasma y de las técnicas utilizadas para su reproducción” (Prieto *et al.*, 2009). La calidad de planta considera la morfología (forma y estructura) y la fisiología (funciones y procesos vitales) de la planta (Johnson y Cline, 1991), características que influyen en la sobrevivencia y crecimiento inicial en el sitio (Prieto *et al.*, 2009).

### **Altura de la planta**

Las funciones principales del tallo son conducción y sostén. El meristemo apical del tallo es más complejo que el de la raíz porque de él se originan hojas, flores y frutos (Schneider, 1968).

La altura de las plantas es determinada por la variedad, portainjerto, suelo, condiciones fitosanitarias, poda y otros manejos culturales que influyen en el vigor y hábito de crecimiento. Además, el clima donde desarrolle, ejerce influencia (Sánchez, 2012). Orozco *et al.* (2010), señala que es un indicador de la superficie fotosintética y representa al mismo tiempo su capacidad para almacenar carbohidratos.

En estudios para conocer si las malformaciones de raíz afectaban la altura de la planta de limón ‘Volkameriano’, Citrumelo ‘Swingle’ y Citrange ‘Carrizo’, no encontraron interacción significativa entre portainjertos para dicha variable. Pero si diferencias significativas entre portainjertos, donde Limón ‘Volkameriano’ fue superior a Citrumelo ‘Swingle’ y Citrange ‘Carrizo’ (Arrieta *et al.*, 2014).

Grassi *et al.* (2001), mencionan que el sustrato donde desarrolle la planta, influyó en la altura de lima Rangpur (*Citrus limonia* (L.) Osbeck.). Franco *et al.* (2007), señalaron que el tipo de sustrato indujo diferencias en altura de portainjertos de lima Rangpur, limón Volkameriano (*C. volkameriana*), mandarino Sunki (*C. sunki*), mandarino Cleopatra (*C. reshni*), trifoliado (*Poncirus trifoliata*) y citrumelo Swingle (*P. trifoliata* x *Citrus paradisi*).

Schäfer *et al.* (2006), evaluaron sistemas de riego por capilaridad y microaspersión en tres portainjertos: *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., citrange 'C37' [*P. trifoliata* x *Citrus sinensis* (L.) Osb. cv. Pêra] y lima 'Rangpur' (*C. limonia* Osb.). Con relación a la altura de planta hubo comportamiento distinto entre los sistemas de riego. En el sistema por capilaridad C 37 presentó mayor longitud respecto al *P. trifoliata* y a la lima 'Rangpur' y en microaspersión *P. trifoliata* presentó mayor longitud respecto a los demás.

Lo anterior muestra que en general, todo el manejo agronómico en la etapa de vivero influye en la altura de la planta

### **Número de hojas y área foliar**

El área foliar está asociada con la mayoría de procesos agronómicos, biológicos, ambientales y fisiológicos, como la fotosíntesis, transpiración, interceptación de luz, asignación de biomasa, balance de energía y como consecuencia el crecimiento de la planta (Kucharik *et al.* 1998).

La determinación del área foliar, se puede realizar por métodos directos (destructivos) e indirectos (no destructivos) (Cabezas-Gutiérrez *et al.*, 2009). Los métodos directos son los que utilizan medidores de área foliar, que son instrumentos diseñados con este propósito y que tienen resolución del orden de mm<sup>2</sup> (Licor LI-3000; Lincoln, Nebraska, U.S.A) y los indirectos destacan los que utilizan correlaciones alométricas entre magnitudes de las hojas y el área foliar, mediciones del grado de cobertura de suelo o de la relación entre la penetración de la radiación y la estructura de la cubierta vegetal (Astegiano *et al.*, 2001).

Las hojas proporcionan carbohidratos para el crecimiento, desarrollo y mantener las funciones principales de la planta (Johnson *et al.*, 2017). Sin embargo, Arrieta *et al.* (2010), señalaron que naranjo Valencia modifica el tamaño de sus hojas, dependiendo del portainjerto utilizado, cuando está injertado en limón ‘Volkameriano’, el área foliar se incrementó en 20.26 y 16.85 % en comparación con ‘Cleopatra’ y ‘Amblicarpa’, respectivamente, además el portainjerto afecta la densidad, tamaño y forma de los estomas.

Grassi *et al.* (2001) encontraron diferencias significativas en área foliar, usando diversos sustratos en plantas de lima Rangpur. Franco *et al.* (2007) indicaron que el área foliar de la planta está en función del portainjerto y sustrato utilizado, así como también se relaciona con el porcentaje de germinación de los portainjertos utilizados.

Schäfer *et al.* (2006) señalaron que de acuerdo al tipo de portainjerto el área foliar difiere, existiendo una relación con las características fenotípicas de cada portainjerto; donde lima Rangpur presentó hojas más grandes con respecto al Citrange ‘C37’ y *P. trifoliata*; y el Citrange ‘C37’ presentó hojas más grandes que *P. trifoliata*.

Arrieta *et al.* (2014) no encontraron interacción significativa entre las variables número de hojas y área foliar en plantas con malformación de raíz; sin embargo, en la prueba de medias mostró que L. Volkameriano, superó en número de hojas a Citrumelo Swingle y Citrange Carrizo; respecto al área foliar L. Volkameriano también fue superior a C. Carrizo que a su vez superó a Citrumelo Swingle. Cabe señalar que si encontraron diferencia significativa en el área foliar respecto a la malformación de raíz presentada por la planta donde se destaca el incremento de área foliar con la intensidad de malformación. Las plantas con raíz que presentaron tres ángulos  $\leq 90^\circ$  y la raíz recta presentaron menor área foliar.

### **Materia fresca y seca de la hoja**

Cerca del 95 % de materia seca de biomasa total de las plantas está formada por compuestos de carbono, hidrógeno, oxígeno fijados a través de la fotosíntesis (Mattos *et al.*, 2005). Grassi *et al.* (2001) señalan que hay diferencias en peso de materia seca de hojas de lima Rangpur,

con relación en el sustrato en el cual se desarrolle la planta. Franco *et al.* (2007) mencionan que el peso seco de las hojas es diferente según el tipo de portainjerto utilizado, donde mandarino Sunki fue superior a limón Volkameriano, que a su vez superaron a naranjo trifoliado, habiendo diferencias estadísticas entre ellos; limon Volkameriano, Rangpur, Swingle y Cleopatra fueron no hubo diferencias estadísticas. El tipo de sustrato donde desarrollaron los portainjertos, no afectó la cantidad de materia seca aérea.

Schäfer *et al.* (2006) encontraron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea, evaluando a los portainjertos C37, *P. trifoliata*, y lima Rangpur; donde C37, superó estadísticamente a los demás; así también señalan que el riego aplicado por capilaridad y microaspersión afecta dicha variable. Arrieta *et al.* (2014) mencionaron que limón Volkameriano acumuló menor cantidad de materia seca en hojas en comparación con Citrumelo Swingle y Citrange Carrizo; donde las plantas presentaron malformación de raíz no afectaron la acumulación de materia seca. En huertos establecido de lima persa la parte aérea representó 75 % del total de la materia seca del árbol (Contreras-Morales *et al.*, 2007).

### **Raíces (principal y secundaria)**

La raíz se compone de estructurales y fibrosas, que sirven para diferentes funciones esenciales para el árbol. Las raíces estructurales actúan como las principales transportadoras de nutrientes, agua y carbohidratos. Las raíces fibrosas forman la interfaz con el suelo donde se absorben el agua y los nutrientes y oxígeno, además, son las que interactúan con hongos micorrizicos (Borges *et al.*, 2005). Raíces saludables mejoran la productividad de los árboles y tolerancia al estrés causado por heladas y sequías, además, permite el establecimiento y crecimiento del árbol, así como longevidad a las plantaciones (Johnson *et al.*, 2017).

Para que las plantas producidas a escala comercial tengan buen desarrollo es esencial conocer sobre la distribución y calidad de las raíces (Davoglio *et al.*, 2006). La raíz primaria o pivotante es la primer estructura que se desarrolla a partir del meristemo radicular del embrión de la semilla; a partir de donde se desarrollan las raíces secundarias o laterales que

a su vez originan a las terciarias, cuaternarias y así sucesivamente (Queiroz y Blumer, 2005). Castle (1987) denominó la morfología de las raíces de cítricos como bimórfico, consistiendo en una raíz primaria y las derivadas, llamadas raíces secundarias; estas últimas son clasificadas en dos tipos raíces pioneras las de mayor diámetro y las más finas como fibrosas.

Desarrollar y mantener las raíces en óptimas condiciones es importante para el establecimiento y la productividad a largo plazo de los árboles. Las raíces actúan como anclaje al suelo y absorben los nutrientes y el agua para transportarlos a la copa del árbol (hojas y frutos). En raíces dañadas, la absorción de nutrientes y agua es reducida (Johnson *et al.*, 2017).

Los portainjertos obtenidos por semilla pueden llegar a desarrollar malformación en la raíz. Estas plantas son eliminadas cuando son detectadas en vivero, sin embargo, no siempre se lleva a cabo, por lo cual las plantas con malformaciones pueden ser injertadas y establecidas en campo. La malformación de raíz puede provocar desequilibrio para parte aérea/raíz y afectar el desarrollo de los árboles. Las malformaciones en raíces no afectan su longitud pero si el volumen de mismas. En vivero no es posible diferenciar el crecimiento y desarrollo de las plantas con malformaciones en raíz y sin ella (Arrieta *et al.*, 2014). Por lo que los árboles con sistemas de raíces irregulares no deberían ser plantados (Zekri *et al.*, 2017).

Grassi *et al.*, (2001) mencionaron que las plantas de lima Rangpur, son afectadas por el tipo de sustrato donde desarrollan. Franco *et al.* (2007) señalaron que el tipo de sustrato no indujo diferencias significativas en peso seco de la raíz, pero sí de acuerdo al portainjerto utilizado, donde C. Swingle superó estadísticamente a trifoliado, habiendo diferencias estadísticas entre ellos; y Swingle, Rangpur, Volkameriano, Sunki y Cleopatra, fueron estadísticamente iguales.

Schäfer *et al.* (2006) señalaron que plantas que se cultivaron en riego por microaspersión presentaron mayor cantidad de materia seca de las raíces en comparación a las que se cultivaban con riego por capilaridad; señalan que lo anterior pudo deberse a dos factores:

primeramente, las plantas que se cultivaron bajo microaspersión sufrieron poda aérea de sus raíces, lo que no ocurrió con gran efectividad en aquellas con riego por capilaridad. La poda de la raíz principal generó brotación de raíces secundarias, por lo tanto, aumento en materia seca de las raíces. Por otra parte, el riego por capilaridad puede haber sido más eficiente, disminuyendo desarrollo de raíces y búsqueda por agua y nutrientes.

Arrieta *et al.* (2014) señalaron que la cantidad de materia seca de L. Volkameriano y Citrumelo Swingle fue igual y ambos fueron superiores a Citrange ‘Carrizo’. La malformación de la raíz no afectó la acumulación de materia seca en hojas, tallo y raíz.

### **Análisis general de la revisión de literatura**

Los programas de saneamiento y certificación, se han implementado por la necesidad de obtener material vegetal libre de patógenos transmitidos por injerto. Estos programas fueron diseñados e implementados por instituciones de investigación, asociaciones de productores, viveristas, universidades e interesados en cítricos.

Estados y países como California, Texas, São Paulo, España, y Argentina; han implementado de saneamiento y certificación, y han sido evaluados constantemente, sin embargo, en México no se ha realizado desde su implementación, además, la mayoría de las unidades de producción de material vegetal certificado, se ha manejado por particulares, y existen reportes que existió una huerta productora de semillas a cargo del Instituto Tecnológico de Úrsulo Galvan (ITUG) y un lote productor de yemas propiedad del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), sin embargo, estas unidades perdieron la certificación por causas desconocidas. Lo cual, es lamentable, ya que en otros países los responsables de la sanidad del material que se distribuye en las áreas cítricas, principalmente son instituciones gubernamentales.

En los programas de certificación, no se ha considerado la calidad de la planta que determine la supervivencia en campo, si bien, se parte de una planta sana, pero es posible que tenga problemas de raíces que finalmente afectaran su desarrollo y producción en campo.

Se ha señalado que la posición de la semilla del portainjerto, interacción injerto/portainjerto, sustrato, tipo de riego (microaspersión, capilaridad), tamaño de bolsa, entre otros factores, modifican características fisiológicas, morfológicas y anatómicas de la planta. Y aun con esta información disponible para viveristas, no se ha establecido un estándar para la producción de planta en vivero.

En México, sería conveniente usar sustratos en todo el esquema de producción de planta certificada, como lo realiza el programa de certificación de São Paulo, donde procuran que la planta se entregue al productor libre de *Phytophthora* spp.

Es conveniente analizar todo el esquema de certificación que se tiene en México, ya que en los últimos años se han reportado nuevas enfermedades, como el Huanglonbing, leprosis, tristeza de los cítricos (variantes severas); lo que hace necesario fortalecer el esquema de producción de planta de cítricos. Ya que el éxito de una plantación debe partir de entre muchos factores con “plantas de calidad”, con raíz principal recta, abundancia de raíces absorbentes, diámetro de tallo mayor a 50 mm y negativa a enfermedades causadas, por virus, viroides, bacterias y fitoplasmas.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### **Experimento 1. Detección de CTV, CPsV, CEVd-cit y HpSVd-cit en viveros citrícolas certificados y no certificados; Veracruz, México**

##### **Área de estudio**

El material vegetativo para el estudio se obtuvo en la zona citrícola de Martínez de la Torre, Veracruz; principal municipio con producción de planta de cítricos certificada por la NOM-079-FITO-2002 (DGSV, 2018). Y donde se comercializa la mayor cantidad de planta de cítricos que no cumplen con la norma señalada anteriormente.

##### **Material biológico**

En mayo-junio 2017, se compraron plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osb., *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka, *C. paradisi* Macfad. y *C. clementina* Hort. ex Tan x *C. reticulata* Blanco, en cuatro viveros certificados y cuatro no certificados. El material se identificó colocando un número a cada vivero, especie y número de planta. Las plantas certificadas se trasladaron en vehículo cerrado a Cazones de Herrera y las no certificadas a Tlapacoyan, Ver; durante el estudio se mantuvieron en invernaderos libre de insectos vectores de enfermedades. Previo ingreso a los invernaderos se realizó aplicación de insecticida sistémico y contacto; en las plantas obtenidas de VC no se observaron síntomas de alguna enfermedad. Mientras que en las plantas de VNC al momento de la compra se observaron síntomas de mancha grasienta, por lo que fue necesario la aplicación de fungicidas y podas para favorecer la emisión de nuevos brotes. Las plantas de VC y VNC se distribuyeron en dos invernaderos. Durante el estudio, las plantas se regaron cada tres días y se aplicó fertilizante (3 g planta) los tres primeros meses, con el propósito de promover brotes vigorosos, que facilitaran su procesamiento en laboratorio.

Cuadro 2. Portainjertos utilizados en la propagación de planta de cítricos en vivero certificados y no certificados.

N° de vivero	Especie	Tipo de vivero y/o portainjerto utilizado	
		Certificado	No certificado
1	Lima Persa	Limón Volkameriano	Limón Volkameriano
	Naranja Valencia	Limón Volkameriano	Limón Volkameriano
	Mandarino Fremont	Limón Volkameriano	Limón Volkameriano
	Pomelo Rio Red	Citrango Carrizo	Limón Volkameriano
2	Lima Persa	Limón Volkameriano	Limón Volkameriano
	Naranja Valencia	Limón Volkameriano	Naranja Agrio
	Mandarino Fremont	Citrumelo Swingle	Limón Volkameriano
	Pomelo Rio Red	Limón Volkameriano	Limón Volkameriano
3	Lima Persa	Limón Volkameriano	Naranja Agrio
	Naranja Valencia	Limón Volkameriano	Naranja Agrio
	Mandarino Fremont	Limón Volkameriano	Naranja Agrio
	Pomelo Rio Red	Citrango Carrizo	Naranja Agrio
4	Lima Persa	Limón Volkameriano	Limón Volkameriano
	Naranja Valencia	Limón Volkameriano	Naranja Agrio
	Mandarino Fremont	Limón Volkameriano	Naranja Agrio
	Pomelo Rio Red	Limón Volkameriano	Naranja Agrio

## Muestreo

En enero 2018 se seleccionó un brote vegetativo en crecimiento activo de cada una de las plantas en evaluación, para formar una muestra compuesta de 10 plantas (32 muestras compuestas en total). En todos los casos, la herramienta de corte se desinfectó al inicio de la actividad y después del corte de cada planta con hipoclorito de sodio al 20%. El material

vegetal se etiquetó e introdujo en bolsas de plástico dentro de una hielera para su traslado al laboratorio.

### **Extracción de ácidos nucleicos**

Los brotes vegetativos, fueron lavados con agua corriente, se secaron con papel absorbente y se procedió a separar corteza para la detección de CPsV, CEVd-cit, HpSVd-cit y nervadura para la detección de CTV, se picó finamente cada muestra con ayuda de una navaja previa desinfestación, se pesaron 0.2 g en báscula analítica y se procedió a la extracción de ácidos nucleicos.

La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó, siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983), modificado por Ortega (2017) para la detección de tristeza de los cítricos y caquexia.

- a) Se maceró 0.2 g de tejido vegetal con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, el macerado se transfirió al tubo de 1.5 ml que contenía 750 µl de buffer de extracción EB1 (100 mM Tris pH 8, EDTA pH 8, 500 mM NaCl, 10 mM mercaptoetanol), se homogenizó 30 s en vórtex, se agregaron 75 µl de SDS 20 %, se mezcló por inversión cinco veces, se incubó en baño Termostático "Labnet" a 65°C por 20 min, mezclando por inversión cada 5 min., posteriormente se agregaron 250 µl de acetato de potasio 5 M (frío) y se incubó en hielo por 20 min, los tubos se centrifugaron a 15,000 rpm se transfirieron 900 µl de la fase acuosa (parte superior) a un tubo de 1.5 ml que contenía 540 µl de isopropanol frío y se mezcló por inversión cinco veces. Los tubos se incubaron a -20 °C por 30 min y se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar por diez minutos a temperatura ambiente. La pastilla se disolvió suavemente en 700 µl de buffer de extracción EB2 (50 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8) y se centrifugaron a 15,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se transfirieron 500 µl de la parte superior y se colocaron en un tubo que contenía 75 µl de acetato de sodio 3M y 500 µl de isopropanol, se mezcló por inversión de 5 a 10 veces y se centrifugó a 15000

rpm por 4 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75% a 15,000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. El precipitado conteniendo el extracto de ácidos nucleicos se disolvió en 50 µl, de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C hasta el momento de la utilización.

- b) Se verificó la calidad del RNA por PCR, usando iniciadores específicos para el gen 18Sr. Se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm de longitud de onda usando un espectrofotómetro (NanoDrop™ 2000), para conocer la calidad de RNA la cual debe estar entre 1.8 y 2.0 para ser considerada de buena calidad (Sambrook *et al.*, 1989). La integridad de los ácidos nucleicos se visualizó en gel de agarosa al 1%.

Para la detección de psorosis y exocortis se realizó extracción de RNA total con TRIzol® Reagent (InvitrogenMT, AccesoLabR, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante, para cada extracción se utilizaron 0.1 g de tejido y la pastilla de RNA obtenida se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas.

El RNA utilizado como control positivo fue proporcionado por el Colegio de postgraduado Montecillo, obtenido en estudios previos, como testigo negativo el RNA fue sustituido por un volumen de agua.

### **Retrotranscripción – Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

Las muestras se analizaron mediante RT-PCR, utilizando iniciadores específicos. En el caso de CTV fueron “CPKF” (5'-AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA-3') y “CPKR” (5'-TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC-3') que amplifican un producto de ~273 pb, de un fragmento del gen p25 que codifica a la cubierta proteica en el extremo 3' (Rivas *et al.*, 2008); para CPsV “PS66” (5'TCGAAGCTGTATGATGGTGA-3') y “PS65” (5'-TGCCATCTGGAGTGAGGCT-3') que amplifican un fragmento de la proteína del gen de la cubierta proteica de ~430 pb (Martín *et al.*, 2004). Para HpSVd-cit se utilizaron los iniciadores “CVd-II-h” (5'-CGCCCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCC-3') y “CVd-II-c” (5'-GCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG-3'), que amplifican un producto de ~300 pb

(Targon *et al.*, 2006), y para CEVd-cit los iniciadores “CEVd-F” 5'-GGAAACCTGGAGGAAGTCG-3' y “CEVd-R 5'-CCGGGGATCCCTGAAGGA-3', que amplifican un producto aproximado de 370 pb (Gross *et al.*, 1982).

La mezcla de reacción de la retrotranscripción consistió en 0.5 µL de los iniciadores respectivos, 2 µL del producto de extracción de cada una de las muestras procesadas y 4 µL de agua; los tubos se incubaron a 70 °C por 5 min en y posteriormente se colocaron en hielo por 10 min. Inmediatamente después a cada tubo se adicionaron 2 µL Buffer 5X de M-MLV, 1 µL de DTT 10 mM, 0.5 µL de dNTP's Mix (10 mM), 0.5 µL de MMLV Reverse Transcriptase y se incubaron a 42°C por 60 min y 70°C por 10 min.

La mezcla de reacción de la PCR para todos los casos consistió en 2 µL de buffer de reacción (5X Green GoTaq®), 0.4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.2 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL (10 µM) de cada iniciador, 5.1 µL de agua libre de nucleasas, 0.1 µL de GoTaq® DNA Polymerase (5U/µL) y 2 µL de cDNA en un volumen final de 11 µL.

Los programas de amplificación se efectuaron en un termociclador Techne® TC-512 de la siguiente manera, para CTV 1 ciclo a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min (Rivas *et al.*, 2008); para CPsV 1 ciclo a 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 seg, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min (Martín *et al.*, 2004). Para HpSVd-cit y CEVd-cit se utilizó 1 ciclo a 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, 72°C por 30 seg y una extensión final a 72°C por 10 min (Almeyda *et al.*, 2003).

## **Electroforesis**

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. Los productos amplificados fueron secuenciados en MacroGen®, y comparados en la base de datos del GenBank®.

Los productos de RT-PCR resultantes se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio a 85 V durante una hora. El gel se visualizó en un transiluminador de luz UV QUANTUM ST5® (Vilver Lourmat).

### **Secuenciación**

Las muestras que amplificaron al segmento esperado, se enviaron a Macrogen Inc. Korea para secuenciación. Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa MEGA y se compararon con las depositadas en el GEN BANK.

## **Experimento 2. Evaluación de la calidad morfométrica en plantas de cítricos de viveros certificados y no certificados.**

### **Metodología**

#### **Área de estudio**

Las plantas fueron adquiridas en viveros certificados y no certificados en la zona citrícola de Martínez de la Torre, Ver.

#### **Material vegetal**

Se evaluaron plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osb., *C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka, *C. paradisi* Macfad. y *C. clementina* Hort. ex Tan x *C. reticulata* Blanco, injertadas en *C. volkameriana* V. Ten. & Pasq. y *Citrus aurantium* L. producidas en viveros certificados y no certificados.

#### **Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental fue parcelas divididas con arreglo completamente al azar, la parcela grande (tipo de vivero certificado y no certificado) y parcela chica las cuatro especies con 10

repeticiones. La unidad experimental se constituyó de una planta. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS<sup>®</sup> 9.3 (SAS Institute, 2009), se realizó análisis de varianza y prueba de medias por Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## **Variables evaluadas**

### **Altura de planta**

Se midió la longitud del tallo (cm) con una regla graduada (0.1 mm), desde la base del cuello, hasta el ápice, se reportó en cm.

### **Número de hojas**

Se retiraron las hojas manualmente de cada una de las plantas estudiadas y se contó el total de hojas por planta, se colocaron en bolsas de papel estraza y se llevaron al laboratorio de Fisiotecnia Vegetal, Colegio de Postgraduados para posteriores análisis. Se evaluó peso de materia fresca y seca de todas las hojas.

### **Área foliar**

Se midieron todas las hojas de cada una de las planta, usando un integrador de área foliar, LI-310 (LICOR<sup>®</sup> INC., Lincon, Nebraska, USA).

### **Materia fresca y materia seca de la raíz principal y secundarias**

La planta se disecto en raíz primaria y secundaria/terciarias. Se tomó el peso individual de materia fresca de raíces y se reportó en gramos. Las muestras se colocaron en bolsas de papel estraza con perforaciones y se pusieron en horno de secado con circulación forzada de 70°C hasta obtener peso constante (aproximadamente 3-4 a días). Después se evaluó el peso de

materia seca y se reportó en gramos. Para esta medición se utilizó una báscula analítica Marca OHAUS con aproximación de 0.01 g.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Experimento 1. Detección de CTV, CPsV, CEVd-cit y HpSVd-cit en viveros cítricos certificados y no certificados; Veracruz, México

##### Tristeza de los cítricos [*Citrus tristeza virus* (CTV)]

Ninguna planta proveniente de viveros certificados amplificó el fragmento esperado, lo cual sugiere que la aplicación del esquema de certificación cumple el objetivo de propagar plantas libres de este patógeno.

Una planta de naranjo Valencia proveniente del vivero 1 no certificado, amplificó el fragmento esperado de ~273 pb, (Figura 1) su secuencia presentó 99% de similitud con *Citrus tristeza virus* (Número de acceso MH995528).

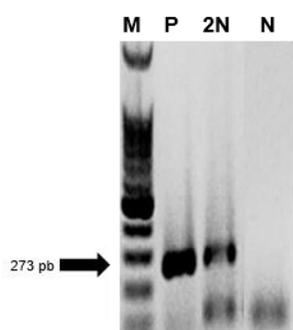


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para CTV (~273 pb). P: control positivo, 2N: Naranjo Valencia, N: control negativo. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®).

La muestra positiva representa 6.25 % del total analizado y 25 % de las correspondientes a naranjo Valencia de viveros no certificados. La detección de un positivo, indica que se está propagando este virus en viveros que no cumplen con lo establecido en la NOM-079-SAG/FITO-2017, por lo que es necesario producir toda la planta en viveros certificados como se realiza en California, Florida (Douhan *et al.*, 2016), España (Martínez, 2006) y São Paulo (Santos *et al.*, 2000).

La muestra positiva a CTV fue de naranjo Valencia injertado en limón Volkameriano. Cabe indicar que en México desde 1983, se tienen los primeros reportes de tristeza de los cítricos en huertos de naranjo Valencia, debido posiblemente a la introducción de material vegetal infectado de otras áreas citrícolas, dado que los viveristas no certificados colectan material vegetativo de cualquier planta desarrollada en campo, esto pone en evidencia el estado fitosanitario de la planta madre (Rizzo et al., 2017). La presencia de pulgón café en México desde 2000 (Michaud y Álvarez, 2000), facilitó la dispersión del patógeno, por lo que los viveros a cielo abierto son un riesgo y la producción de yemas debe hacerse en espacio protegido.

En 1983 se reporta por primera vez al CTV en México en un vivero de Tamaulipas, en 1986-87 se detecta en un campo experimental y lote demostrativo de variedades de cítricos en Veracruz, en 1992 se encuentra en dos viveros en Veracruz y en 1993 en siete viveros en Tlapacoyan, cuatro en Martínez de la Torre, dos en Álamo Temapache y uno en Tuxpan, Veracruz y en todos los casos las plantas positivas fueron eliminadas (Colli y Cárdenas, 1995). Todo lo anterior muestra que se continúa propagando material infectado por CTV en viveros no certificados, lo que perjudica gravemente la citricultura nacional.

La enfermedad en vivero puede presentarse por el uso de yemas infectadas con CTV (Anónimo, 2006) como lo ocurrido en Tuscany, Italia, donde se detectaron 24 plantas positivas de 130 analizadas (Rizzo *et al.*, 2017). Debido a que las yemas de viveros no certificados son de origen desconocido, probablemente sean la fuente de infección.

La campaña contra CTV en México, estuvo vigente hasta 2007, debido a que no se presentó muerte masiva de plantas, como en Argentina, Brasil, Uruguay, Colombia, Perú, California, España y Venezuela (Costa, 1956; Fawcett, 1946; Cambra *et al.*, 1988; Mendt, 1992) y sólo se reportó la presencia de variantes benignas (SAGARPA, 2006; SENASICA, 2017). Sin embargo, Rocha-Peña *et al.* (1998), señalan que aún en ausencia de síntomas de la enfermedad puede permanecer latente por muchos años e incluso décadas y posteriormente

observarse el decaimiento de las plantaciones debido al aumento o invasión de nuevos áfidos vectores, por lo que Iracheta *et al.* (2010), sugirieron que debían permanecer las campañas de detección del CTV a nivel mundial. El resultado de esta investigación confirma la necesidad de implementar medidas para eliminar los viveros no certificados y que es fundamental el uso de portainjertos tolerantes a la enfermedad, como medida preventiva.

### **Psorosis [*Citrus psorosis virus* (CPsV)]**

No se detectó al CPsV en las muestras analizadas de viveros certificados y no certificados. En el primer caso, puede deberse a que este patógeno está regulado por la NOM-079-SAG/FITO-2017, y también a que al no tener vector, se facilita preservar de plantas libres de este virus.

El resultado negativo en viveros no certificados pudo deberse a que la detección de aislamientos de CPsV es afectada por la concentración del virus en el tejido vegetal (Djelouah *et al.*, 2000). Martín *et al.* (2002), mencionan que las condiciones ambientales pueden afectar la detección del patógeno mediante RT-PCR, lo cual pudo haber ocurrido en el presente estudio, dado que todas las plantas se desarrollaron en espacio protegido. En México no existen reportes de detección de CPsV en plantas de vivero, pero sí en campo (Iracheta, 2004; Contreras-Maya *et al.*, 2018).

### **Exocortis [*Citrus exocortis viroid-citrus* (CEVd-cit)]**

Diez muestras de viveros certificados (de un total de 16 muestras), amplificaron el fragmento esperado de ~370 pb, las cuales representan el 62.5 % del total. De ellas, tres correspondieron a lima Persa (75 %), dos de naranjo Valencia (50 %), dos de mandarino Fremont (50 %) y tres de pomelo Rio Red (75 %) (Figura 2). Las secuencias de estas muestras (Números de acceso MH995515, MH995516) tuvieron 100% de similitud con *Citrus exocortis viroid-citrus*.

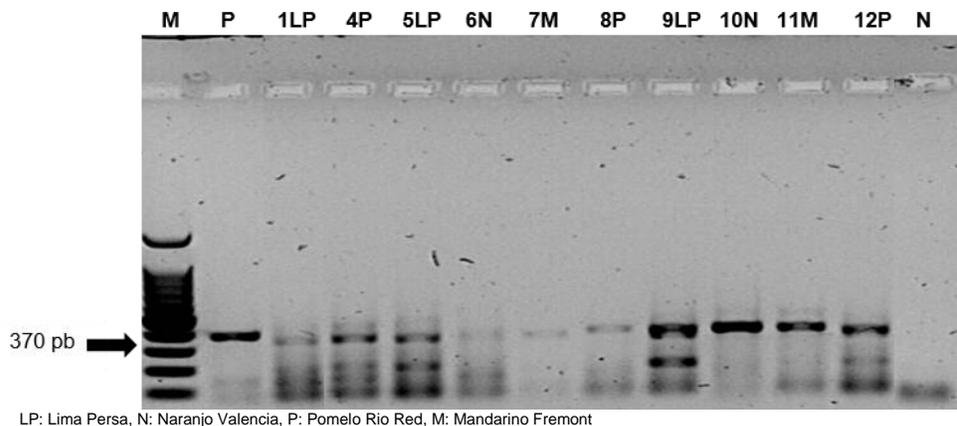


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR con los iniciadores específicos para CEVd-cit (~370 pb). Cada carril corresponde a una muestra. P: testigo positivo y N: testigo negativo agua. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®).

La presencia de muestras positivas a CEVd-cit en plantas de cítricos provenientes de viveros certificados, muestra que pudo haber transmisión mecánica mediante herramienta de corte, o uso de material vegetal infectado. Con base en lo anterior, podemos señalar que el programa de certificación de cítricos en México debe ser analizado para encontrar el origen del problema que puede estar presente en más viveros. Debido a que, la transmisión puede estar relacionada con el uso de yemas infectadas es necesario evaluar los lotes productores de yemas, lote fundación y banco de germoplasma. Por otra parte, tomando en cuenta que los viveros hacen análisis cada tres años para detectar la posible presencia de viroides, y dado que tienen certificación significa que presentaron resultados negativos a exocortis, por lo que, también se tienen que evaluar los laboratorios aprobados. Vidalakis (2016), señala que en el periodo de 2005-10, la tasa de infección por viroides en California fue de 4.3 a 9.5%. Desde 2010, el programa ha analizado más de 10,000 muestras para eliminar aquellas positivas con lo cual se redujo la tasa de infección por viroides en 0.5%; lo cual muestra que esta medida disminuye la diseminación de este patógeno y debería aplicarse en México para reducir la incidencia.

En viveros no certificados 93.75 % del total de las muestras analizadas fueron positivas, de las cuales 100 % corresponden a naranja Valencia, 100 % lima Persa, 100 % Pomelo y 75 % mandarina Fremont (Figura 3). Las secuencias obtenidas (Números de acceso MH995510,

MH995511, MH995512, MH995513, MH995514) tuvieron 98 y 99 % de similitud con *Citrus exocortis viroid-citrus*.

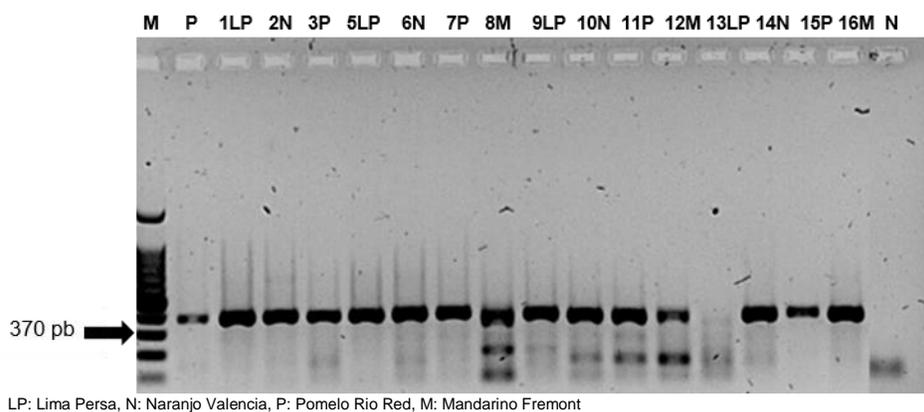


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR con iniciadores específicos para CEVd-cit (~370 pb). Cada carril corresponde a una muestra. P testigo positivo y N: testigo negativo. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®).

La alta incidencia de muestras positivas en viveros certificados, pone en evidencia que el programa de certificación tiene carencias y es preocupante porque los productores compran plantas infectadas que se venden como sanas.

Tomando en cuenta que a la fecha no se conocen insectos vectores de este viroide, la infección registrada en estos viveros puede ser debido al uso de material infectado, transmisión mecánica por uso de herramienta contaminada al momento del injerto y al manejo inadecuado de plantas en vivero. Es importante destacar que de acuerdo al resultado de los análisis realizados cada tres años a los lotes productores de yemas, los viveristas están seguros de utilizar material vegetativo sano y no les corresponde a ellos verificar los resultados, por lo que no pueden ser los responsables dado que cumplen con la normatividad establecida.

Por lo anterior, es indispensable regular la producción de plantas tanto en viveros certificados como no certificados con fines ornamentales o de producción. Para evitar la diseminación de

viroides mediante transmisión mecánica durante operaciones de injerto, poda y recolección es eficaz el uso de la solución de hipoclorito de sodio al 20 %, ya que, a diferencia de los virus, los viroides son estables y pueden transmitirse con cualquier instrumento capaz de efectuar heridas en el árbol (Duran-Vila, 2004; Müller *et al.*, 2005).

### **Caquexia [*Hop stunt viroid-citrus* (HpSVd-cit)]**

En viveros certificados se obtuvo el fragmento esperado de ~300 pb para *Hop stunt viroid-citrus*, causante de caquexia en cítricos (Figura 4), en tres muestras del total analizadas que representan 18.75 %: una muestra de lima Persa (una de cuatro 25 %), una de naranjo Valencia (una de cuatro, 25 %) y una de mandarino Fremont (una de cuatro, 25 %). Las secuencias obtenidas (Números de acceso MH995525, MH995526, MH995527) tuvieron 100% de similitud con *Hop stunt viroid-citrus*.

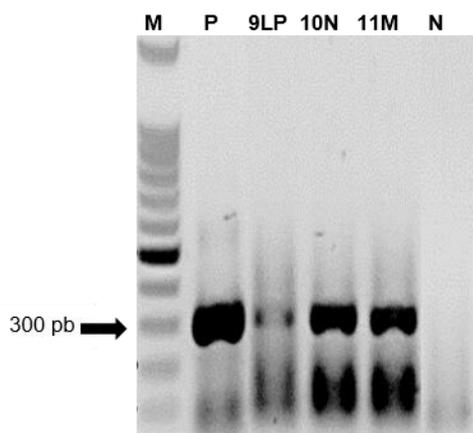


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR con los iniciadores específicos para HpSVd-cit (~300 pb). P: Control Positivo, 9LP: Lima Persa, 10NV: Naranja Valencia, 11MF: Mandarino Fremont, y N: control negativo. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®).

En México no existen reportes de caquexia en viveros; sin embargo, el hecho de que plantas provenientes de viveros certificados sean positivas, pone en evidencia que hay carencias en el sistema de producción, debido a que solo se transmite por material vegetativo infectado, o

bien, a que no se desinfectan las herramientas de trabajo. Se desconocen las causas del porqué en la certificación anual de los viveros no se han detectadas plantas positivas.

En los viveros no certificados el 100% de las muestras analizadas amplificaron el fragmento esperado (Figura 5). Las secuencias obtenidas (Números de acceso MH995517, MH995518, MH995519, MH995520, MH995521, MH995522, MH995523, MH995524) tuvieron de 98 a 100% de similitud con *Hop stunt viroid-citrus*.

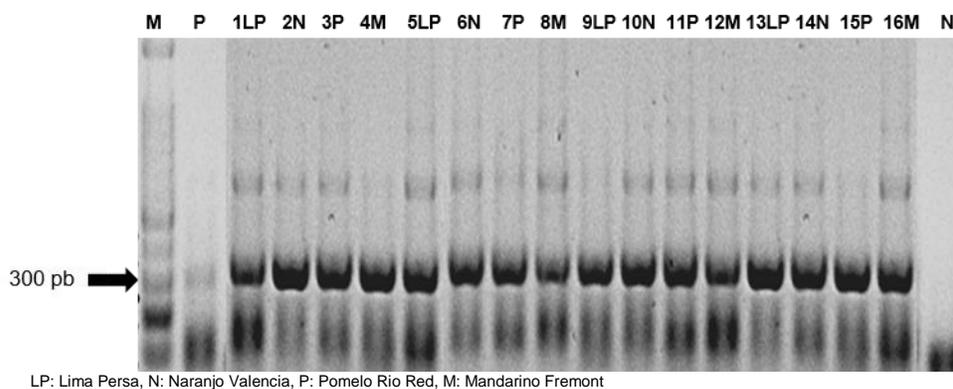


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR con iniciadores específicos para HpSVd-cit (~300 pb). P: control positivo, 1: LP, 2: N, 3: P, 4: M, 5: LP, 6: N, 7: P, 8: M, 9: LP, 10: N, 11: P, 12: M, 13: LP, 14: N, 15: P, 16: M, y N: control negativo. M: Marcador de peso molecular 100 pb (Promega®).

Dado que todas las plantas de los viveros no certificados provenían de cuatro viveros distribuidos en diferentes puntos de Martínez de la Torre, sugiere que la distribución de HpSVd-cit se debe al uso de material infectado; Rizzo *et al.* (2017) encontraron 27 muestras positivas a HpSVd-cit de 130 analizadas, lo que pudo deberse al uso de material enfermo o la inadecuada desinfección de la herramienta de corte.

Al integrar los resultados de los diferentes patógenos se observa que, en los viveros certificados, hay infección mixta por CEVd-cit y HpSVd-cit, lo cual muestra que existen anomalías en algún eslabón del proceso de certificación y no es posible señalar donde está ocurriendo la falla por lo que es necesario revisar y, en su caso modificar, los programas de certificación de acuerdo con la problemática existente (Krueger *et al.*, 2005). Mientras que, en los viveros no certificados hay infección mixta por CTV, CEVd-cit y HpSVd-cit, debido

a que CTV tiene un vector es posible que más plantas estén contaminadas por este virus y muestra el riesgo que corren las personas que compran este tipo de plantas, por otra parte, la incidencia de CEVd-cit y HpSVd-cit (93.7 y 100 % respectivamente), muestran que son un factor importante de diseminación de viroides en campo por lo que se deberían implementar medidas para erradicarlos.

Debido a que los viveristas certificados cumplen con lo establecido en la NOM-079-SAG/FITO-2017 es importante determinar qué parte de la cadena de certificación está fallando. Es deseable que una instancia no gubernamental evalúe el programa de certificación y se implementen los cambios necesarios para hacer más eficiente su aplicación.

## **Experimento 2. Evaluación de la calidad morfológica en plantas de cítricos de viveros certificados y no certificados**

Como parte del programa de reconversión citrícola que se implementó en 2002 en México, se introdujeron portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos, siendo limón Volkameriano uno de los más usados. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, no se prohibió la producción de planta en viveros no certificados, por lo que además del portainjerto naranjo agrio, usado ampliamente, adoptaron a limón Volkameriano para la producción de planta no certificada, sin aplicar la regulación de la sanidad del material utilizado en el injerto y sin contar con un esquema que protegiera la planta de insectos vectores de tristeza de los cítricos y Huanglongbing.

En cambio, en viveros certificados, existe mayor diversidad de portainjertos tolerantes a tristeza de los cítricos, como Citrumelo Swingle, Carrizo, C35, mandarino Cleopatra, Amblicarpa y limón Volkameriano de los más comerciales. Los portainjertos influyen en el desarrollo vegetativo, producción y calidad de los frutos cítricos, en función de la especie del portainjerto, tipo de suelo y clima donde se cultiven (Curti *et al.*, 2012). Arrieta *et al.* (2009) señalaron que el portainjerto afecta la densidad, tamaño y forma de los estomas, por lo que es importante conocer las diferencias que existen entre especies de cítricos injertadas en limón Volkameriano, provenientes de viveros certificados y no certificados.

El análisis de varianza mostró efecto significativo del tipo de vivero en cada una de las variables evaluadas. El factor especie, mostró diferencias significativas para: área foliar, PMFRP y PMSRP. Es importante hacer notar que existe efecto significativo de la interacción entre ambos factores para la mayoría de las variables, con excepción de número de hojas y PMSRS.

Cuadro 3. Resumen de valores de probabilidad asociados a los análisis de la varianza para las variables altura de planta, número de hojas, área foliar, peso de materia fresca y seca de raíz principal, peso de materia fresca y peso de materia seca de raíces secundarias en plantas de cuatro especies de cítricos, provenientes de viveros certificados y no certificados.

Factor	Altura (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	PMFRP (g)	PMFRS (g)	PMSRP (g)	PMSRS (g)
Tipo de vivero	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Especie	0.2107	0.0679	0.0334	0.0267	0.1626	0.0019	0.1408
Tipo de vivero x Especie	0.0197	0.0670	0.0127	0.0013	0.0115	0.0086	0.2725

PMFRP(g): Peso de materia fresca de raíz principal; PMFRS(g): Peso de materia fresca de raíces secundarias; PMSRP(g): Peso de materia seca de raíz principal y PMSRS(g): Peso de materia seca de raíces secundarias.

### Altura de la planta

El Cuadro 4, muestra que naranjo valencia, limón Persa, mandarino Fremont y pomelo Rio provenientes de viveros certificados fueron superiores en altura de planta, cuando se compararon con las mismas especies provenientes de viveros no certificados, lo cual pudo deberse al manejo agronómico realizado a dichas plantas. Se observó, que el sustrato que se utiliza en los viveros certificados estaba compuesto por arena, tierra y tepezil, Mientras que, en las plantas de los viveros no certificados se usa tierra. Grassi *et al.* (2001), mencionan que el sustrato donde desarrolle la planta, influyó en la altura de la planta de lima Rangpur (*Citrus limonia* (L.) Osbeck,). Franco *et al.* (2007), señalaron que el tipo de sustrato indujo diferencias en altura de portainjertos de lima Rangpur, limón Volkameriano (C.

*volkameriana*), mandarina Sunki (*C. sunki*), mandarina Cleopatra (*C. reshni*), trifoliado (*Poncirus trifoliata*) y citrón Swingle (*P. trifoliata* x *Citrus paradisi*).

Cuadro 4. Medias de las variables evaluadas en plantas de naranjo Valencia, lima Persa, mandarina Fremont, pomelo Río Red injertadas en limón Volkameriano, provenientes de viveros certificados y no certificados.

Tipo de vivero	Especie	Altura (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	PMFRP (g)	PMFRS (g)	PMSRP (g)	PMSRS (g)
Certificado	Naranjo Valencia	147.90 a	131.70 a	3598.58 a	42.76 a	19.65 a	24.50 a	12.72 a
	Lima Persa	150.15 a	89.50 a	2772.30 a	24.33 b	18.52 a	14.17 b	13.57 a
	Mandarino Fremont	153.35 a	174.10 a	3367.28 a	31.23 ab	18.81 a	16.63 ab	11.79 a
	Pomelo Río Red	153.30 a	79.70 a	3206.93 a	43.11 a	24.50 a	24.51 a	14.24 a
No Certificado	Naranjo Valencia	80.29 b	20.67 b	502.40 b	10.92 c	5.48 b	6.20 c	2.95 b
	Lima Persa	79.33 b	25.70 b	595.90 b	10.56 c	5.29 b	5.63 c	2.96 b
	Mandarino Fremont	62.79 b	23.60 b	255.85 c	12.35 c	2.82 b	6.34 c	1.63 b
	Pomelo Río Red	62.98 b	21.50 b	362.68 bc	9.25 c	3.51 b	5.83 c	2.53 b

<sup>Z</sup> Medias con la misma letra, dentro de columnas, son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). PMFRP(g): Peso de materia fresca de raíz principal; PMFRS(g): Peso de materia fresca de raíces secundarias; PMSRP(g): Peso de materia seca de raíz principal y PMSRS(g): Peso de materia seca de raíces secundarias.

### Número de hojas y área foliar

El naranjo Valencia, limón Persa, mandarina Fremont y pomelo Río Red superaron estadísticamente en número de hojas a las mismas especies producidas en vivero no certificado (Cuadro 4), destacando mandarina Fremont de VC que emitió 174 hojas vs 23 hojas de mandarina Fremont producido en VNC, este factor puede ser debido al sustrato utilizado y tamaño de bolsa empleado en ambos esquemas de producción. Arrieta *et al.* (2014), reportaron que en su estudio en especies de portainjertos de cítricos no injertados Limón ‘Volkameriano’ superó en número de hojas a Citrón ‘Swingle’ y Citrange ‘Carrizo’.

El naranjo Valencia, limón Persa, mandarina Fremont y pomelo Río Red desarrollaron mayor área foliar que las mismas especies provenientes de viveros no certificados (Cuadro 4).

Naranja Valencia de VC presentó el valor más alto para esta variable 3598.58 cm<sup>2</sup> vs 502.40 cm<sup>2</sup> para la misma especie proveniente de VNC. Cabe señalar que el área foliar, es un factor de la planta que determinan la intensidad de transpiración, ya que los estomas se encuentran en la superficie foliar permitiendo el intercambio de gases (Azcon y Talon, 2013), sin embargo, el tamaño del poro (ancho y largo), varía de acuerdo a la especie de cítricos analizada. Arrieta *et al.* (2010), mencionaron que el portainjerto afectó la densidad, tamaño y forma de los estomas en naranja 'Valencia', dado que, con 'Cleopatra' observó mayor densidad estomática, con 'Amblicarpa' los estomas más largos y anchos, mientras que con 'Volkameriano' menor densidad estomática y diámetro de estomas, pero mayor área foliar que en los otros portainjertos. Lo cual, pudiera señalar que plantas injertadas en limón Volkameriano desarrollen mayor área foliar debido a que el número de estomas es menor en comparación con otros portainjertos.

### **Peso de raíz principal**

Pomelo Rio Red y Naranja Valencia presentaron mayor peso de materia fresca de raíz principal, 43.11 g y 42.76 g, respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre estas especies, que superaron a mandarina Fremont que a su vez superó a lima Persa en plantas de viveros certificados, siendo superiores a plantas de las mismas especies que se produjeron en viveros no certificados, en las cuales no hubo diferencias significativas entre ellas. El hecho de que naranja Valencia y Pomelo Rio injertadas en limón Volkameriano que se produjeron en viveros certificados hayan superado a las plantas de viveros no certificados, pudiera ser por el tipo de sustrato en el que desarrollaron favoreciendo un mejor desarrollo de raíz. Grassi *et al.*, (2001) mencionaron que las raíces de lima Rangpur, son afectadas por el tipo de sustrato donde desarrollan. Franco *et al.* (2007), señalaron que Swingle, Rangpur, Volkameriano, Sunki y Cleopatra, fueron estadísticamente iguales en peso de raíz.

Hay que resaltar que la raíz es el órgano de la planta que se encarga del almacenamiento de reservas y fijación de la planta, sin embargo, de la raíz principal son emitidas las raíces secundarias y terciarias (Queiroz y Blumer, 2005, Azcon y Talon, 2013) y si se tienen problemas de raíz pueden afectar los procesos fisiológicos y bioquímicos de la planta.

## **Peso de raíces secundarias**

El comportamiento del peso de la materia fresca y materia seca de las raíces secundarias fue similar, para las plantas de naranjo Valencia, lima Persa, mandarino Fremont y pomelo Rio Red, provenientes de VC, superaron estadísticamente a las mismas especies cuando se produjeron en viveros no certificados. Cabe hacer notar que dichas raíces son las encargadas de la absorción de agua y nutrientes (Queiroz y Blumer, 2005, Azcon y Talon, 2013).

Schäfer *et al.* (2006), encontraron en su estudio que plantas que desarrollaron en riego por microaspersión presentaron mayor cantidad de materia seca de las raíces en comparación a las que se cultivaban en riego por capilaridad.

Cabe señalar que de acuerdo a lo observado en VNC las plantas presentaron pudrición de raicillas, lo cual pudo afectar el peso de las mismas, así también, dichas plantas en su mayoría son producidas en suelo, se lleva a cabo el injerto y ya que el injerto desarrollo son arrancadas con pala y pasadas a bolsa de plástico, en dicha actividad pudieron haberse cortado las raíces absorbentes.

En plantas de viveros certificados y no certificados se presentaron problemas de raíz denominado comúnmente “cola de cochino”, en viveros certificados 20% (Figura 9a) presentaron dicho problema y en viveros no certificados 12.5 % (Figura 9b), desconocemos la causa de lo anterior, nosotros esperábamos que debido al mejor manejo que se da en viveros certificados el problema debería ser menor que en los no certificados.

Arrieta *et al.* (2014), señalaron que la malformación de raíz puede afectar la disponibilidad de agua por la planta. Dicha malformación es provocada por errores de manejo del trasplante de los portainjertos en vivero, así también a la siembra de los portainjertos que generalmente es realizada al voleo por lo que no hay control de la posición de semilla al momento de la siembra y al emerger la radícula se llegan a formar deformaciones de raíz. Zekri *et al.* (2017) señalaron que plantas con sistemas de raíces irregulares no deberían ser plantados.

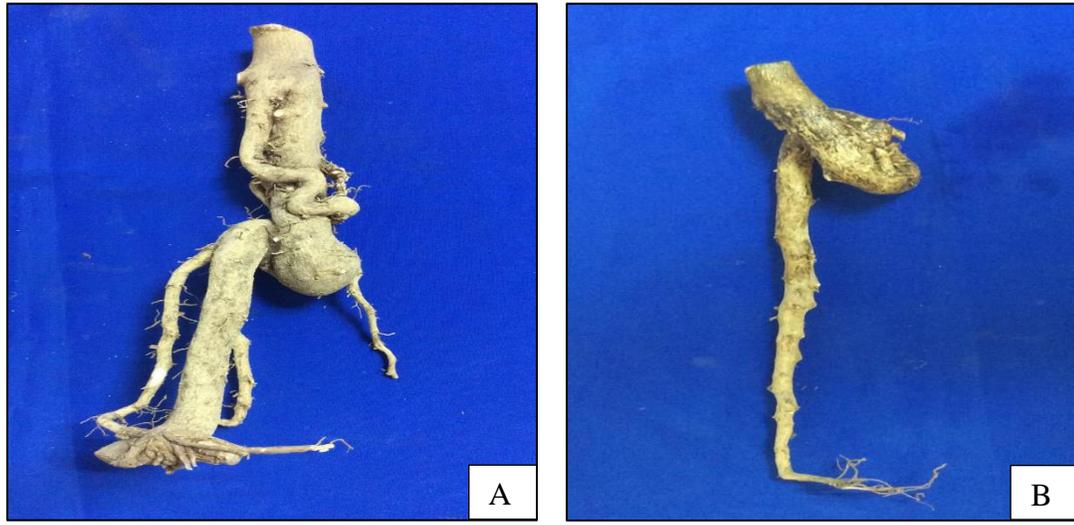


Figura 8. Raíz de pomelo Rio Red con “cola de cochino” proveniente de vivero certificado (a) y vivero no certificado (b).

## V. CONCLUSIONES

En plantas provenientes de viveros certificados de cítricos se detectó a CEVd-cit y HpSVd-cit, por lo que es necesario revisar el esquema del proceso de certificación que se utiliza actualmente.

En plantas provenientes de viveros no certificados se detectó a CTV, CEVd-cit y HpSVd-cit, por lo que sería conveniente la eliminación de este tipo de propagación.

Algunos viveros certificados y no certificados, son fuente de dispersión de enfermedades cuarentenarias, por lo que ponen en riesgo la citricultura del país.

Debido a que los viveristas certificados hacen análisis cada tres años para CEVd-cit y HpSVd-cit, presentan pruebas negativas para los mismos, y cumplen con la normatividad vigente, en primera instancia, no pueden ser considerados como responsables de los resultados aquí obtenidos, sin embargo, no se corroboró en la presente investigación.

Las plantas de vivero certificados superaron estadísticamente en altura de planta, número de hojas, área foliar peso fresco de raíz principal–secundarias y peso seco de raíz principal–secundarias.

## VI. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. 1998. Fitopatología; 3 edición; Editorial Limusa, Mexico.
- Albiach-Martí, R. M., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, E. M., Shanker, S., Almira, C. E., Vives, C. M., Lopez, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, M. S. & Dawson, O. W. 2000. Sequences of citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical. *Journal of virology*, 74(15): 6856–6865.
- Almeyda León, I., & Iracheta Cárdenas, M., & Orona Castro, F., & Kahlke, C., & Rocha Peña, M. (2003). Extracción Simple de Ácidos Nucléicos para la Detección de Viroides de Cítricos Mediante RT-PCR. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3), 364-369.
- Alvarado-Gómez, G. O, Rocha-Peña, A. M., Silva-Vara, S., Martinez-Soriano, P. J., Lee, F. R., Rivera-Bustamante, R. and Ruíz-Beltran, P. 2000. Citrus Exocortis and Citrus Cachexia Viroids in Commercial Groves of Tahiti Lime in México. In: Graça, V. J., Lee, F. R. & Yokomi, K. R. (eds). *Proceedings fourteen Conference* (pp. 289-293). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de <https://iocv.ucr.edu/proceedings/fourteen/289-293.pdf>. Fecha de consulta: 02/09/2018.
- Alves, C. S., Antonio, M. M., Walter, M. G. e Coletta, F. D. H. 2001. Produção de borbulha básica para formação de mudas de citros sadias em são paulo. *Laranja, Cordeirópolis*, 22 (1)185-201.
- Alves, C. S., Dibbern, G. C. C., e Ricardo, V. A. 2005. Produção de material básico e propagação. Pp 280-310. In Mattos, J. D., Dagoberto, N. J., Mary, P. R., e Pompeu, J. J. (Eds.). *Citros. Cordeirópolis, São Paulo. Brazil: Centro APTA citros Sylvio Moreira.*
- Anónimo. 2006. Citrus Clonal Protection Program (CCPP). Recuperado de <http://ccpp.ucr.edu/news/Jan-06-Budwood-Suspended.html>. Fecha de consulta: 05/07/2018.
- Anónimo. 2009. Citrus Clonal Protection Program (CCPP). 2009. Recuperado de <http://ccpp.ucr.edu/>. Fecha de consulta: 01/01/2018.
- Anónimo. 2010. FUNDECITRUS. Fundo de defesa da citricultura. Recuperado de <http://www.fundecitrus.com.br>. Fecha de consulta: 05/06/2018.
- Anónimo. 2016a. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. Fecha de consulta: 10/05/2018.
- Anónimo. 2016b. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). 2016. Recuperado de: <http://www.ivia.gva.es/es/banco-de-germoplasma-de-citricos>. Fecha de consulta: 20/07/2018.
- Anónimo. 2016c. Citrus Clonal Program Protection (CCPP). 2016). Recuperado de <http://www.ccpp.ucr.edu/variety/list.html>. Fecha de consulta: 06/07/2018.
- Anónimo. 2017a. Sistema de Información Arancelaria Vía Internet (SIAVI). Recuperado de: <http://www.economia-snci.gob.mx/>. Fecha de consulta: 09/07/2018.

- Anónimo. 2017b. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Recuperado de: [http://infosiap.siap.gob.mx/agricola\\_siap\\_gb/ientidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/agricola_siap_gb/ientidad/index.jsp). Fecha de consulta: 13/07/2018.
- Anónimo. 2018. Citrus Clonal Protection Program, (CCPP). 2018. Terms and Conditions of Supply of Budwood by CCPP. Recuperado de <http://ccpp.ucr.edu/budwood/budwood.php>. Fecha de consulta: 19/08/2018.
- Arrieta, B. G., Villegas, A., Rodríguez, M. N. y Luna, G. 2014. Desarrollo en vivero de portainjertos de cítricos con malformación de raíz. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 20(1): 29-39.
- Arrieta-Ramos, B. G., Villegas-Monter, A., Hernández-Bautisa, A., Rodríguez-Mendoza, M. N., Ruiz-Posadas, L. M., y García-Villanueva, E. 2010. Estomas y vigor de naranjo 'valencia' injertado en portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos. *Rev. Fitotec. Mex.* 33(3): 257-263.
- Astegiano, D. E., Favaro, C. J., y Bouzo, A. C. 2001. Estimación del área foliar en distintos cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) utilizando medidas foliares lineales. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 16(2): 250-256.
- Ayllon, M. A, Lopez, C., Navas, C. J., Garnsey, S. M., Guerri, J., Flores, R. & Moreno, P. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of Citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch Virol* 146: 27-40
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., Lee, R. F. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 27:291-316.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M., Gonçalves, D. 1979. The closteroviruses: a distinct group of elongated plant virus. *Adv. Virus Res.*, 25: 93-168.
- Bremer, N. H., Rodrigues, S. S., Mourão, F. F. A. A., Bellato, S. M. e Maitto, C. M. 2015. Boas práticas para produção de mudas cítricas. Araraquara: Vivecirus Organização Paulista de Viveiros de Mudas Cítricas, pp 69.
- Cambra, M., Serra, J., Villalba, D. & Moreno, P. 1988. Present Situation of the Citrus Tristeza Virus in the Valencian Community. In: Timmer, L. W., Garnsey, S. M. & Navarro, L. (eds). *Proceedings tenth Conference* (pp. 1-7). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/ten/10th001\\_007.pdf](http://iocv.org/proceedings/ten/10th001_007.pdf). Fecha de consulta: 02/09/2018.
- Carvalho, A. S., Machado, A. M., Coletta Filho, D. H. and G. W. Müller. 2002. Present Status of the Production of Citrus Budwood and Nursery Trees Free of Graft and Vector-Transmissible Diseases in São Paulo State, Brazil. In: Duran-Vila, N., Milne, R. G. & daGraca, V. J. (eds). *Proceedings fifteen Conference* (pp. 317-320). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado <http://iocv.org/proceedings/fifteen/317-320%20IOCV15.pdf>. Fecha de consulta: 05/10/2018.
- Chaparro-Zambrano, H., Velásquez, R. H., & Orduz-Rodríguez, J. 2013. Influencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en el comportamiento de la lima ácida Tahití (*Citrus latifolia*

- Tanaka) injertada sobre seis patrones en el piedemonte llanero de Colombia (1997 – 2008). *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 14(1): 33-38.
- Colli, F. I y Cardenas, M. J. A. 1995. Campaña preventiva contra el virus de la tristeza de los cítricos en México. Pp: 211-213. In: *Proceedings of the third international Workshop*. Lake Alfred, Florida. May 15-18. University of Florida.
- Contreras-Maya, R. 2016. Detección de tristeza, psorosis, exocortis, cachexia y enanismo en lima persa (*Citrus latifolia*) en Veracruz, México (tesis de maestría). Colegio de postgraduados, Texcoco, México.
- Contreras-Maya, R., Nava-Díaz, C., Villegas-Monter, A., Mora-Aguilera, J. A., & Ochoa-Martinez, D. L. 2018. First report of citrus psorosis virus (CPsV) in persian lime in Veracruz, Mexico. *Journal of Plant Pathology*, 100(1): 115 p. doi: 10.1007/s42161-018-0011-4
- Contreras-Morales, E., Almaguer-Vargas, G., Espinoza-Espinoza, J. R., Maldonado-Torres, R. y Alvarez-Sanchez, E. 2007. Distribución de materia seca y nutrimentos en árboles de limón ‘persa’ (*Citrus latifolia* tan.) en Veracruz, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 13(1): 77-85.
- Costa, A.S. 1956. Present status of the tristeza diseases of citrus in South America. *FAO Plant Protection Bulletin*, 4: 97-105 p.
- Davoglio, J. A. C., Bordin, I., Janeiro, N. C. S. V. 2006. Sistema radicular e desenvolvimento de plantas cítricas provenientes de viveiro telado e aberto. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, 28(2): 172-175.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21.
- Dibbern, G. C. C., *et al.*, 2001. Vivecitrus e a produção de mudas certificadas. *LARANJA, Cordeirópolis*, 22(2) 549-559.
- Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV). 2005. Detección de la leprosis en el estado de Chiapas, México. Organización Norte-americana de Protección a las Plantas (NAPPO). Recuperado de: <http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=165>.
- Djelouah, K., Potere, O., Boscia, D., D’onghina, A. M., & Savino, V. 2000. Production of monoclonal antibodies to Citrus psorosis virus. In: Graca, V. J.; Lee, F. and Yokomi, K. R. (eds). *Proceedings Tenth conference* (pp. 152-158). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de <http://iocv.org/proceedings/fourteen/152-158.pdf>. Fecha de consulta: 01/11/2018.
- Douhan, W. G., Krueger, R. R., Pagliaccia, D., S Bodaghi, S., Rudyj, E., Prokrym, D., & Vidalakis, G. USA citrus clean plant network. 2016. *Journal of Citrus Pathology*, 3(1): 6 p
- Duran-Vila, N. 2004. Enfermedades de cítricos causadas por viroides: exocortis y caquexia. *Vida rural* 52-56 p.
- Eiras, Marcelo, Silva, Simone R., Stuchi, Eduardo S., Carvalho, Sérgio A. y Garcêz, Renata M. 2013. Identification and Characterization of Viroids in ‘Navelina ISA 315’ Sweet Orange. *Tropical Plant Pathology* 38 (1): 58–62. doi: 10.1590/S1982-56762013000100009

- Fawcett, H. S. 1946. A progress report on quick decline studies: introduction (part I); starch relationships (part II). Calif. Citrogr., 31: 198 p.
- Febres, V. J., Ashoulin, M., Mawassi, M., Frank, A., *et al.* 1996. The p27 protein is present at one end of Citrus tristeza virus particles. Phytopathology, 86: 1331-1335.
- Franco, D., Lucena, C. I. H., Morais, O. I. V. e Geraldo, M. A. B. 2007. Avaliação de substratos no desenvolvimento inicial de seis porta-enxertos de citros. LARANJA, Cordeirópolis, 28(1-2): 61-70.
- Gómez, G. F. 2003. Perspectivas de la citricultura mexicana. In: Encuentro Interamerica-no de Cítricos, INIFAP-RIAC, Nautla, Veracruz, México.
- Gómez-Cruz, M. A., Schwentesius, R., Barrera-González, A. 1994. La naranja de México y su industria, a la espera de heladas en florida y sequías en Brasil. Sarh, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Grassi, F. H., Antunes, P. M. A., Alves, S. A. e Torcinelli, R. V. 2001. Efeito de diferentes substratos no crescimento de mudas de limoeiro 'cravo' até o ponto de enxertia. LARANJA, Cordeirópolis, 22(1): 157-166.
- Gross, H. J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Jank, P., Lossow, C., Alberty, H., Ramm, K., & Sanger, H. L. 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroids. European Journal Biochemistry, 121(2): 249-257.
- Hasse, G. A. 1987. Laranja no Brasil 1500-1987: a história da agroindústria citrica brasileira, dos quintais coloniais s fbricas exportadoras de suco do sculo XX. São Paulo: Duprat & Iobe.
- Hiltabrand, F. W. 1957. Certification program for maintenance of virus-free propagation sources of citrus in california. In: Wallace, J. M. (ed). Proceedings 1st Conference (pp. 229-231). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/one/1st229\\_231.pdf](http://iocv.org/proceedings/one/1st229_231.pdf). Fecha de consulta: 05/05/2018.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2017. Recuperado de [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/255/closteroviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/255/closteroviridae). Fecha de consulta: 05/10/2018.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2018. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV 9th Report (2011). Recuperado de [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/sub-viral-agents2011/w/sub\\_viruses/163/4-viroids](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/sub-viral-agents2011/w/sub_viruses/163/4-viroids). Fecha de consulta: 10/10/2018.
- Iracheta, C. M. M & Rocha, P. M. A. 2010. Desarrollo y uso de un sistema serológico para la detección del virus de la tristeza en el análisis masivo de muestras de cítricos. Ciencia UANL, 13(4): 364-375.
- Iracheta, C. M. M., Orona, C. F., Almeyda, L. I. H., & Rocha, P. M. 2004. Ocurrencia y Distribución de Psorosis de los Cítricos en el Estado de Nuevo León, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 22(2): 299-307.

- Johnson, J. D. and Cline, M. L. 1991. Seedling quality of southern pine. In: Duryea, M. L. and Dougherty, P. M. (eds.) *Forest Regeneration Manual*. Lluver Academic Pub. Netherlands, pp: 143-159.
- Koller, O.C. 1994. *Citricultura: laranja, limão e tangerina*. Porto Alegre, Rígel, 446 p.
- Krueger, R. R., Bash., J. A and Lee, R. F. 2005. Phytosanitary Status of California Citrus. In: Hilf, M. E., Duran-Vila, N., Rocha-Peña, M. A. (eds). *Proceedings Sixteenth conference* (pp. 468-472). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de <http://iocv.org/proceedings/sixteen/468-472%20IOCV%2016.pdf>. Fecha de consulta: 05/10/2018.
- Kucharik, CH. J., Norman, J. M., Gower, S.T. 1998. Measurements of branch area and adjusting leaf area index to indirect measurements. *Agric. Forest Meteorol*, 91: 69-88.
- Lee. R. F. & Rocha-Peña, M. A. 1992. Citrus Tristeza Virus. In: A N Mukhapadhyay, H S Chaube, J Kumar, U S Singh (eds). *Plant Diseases of International Importance III*. Prentice Hall. New Jersey, 226-249 pp.
- Martín, S., Alioto, D., Milne, R. G., Garnsey, S. M., García, M. L., Grau, O., Guerri, J., & Moreno, P. 2004. Detection of Citrus Psorosis Virus by ELISA, Molecular Hybridization, RT-PCR and Immunosorbent Electron Microscopy and Its Association with Citrus Psorosis Disease. *European Journal of Plant Pathology*, 110(7): 747-757.
- Martín, S., Alioto, D., Milne, R. G., Guerri, J., & Moreno, P. 2002. Detection of Citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symp tomato logy, biological indexing and cross-protection test. *Plant Patology*, 51(2): 134-141. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00684.x
- Martínez, S. J. F. 2006. *Citricultura Española. Situación actual y perspectivas de futuro*. Vida Rural. 35-42 p.
- Mather, M. S. & McEachern, H. E. 1974. Recent improvements in citrus registration and certification programs in california. In: Weathers, G. L., Cohen, M. (eds). *Proceedings sixth Conference* (pp. 227-230). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/six/6th227\\_230.pdf](http://iocv.org/proceedings/six/6th227_230.pdf). Fecha de consulta: 10/09/2018.
- Mattos, J. D., Cleante, B. O., Antônio, Q. J. 2005. Nutrição dos citros. En Mattos, J. D., Dagoberto, N. J., Mary, P. R. e Pompeu, J. J. (Eds.). *Citros*. (pp. 198-215). Cordeirópolis, São Paulo. Brazil: Centro APTA citros Sylvio Moreira.
- Mendoza, A., Salazar, C., Alvarado, O., Cruz, A. M., Rodriguez, A. M. & Barrera, S. A. H. 2005. Molecular Differentiation of Mild and Severe Citrus tristeza virus isolates in México. In: Hilf, L. G., Duran-Vila, N., Rocha-Peña, M. A. (eds). *Proceedings sixteen Conference* (pp. 61-67). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de <https://iocv.ucr.edu/proceedings/sixteen/061-67%20IOCV%2016.pdf>. Fecha de consulta: 09/09/2018.

- Mendoza, A., Salazar, C., Alvarado, O., Cruz, M., y Barrera, H. 2003. Diferenciación molecular de razas severas y débiles de aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26 (4): 223-230.
- Mendt, R. 1992. History of CTV in Venezuela. In: Workshop on Citrus Tristeza Virus and Toxoptera Citricidus in Central America: Development of Management Strategies and Use of Biotechnology for control. Maracay. Proceedings... Maracay. p. 137-142.
- Michaud, J. P. & Álvarez, R. 2000. First Collection of Brown Citrus Aphid (Homoptera: Aphididae) in Quintana Roo, México. *Florida Entomologist*, 83(3): 357-358. doi: 10.2307/3496356
- Moreno, P. & Ambrós, S. 2011. Bases para el control de las enfermedades causadas por el virus de la tristeza de los cítricos. *Vida rural*. 30-35
- Müller, G. W., Targon, M. L.P. N., Carvalho, S. A., Souza, A. A. & Rodrigues, J. C. V. 2005. Doenças de citros causadas por vírus e viroides. Em Junior, D. M., Negri, J. D., Pio, R. M., Junior, J. P. (eds). *Citros*. (pp. 569- 594). Cordeirópolis, São Paulo. Brazil: Centro APTA citros Sylvio Moreira.
- Navarro, L & Juárez, J. 2003. Aplicaciones de la biotecnología en los cítricos y otros cultivos. *Comunidad valenciana agraria*, 3-12 p.
- Navarro, L. 1976. The Citrus Variety Improvement Program in Spain. In: Calavan, E. C. (ed). *Proceedings seven Conference* (pp. 198-203). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/seven/7th198\\_203.pdf](http://iocv.org/proceedings/seven/7th198_203.pdf). Fecha de consulta: 19/10/2018.
- Navarro, L., Ballester, F. J., Juarez, J., Piña, A. J., Arregui, M. J., Boono, R., Fernandez de Cordova, L. & Ortega, C. 1980. The citrus variety improvement program In Spain (cvips) after four years. In: Calavan, E. C., Garnsey, S. M. & Timmer, L. W. (eds). *Proceedings eight Conference* (pp. 289-294). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/eight/8th289\\_294.pdf](http://iocv.org/proceedings/eight/8th289_294.pdf). Fecha de consulta: 10/10/2018.
- Navarro, L., Juarez, J., Pina, A., & Ballester, F. J. 1983. In: Garnsey, S. M., Timmer, L. W. & Dodds, J. A. (eds). *Proceedings nine Conference* (pp. 365-370). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/nine/9th365\\_370.pdf](http://iocv.org/proceedings/nine/9th365_370.pdf). Fecha de consulta: 02/09/2018.
- Navarro, L., Juarez, J., Piña, A. J., Ballester, F. J. & Arregui, M. J. 1988 The Citrus Variety Improvement Program in Spain after Eleven Years. In: Timmer, L. W., Garnsey, S. M. & Navarro, L. (eds). *Proceedings tenth Conference* (pp. 400-406). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/ten/10th400\\_406.pdf](http://iocv.org/proceedings/ten/10th400_406.pdf). Fecha de consulta: 10/10/2018.
- Navarro, L., Pina, A. J., Juárez, J., Ballester-Olmos, F. J., Arregui, M. J., Ortega, C., Navarro, A., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Medina, A. & Zaragoza, S. 2002. The citrus variety improvement program in Spain in the period 1975-2001. In: Duran-Vila, N., Milne, G. R. & Graca, V. J. (eds). *Proceedings fifteen Conference* (pp. 306-316). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California.

Recuperado de <http://iocv.org/proceedings/fifteen/306-316%20IOCV15.pdf>. Fecha de consulta: 05/09/2018.

- Norman, G. G. 1959. Florida state plant board program for virus-free budwood. In: Wallace, M. J. (ed). *Proceedings First Conference* (pp. 237-242). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/one/1st237\\_242.pdf](http://iocv.org/proceedings/one/1st237_242.pdf). Fecha de consulta:05/10/2018.
- Orlando, F. J., Pompeu, J. J., Mary, P. R., Walter, M. G e Teófilo, S. J. 1993. Estudos recentes sobre a ocorrência de caneladuras da tristeza em variedades de citros. *Laranja cordeirópolis*, 14(1): 329-339
- Orozco, G. G., Muñoz, F. H. J., Villaseñor, R. F. J., Rueda, S. A., Sigala, R. J. A. & Prieto, R. J. A. 2010. Diagnóstico de calidad de planta en los viveros forestales del estado de Colima. Folleto Técnico Núm. 1. SAGARPA. INIFAP. CIRPAC. Campo Experimental Uruapan, Michoacán, México. 47 p.
- Pompeu, J. J. 2005. Porta-enxertos. En Mattos, J. D., Dagoberto, N. J., Mary, P. R., e Pompeu, J. J. (eds.). *Citros*. (pp. 62-93). Cordeirópolis, São Paulo. Brazil: Centro APTA citros Sylvio Moreira.
- Pratt, M. R., Calavan, C. E., & Hill, P. H. 1972. The Tristeza Suppression and Eradication Program in California. In: Price, C. W (ed). *Proceedings fifth Conference* (pp. 158-161). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/five/5th158\\_161.pdf](http://iocv.org/proceedings/five/5th158_161.pdf). Fecha de consulta: 17/02/2018.
- Prieto, R. J. A., García R. J. L., Mejía B. J. M., Huchín A. S. y Aguilar V. J. L. 2009. Producción de planta del género Pinus en vivero en clima templado frío. Publicación Especial Núm. 28. Campo Experimental Valle del Guadiana INIFAP-SAGARPA. Durango, Dgo. México. 48 p.
- Reuther, W. 1960. The California Citrus Variety Improvement Program. In: Price, W. C (ed). *Proceedings fifth Conference* (pp. 220-225). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/two/2nd220\\_225.pdf](http://iocv.org/proceedings/two/2nd220_225.pdf). Fecha de consulta: 10/08/2018.
- Reuther, W., Calavan, C. E., Nauer, M. E. and Roistacher, N.C.1972. In: Price, W. C (ed). *Proceedings fifth Conference* (pp. 271-278). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/five/5th271\\_278.pdf](http://iocv.org/proceedings/five/5th271_278.pdf). Fecha de consulta: 10/08/2018.
- Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., & Lomas-Barrié, C., T. 2017. Chronic infection of the citrus tristeza virus in Citrus sinensis / C. aurantium trees in a restrictive thermal regime in Yucatán. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(3), 187-202. doi: 10.5154/r.rchsh.2016.11.028
- Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E, Mora-Aguilera, G, Febres, V., Ochoa-Martínez, D., Gutiérrez-Espinosa, A., Cintra de Jesus-Junior, W., Correia-Malvas, C. & Arno-Wulff, N. 2008. Estructura poblacional de aislamientos del citrus tristeza virus y su asociación con la muerte súbita de los cítricos en Brasil. *Agrociencia*, 42(1): 85-93.

- Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G., Garcia-Ruiz, N., Ochoa-Martinez, D., Gutierrez-Espinosa, A. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del Citrus tristeza virus de Yucatan y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(4): 493-507.
- Rizzo, D., Materazzi, A., Stefani, L., Panattoni, A., Pierro, R., Bellis, L. & Luvisi, A. 2017. The occurrence of viruses and viroids in ornamental citrus mother plants in Tuscany (Central Italy). *Crop Protection*, 102: 137-140. doi: 10.1016/j.cropro.2017.08.026
- Robles-Garcia, P. L., Sanchez-Anguiiano, H. M., Loeza-Kuk, E. 2008. Programa nacional de certificación de material propagativo de cítricos en México. Resumen. Pp: 1 -6
- Rocha-Peña, M. A., Ochoa-Corona, F. M., Martinez-Soriano, J. P., Roistacher, C. N., Lee, R. F. 1998. Citrus Tristeza Virus: Events That Occur Before, During and After the Disease Epidemics. *Subtropical Plant Science*, 50: 26-36.
- Roistacher, N. C & Dodds, A. J. 1993. Failure of 100 Mild Citrus Tristeza Virus Isolates from California to Cross Protect Against a Challenge by Severe Sweet Orange Stem Pitting Isolates. In: Moreno, P., DaGraca, J. V., Timmer, L. W. (eds). *Proceedings twelve Conference* (pp. 100-107). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/twelve/12th100\\_107.pdf](http://iocv.org/proceedings/twelve/12th100_107.pdf). Fecha de consulta: 08/08/2018.
- Rossetti, V. & Salibe, A. A. 1961. Occurrence of citrus virus diseases in the State of São Paulo. In: Price, C. W (ed). *Proceedings second Conference* (pp. 238-241). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/two/2nd238\\_241.pdf](http://iocv.org/proceedings/two/2nd238_241.pdf). Fecha de consulta: 29/10/2018.
- Rossetti, V., Salibe, A. A., Cintra, F. A., Bonilha, S. and Armbruster, D. 1963. The Citrus Budwood Certification Program in the State of São Paulo. In: Price, C. W (ed). *Proceedings three Conference* (pp. 235-240). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/three/3rd235\\_240.pdf](http://iocv.org/proceedings/three/3rd235_240.pdf). Fecha de consulta: 20/10/2018.
- Rubio, L., Ayllón, M. A., Kong, P., Fernández, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P. & Falk, B.W. 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infection and recombination. *J. Virol*, 75(17): 8054-62.
- Rueda, S. A., Benavides, S. J. D., Sáenz, R. J. T., Muñoz, F. H. J., Prieto, R. J. A. & Orozco, G. G. 2014. Calidad de planta producida en los viveros forestales de Nayarit. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5 (22): 58-73.
- Ruiz, M., Pensabene, B. G., Quiñones, A., García, L. A., Morillon, R., Ollitrault, P., Primo, M. E., Navarro, L. & Aleza, P. 2018. Molecular characterization and stress tolerance evaluation of new allotetraploid somatic hybrids between Carrizo Citrange and Citrus Macrophylla W. Rootstocks. *Front. Plant Sci.*, 9: 901. doi: 10.3389/fpls.2018.00901
- Ruiz, R. S. 2009. El virus de la tristeza de los cítricos (CTV): Desarrollo y aplicación de herramientas para establecer un sistema genético eficaz. (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, España.

- Sáenz, R. J. T., Villaseñor R. F. J., Muñoz F. H. J., Rueda S. A. & Prieto R. J. A. 2010. Calidad de planta en viveros forestales de clima templado en Michoacán. Folleto Técnico Núm. 17. SAGARPA-INIFAP-CIRPAC-Campo Experimental Uruapan. Uruapan, Michoacán, México. 48 p.
- SAGAR. 1997. Plan de acción contra el virus tristeza de los cítricos y el pulgón café, *Toxoptera citricida*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Comisión Nacional Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. México.
- SAGARPA. 2006. Avances del Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Cadena Citrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 24 p.
- Salibe, A. A., Crocomo, O. J., Tubelis, A. Gallo, L. A. & Oliveira, E. T. 1993. A New Program for Citrus Budwood Improvement in Sao Paulo, Brazil. In: Moreno, P., daGraca, V. J. & Timmer, W. L. (eds). *Proceedings twelve Conference* (pp. 392-396). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/twelve/12th392\\_396.pdf](http://iocv.org/proceedings/twelve/12th392_396.pdf)
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NewYork, USA.
- San Martin, M. H. A. e Curti-Díaz, S. A. 2007. Aspectos gerais da citricultura no México. *LARANJA, Cordeirópolis*, 28 (1-2) 81-96.
- Santos, F. H. P., Passos, O. S., Cunha, S. A.P., Barbosa, C. J., & Nickel, O. 2000. The Citrus Variety Improvement Program in Northeastern Brazil After 15 Years. In: Graça, J. V., Lee, R. F. & Yokomi, R. K. (eds). *Proceedings fourteen Conference* (pp. 403-404). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de <http://iocv.org/proceedings/fourteen/403-404.pdf>
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M. A., Dawson, W. O. 2004. Closterovirus bipolar virion: Evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(3):799-804. doi: 10.1073 / pnas.0307747100
- Schäfer, G., Dutra, S. P. V., Carlos, K. O. e Francisco, S. S. 2006. Desarrollo vegetativo de patrones cítricos cultivados en condiciones de invernadero bajo dos sistemas de riego. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, 28 (2): 227-230.
- Schneider, H. 1968. The anatomy of citrus. In: Reuther, W., Batchelor, L.D. & Webber, H. J. (Eds). *The citrus industry*. Riverside: University of California, 2: 1-85.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2018. NOM-079-SAG/FITO-2017, Requisitos fitosanitarios, especificaciones y procedimiento que deben cumplir los establecimientos productores y comercializadores de material propagativo de cítricos libre de plagas reglamentadas, así como aquellos que acopian, empaacan y procesan frutos de cítricos para obtener la certificación fitosanitaria. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/318678/Proyecto\\_de\\_Modificaci\\_n\\_de\\_la\\_Norma\\_Oficial\\_Mexicana\\_NOM-079-FITO-2002.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/318678/Proyecto_de_Modificaci_n_de_la_Norma_Oficial_Mexicana_NOM-079-FITO-2002.pdf). Fecha de consulta: 05/05/2018.

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2001. NOM-031-FITO-2000: Campaña contra el virus de la tristeza de los cítricos. México: Diario Oficial de la Federación. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=762092&fecha=10/08/2001](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=762092&fecha=10/08/2001). Fecha de consulta: 05/05/2018.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2002. NOM--079--FITO--2002: Requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo libre de virus tristeza y otros patógenos asociados a cítricos. México: Diario Oficial de la Federación. Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/208874/NOM-079-FITO-2002.pdf>. Fecha de consulta: 05/05/2018.
- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2016. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/182975/Laboratorios\\_de\\_Diagnostico\\_Fitosanitario\\_Aprobados\\_Nov\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/182975/Laboratorios_de_Diagnostico_Fitosanitario_Aprobados_Nov_2016.pdf). Fecha de consulta: 05/05/2018.
- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2018. Directorio de Viveros Productores de Plantas Certificadas. Recuperado de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/388190/DIRECTORIO\\_UPMPC\\_6\\_septiembre\\_2018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/388190/DIRECTORIO_UPMPC_6_septiembre_2018.pdf). Fecha de consulta: 05/05/2018.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2013. Pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida* Kirkaldi). Dirección General de Sanidad Vegetal - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 37. 26 p.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2014. Campaña contra plagas reglamentadas de los cítricos (Leprosis). Recuperado de: <http://publico.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=26770&IdUrl=71706&objeto=Documento&IdObjetoBase=26770&down=true>
- Sleeth, B. 1959. The citrus budwood certification program in Texas. In: Wallace, M. J. (ed). *Proceedings First Conference* (pp. 233-236). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [http://iocv.org/proceedings/one/1st233\\_236.pdf](http://iocv.org/proceedings/one/1st233_236.pdf). Fecha de consulta: 05/05/2018.
- Streets, B. R. 1959. Citrus bud certification in arizona. In: Wallace, M. J. (ed). *Proceedings First Conference* (pp. 243). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de <http://iocv.org/proceedings/one/1st243.pdf>. Fecha de consulta: 05/10/2018.
- Targon, M. L. P. N., Carvalho, S. A., Medina, C. L., Müller, G. W., Stuchi, E. S., Borges, K. M. e Machado, M. A. 2006. Identificação de viróides ocorrendo em pomares de lima ácida Tahiti Quebra-galho em Holambra, (SP). *Laranja, Cordeirópolis*, 27: 1-11.
- Varela, F. S. E., Villareal, M. A., Silva, A. G., Álvarez, R. R., García, M. R., Rodríguez, R. H., Benavides, G. C., Gaona, G. C., Monreal, H. L. S. y Núñez, P. A. G. 2006. Manual para el

manejo y producción de cítricos en Tamaulipas. Ed (Varela, F. S. E., Villareal, M. J. A., Silva, A. G. L., Benavides, G. C. y Maldonado, M. N.). Recuperado de: [https://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo\\_sectorial/Michoacan/34michoacan.pdf](https://www.cofupro.org.mx/cofupro/archivo/fondo_sectorial/Michoacan/34michoacan.pdf). Fecha de consulta: 08/10/2018.

Vidalakis, G. 2016. Citrus viroids-research developments. *Journal of Citrus Pathology*, 3(1): 15 p. Recuperado de <https://escholarship.org/uc/item/7986f88j>. Fecha de consulta:08/10/2018.

Villalba, B. D. 2000. Patrones y variedades de cítricos. Moncada: GENERALITAT VALENCIANA, Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Pp:5-31.

Wallace, 1959. Tristeza disease investigations, an example of progress through cooperative international research. In: Wallace, M. J. (ed). *Proceedings First Conference* (pp. 29-33). Riverside, CA, USA: International Organization of Citrus Virologists and University of California. Recuperado de [https://iocv.ucr.edu/proceedings/one/1st029\\_033.pdf](https://iocv.ucr.edu/proceedings/one/1st029_033.pdf). Fecha de consulta: 10/09/2018.

Wilcon, L. 2018. The Complex Path for New Citrus in California. Citrus industry. Recuperado de: <http://citrusindustry.net/2018/06/22/complex-path-new-citrus-california/>. Fecha de consulta: 10/10/2018.

Xiao, C., Yao, RX., Li, F. y col. *Arch Virol* (2017) 162: 409. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3089-z>

Zanetti, M. 2008. Producción de planta de cítricos bajo malla como estrategia preventiva de HLB. Recuperado de <http://www.concitver.com/huanglongbingypsilidoasiatico/Memor%C3%ADa-7%20Zanetti.pdf>. Fecha de consulta:01/11/2018.

Zaragoza, S., Pina, L, J, A., Forner, M, A., Navarro, L., Medina, A., Soler, G. y Chome, F, P, M. 2011. Las variedades de cítricos. El material vegetal y el registro de variedades comerciales de España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Pp: 16-20.

Zekri, M., Albrecht, U., Vincent, C. L. & Vashisth, T. 2017. Florida citrus production guide: grove planning and establishment. University of Florida Gainesville, 47-48.