

GUÍA DE TOMA Y ENVÍO DE
MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO
FITOSANITARIO DE
ENFERMEDADES VIRALES EN
CÍTRICOS

SENASICA nos protege a todos

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD
AGROALIMENTARIA

1. INTRODUCCIÓN

La Dirección General de Sanidad Vegetal a través del Área de Vigilancia Epidemiológica y de los Laboratorios de Diagnóstico del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, lleva a cabo actividades de muestreo apropiado y oportuno de los cultivos, que permite evitar la introducción, dispersión y establecimiento de plagas de importancia económica y cuarentenaria, mediante el diagnóstico confiable de las mismas.

2. OBJETIVO

La presente guía tiene la finalidad de servir como apoyo a los profesionales fitosanitarios para el reconocimiento en campo de la sintomatología característica ocasionada por la presencia de los virus asociados a las enfermedades Leprosis de los Cítricos (LC), Tristeza de los Cítricos (TC) y Psorosis de los Cítricos (PC). Adicionalmente describe las técnicas de muestreo, materiales, herramientas y equipos que deben utilizarse para la toma adecuada de la muestra, así como su etiquetado y envío de las partes vegetales específicas para la detección y diagnóstico confiable de los virus de interés.

3. CONTENIDO

3.1 Descripción del problema

- **Cultivo:** cítricos
- **Patógeno:** posibles especies o variantes virales asociadas a cada enfermedad (Cuadro 1).

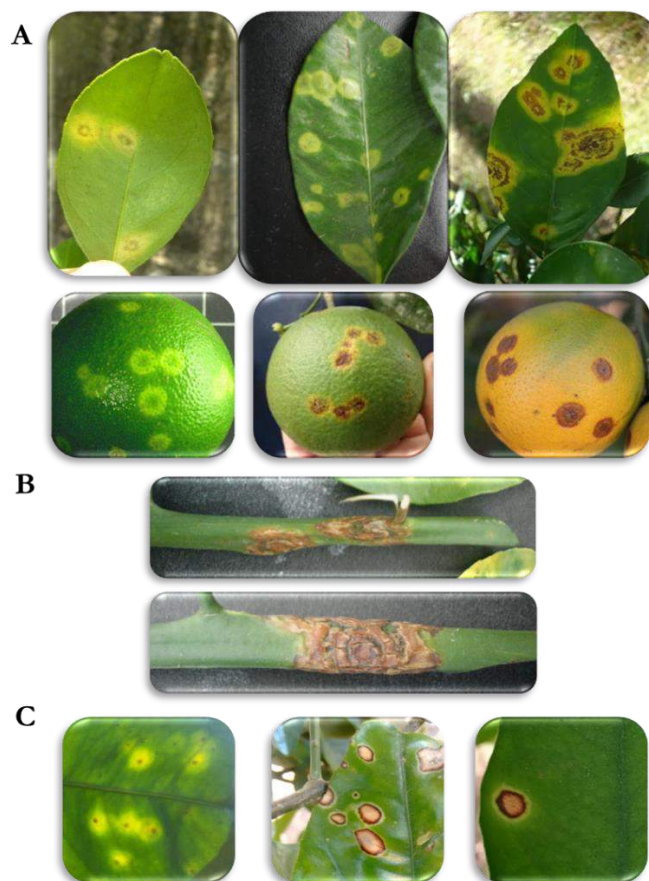
Cuadro 1. Virus asociados a enfermedades en cítricos

Especie	Variante	Acrónimo	Asociado a
<i>Citrus leprosis virus</i>	Citoplasmático	CiLV-C	Leprosis de los cítricos
<i>Citrus leprosis virus</i>	Nuclear	CiLV-N	
<i>Citrus necrotic spot virus</i>	-	CNSV	
<i>Citrus tristeza virus</i>	-	CTV	Tristeza de los cítricos
<i>Citrus psorosis virus</i>	-	CPsV	Psorosis de los cítricos

3.2 Sintomatología

3.2.1 Leprosis de los cítricos

La LC presenta infecciones locales. Los síntomas aparecen en el área en donde el ácaro vector se alimentó (*Brevipalpus* spp.). En hojas y frutos (Figura 1A) los síntomas inician como manchas circulares y semicirculares cloróticas que pueden verse delimitadas por las nervaduras en las hojas. Con el tiempo estas pueden crecer y coalescer, así mismo, se tornan de color café o presentan lesiones necróticas; específicamente en fruto, al cambiar de coloración las manchas muestran depresión (Bastianel *et al.*, 2006; Mora-Aguilera *et al.*, 2013). En ramas se observan manchas cloróticas circulares que se tornan necróticas y rugosas (Figura 1B). No confundir los síntomas de LC con manchas cloróticas con escama roja en el centro o con manchas necróticas con o sin halo clorótico (Figura 1C). La enfermedad puede presentarse como asintomática, por lo que deben muestrearse también árboles con signos de defoliación y caída prematura de frutos.



3.2.2. Tristeza de los cítricos.

La infección por CTV es sistémica, comúnmente los árboles presentan un decaimiento progresivo que termina en la muerte del árbol al cabo de 3 a 10 años (Figura 2E). El follaje pierde su color verde brillante y pasa a un ligero color verde mate semejando el déficit de nitrógeno (Figura 2A), en algunos casos se observa clorosis intervenal en las hojas (Figura 2B); el follaje se va perdiendo lentamente. La floración en árboles infectados es abundante, los frutos tienden a ser pequeños (Figura 2D) y de color verde pálido, sin embargo, su maduración es prematura en comparación a los de árboles no infectados. Adicionalmente se observa reducción del sistema radical y picado de tallo (Figura 2C). En caso de variantes severas, se observa el colapso rápido del árbol con retención de frutos (Moreno y Garnsey, 2009).

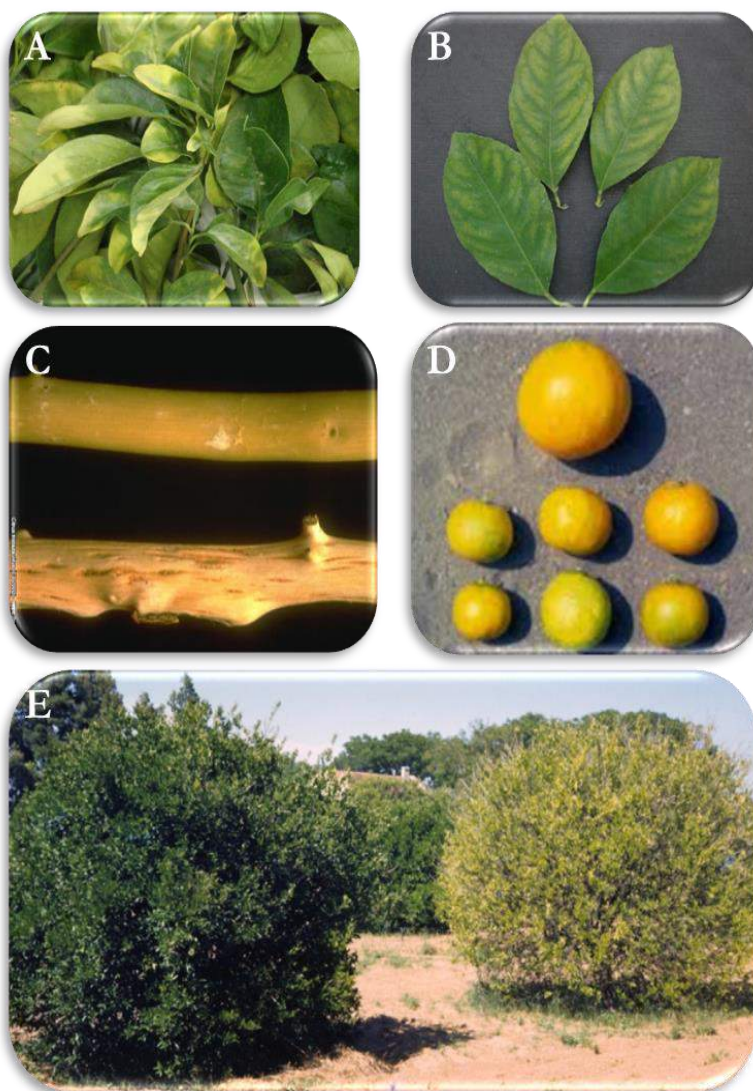


Figura 2. Síntomas característicos de tristeza de los cítricos. **A)** Cambio de color en follaje; **B)** Clorosis intervenal en hojas; **C)** Picado o acanalado de tallo y ramas; **D)** Fruto de árbol sano y frutos de árboles infectados con CTV; **E)** Vista de árbol sano y árbol infectado con CTV.

3.2.3 Psorosis de los Cítricos.

Aunque la PC es una infección sistémica, se caracteriza por la aparición de desmaciones localizadas en la corteza del tronco y en las ramas principales (Figura 3B). Las hojas pueden mostrar manchas cloróticas en el haz, y en hojas maduras también se observan pústulas gomosas en el envés que corresponden con las manchas cloróticas (Figura 3A). En las zonas descamadas pueden observarse manchas irregulares de color marrón en la madera, mismas que se deben a la impregnación de goma, la cual, en ocasiones puede fluir al exterior debido a la oclusión de los vasos del xilema. La obstrucción del sistema vascular puede ocasionar que algunas ramas caigan del árbol. La PC es una enfermedad que puede permanecer hasta 12 años de forma asintomática (Achachi *et al.*, 2014), por lo que deben muestrearse todos aquellos árboles que hayan sido injertados, o que muestren evidencias de daño mecánico.

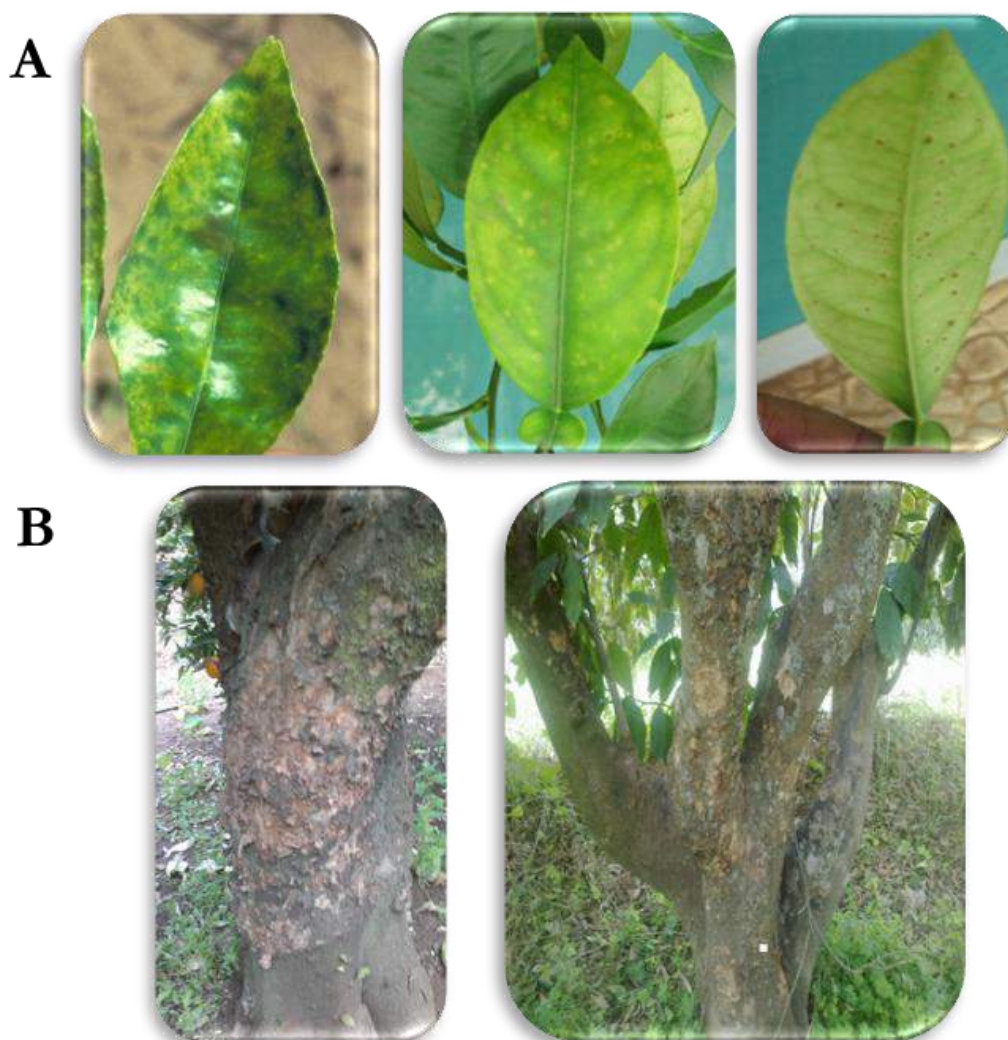


Figura 3. Síntomas característicos de Psorosis de los cítricos. **A)** Izquierda y centro: Manchas cloróticas foliares en el haz de la hoja. Derecha: Pústulas gomosas en el envés de las hojas maduras; **B)** Tronco y ramas principales afectados por descamación.

3.3 Materiales y herramientas

- Alcohol al 70%
- Bolsas de papel
- Bolsas de polietileno
- Cinta adhesiva (masking-tape, cinta canela)
- Contenedor con hipoclorito de sodio al 1%
- Cuaderno de campo
- Etiquetas
- Geles refrigerantes congelados
- GPS
- Guantes
- Hielera
- Lápices
- Lupas 10X
- Marcadores de tinta indeleble
- Navajas
- Papel secante, absorbente o de estraza
- Tijeras para podar

3.4 Procedimiento de muestreo

3.4.1 Estrategia de toma de muestra

Con la finalidad de obtener material vegetal representativo de la totalidad del árbol, el técnico de campo deberá considerar la toma de muestra dividiendo el árbol por estratos y zonas:

- Visto de frente, el árbol se seccionará en tres estratos; estratos bajo (primeras ramas del piso hacia arriba), medio (ramas que conforman la parte más ancha del árbol) y alto (ramas que conforman la parte superior de la copa y el ápice del árbol).
- Considerando una vista aérea de cada estrato, cada estrato será dividido en cuatro zonas. El estrato bajo y alto se dividirán en las zonas norte, sur, este y oeste. El estrato medio deberá dividirse en las zonas noreste, sureste, noroeste y suroeste (Solano et al., 2008; Doreste, 1988).

Para mayor claridad, recurrir a la infografía anexa a este documento en la cual se describe de manera gráfica la forma de considerar la toma de muestras por estratos y zonas.

3.4.2 Cantidad de material vegetal a coleccionar

Considerando la división del árbol por estratos y zonas

- Tomar una rama de 10 a 20 cm de largo por cada zona de cada estrato. Se coleccionarán en total al menos 12 ramas por cada árbol.

- Cada rama deberá portar al menos 5 hojas, se colectarán al menos 60 hojas por cada árbol.
- En caso de observar frutos con síntomas, éstos se colectarán asegurándose de tomarlo junto con el pedúnculo, adicionalmente se colectaran 5 hojas próximas al fruto.

3.4.3 Especificaciones del material vegetal a coleccionar

- Tome la muestra a media mañana o media tarde cuando la intensidad del sol no sea muy fuerte, evite tomar muestras inmediatamente después de una lluvia o de aplicar un agroquímico por vía foliar.
- Al encontrarse en la huerta, detectar árboles con hojas, ramas o frutos que presenten síntomas de LC, TC o PC, tomando como referencia las figuras 1, 2 y 3 de éste documento.
- Las ramas y hojas deberán corresponder a brotes o follaje verde en activo crecimiento, deberán incluir tanto ápices de crecimiento como hojas jóvenes en estado inicial o intermedio de la enfermedad.
- Preferentemente deberán seleccionarse aquellas ramas que presenten hojas o frutos con síntomas característicos de cada una de las enfermedades con diferentes grados de intensidad, evitar que las partes seleccionadas estén totalmente afectadas o deterioradas.
- En caso de observar dos o más síntomas diferentes en una zona o estrato, tomar muestra de los diferentes síntomas ubicados en la misma zona.
- Asegurarse que al menos una hoja de la rama seleccionada se encuentre sana.
- La muestra no deberá lavarse por ningún motivo.

Si hay registros de presencia del ácaro vector del virus, tomar muestras de hojas asintomáticas, ya que se han detectado muestras positivas por RT-PCR.

3.5. Embalaje

Cada muestra (rama) deberá ser colocada entre dos hojas de papel secante, sanitas o papel estraza. Las cuatro muestras tomadas por estrato serán introducidas en una bolsa de papel. A su vez, las tres bolsas de papel correspondientes a cada uno de los estratos, serán introducidas en una bolsa de polietileno con cierre, conformando así la muestra total por cada árbol (ver infografía anexa). Tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- Las muestras deberán ser guardadas de la forma descrita tan pronto como sea posible.
- La muestra debe ser enviada al laboratorio tan pronto como sea tomada.
- Evitar la toma de muestras cerca a los fines de semana.

- Asegurarse que las muestras se mantengan frescas, ya que el calor podría deteriorarlas. Es preferible mantenerlas a la sombra o dentro de una hielera (no congelar las muestras).
- Hacer un paquete resistente al transporte que permita mantener integra las muestras.

3.6 Etiquetado

Anotar los datos que se muestran en la Figura 4, con un marcador de tinta indeleble que asegure que la información no se pierda.

 		SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA			
DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria					
DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO					
Cultivo/Producto <u>Vid</u>					
Variedad <u>Tempranillo</u>		Material colectado <u>Planta completa</u>			
Fase fenológica <u>vegetativa</u>		Uso del cultivo <u>Siembra</u>			
Fecha de muestreo <u>24/05/2018</u>		Coordenadas <u>19.712545 -98.994106</u>			
Huerto <u>Campo</u>		<u>Bodega</u>		<u>Trampa</u>	
				<u>Invernadero X</u>	
Lugar de colecta <u>Viñedo El Matorral</u>		Origen <u>México</u>			
Procedencia <u>Ensenada, B.C</u>		Destino <u>Tequisquiapan, Querétaro</u>			
Nombre del colector <u>Carlos Fuentes Rodríguez</u>					

14 cm

10.5 cm

Figura 4. Ejemplo de datos y etiqueta que debe tener cada muestra enviada a diagnóstico

3.7 Envío

Para su envío, las muestras deberán colocarse en hieleras provistas de geles congelados. Evitar el contacto directo de los geles con el material vegetal mediante un periódico o cartón. No enviar las muestras los días jueves o viernes, ya que éstas no pueden ser entregadas los fines de semana. Tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

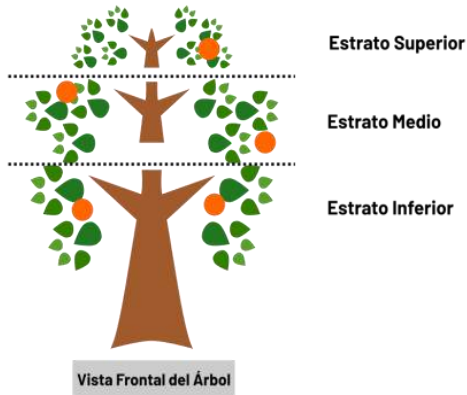
- Envíe las muestras tan pronto como sea posible y por la vía más rápida. Trate de que llegue al laboratorio en 2-3 días como máximo. Procurar programar los envíos durante los primeros tres días de la semana para que las muestras se reciban en buen estado lo antes posible.

- NO envíe muestras totalmente secas.
- NO mezcle las muestras de diferentes árboles en un mismo embalaje.
- Los frutos deberán encontrarse en bolsas aparte, en las cuales se indicará a qué estrato y zona corresponden. Estas bolsas se engraparán a la bolsa en donde se encuentran las demás muestras correspondientes al árbol de donde fueron tomadas.
- NO adicione ningún tipo de líquidos al embalar las muestras.
- NO mezcle muestras de diferentes lotes, ya que de lo contrario se puede dar el caso de contaminación entre muestras por contacto entre ellas.

4. BIBLIOGRAFÍA

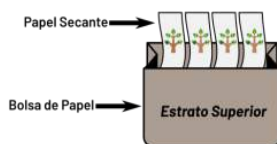
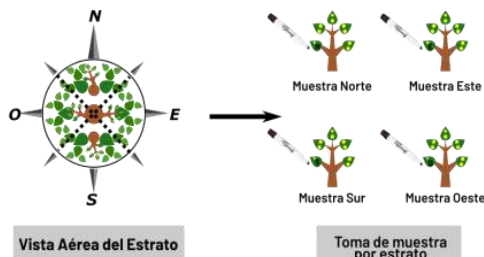
- Achachi, A., Barka, E.A., Ibriz, M. (2014). Recent advances in *Citrus psorosis virus*. *Virus Disease*, 25 (3), 261-276.
- Bastianel, M., Novelli, V. M., Kitajima, E. W., Kubo, K. S., Bassanezi, R. B., Machado, M. A., Freitas-Astúa, J. (2010). Citrus leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. *Plant Disease*, 94 (3), 284-292.
- Doreste, E. (1988). *Acarología* (Tercera edición), San José. IICA.
- Mora-Aguilera, G., Santillán, Galicia, M.T., Rivas-Valencia, P. (2013). Ficha técnica no. 35 Leprosis de los cítricos, *Citrus leprosis virus C*. <http://www.cesaveson.com/files/666632a9fd2e497de3495eb5e6659746.pdf>
- Moreno, P., Garnsey, S.M. (2009). Citrus Tristeza Diseases – A worldwide perspective. En Karasev, A.V., Hilf, M.E (Ed), *Citrus tristeza virus Complex and Tristeza Diseases*. (27-49 pp). St. Paul, Minnesota, EUA: APS Pres.
- Solano, D.A., Álvarez-Herrera, J.G., Rodríguez, J.A. (2008). Distribución espacial de *Brevipalpus phenicis*, vector de los cítricos en el cultivo de naranja Valencia (*Citrus sinensis*) en Yopal, Casanare (Colombia). *Agronomía Colombiana*, 26,399-410.

Guía para toma de muestras
Enfermedades Virales en Cítricos

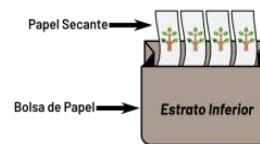
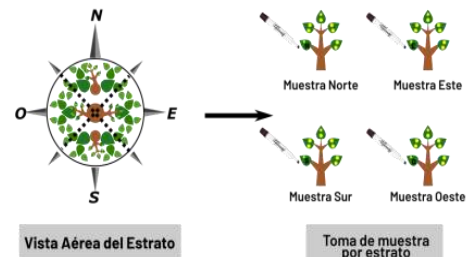


INFOGRAFÍA PARA TOMA DE MUESTRAS

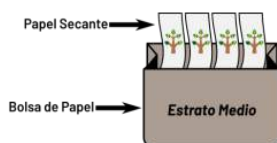
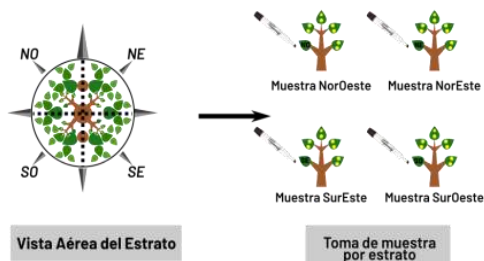
Estrato Superior



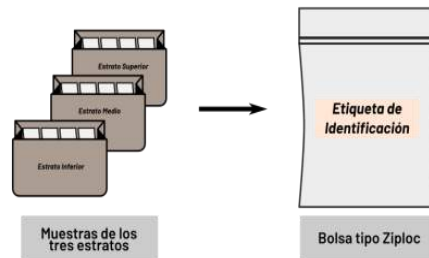
Estrato Inferior



Estrato Medio



Muestra por Árbol



ELABORADO POR:
Laboratorio de Virología

DISEÑO Y EDICIÓN:
Grupo DiaFi

Forma recomendada de citar:

Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2018). *Guía de Toma y Envío de Muestras para el Diagnóstico Fitosanitario de Enfermedades Virales en Cítricos*. Tecámac, México: Autor.

Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoosanitarias
- Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

01 800 987 9879

Quejas • Denuncias

Órgano Interno de Control en el SENASICA

+52(55) 5905 1000, ext. 51648

+52(55) 3871 8300, ext. 20385

www.gob.mx/sagarpa

www.gob.mx/senasica



SENASICA SAGARPA



@SENASICA



SENASICA SAGARPA

“Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.

Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa”.