

XX

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS



**DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE
LA TRISTEZA EN EL BANCO DE GERMOPLASMA
DE CITRICOS DEL CENTA**

POR:

Ligia Jeannette Claramount Colocho

SAN SALVADOR, Junio de 1989

Tesis
C891de

El. L. 676

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL



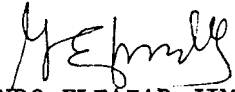
DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA EN EL BANCO DE GERMO
PLASMA DE CRITICOS DEL CENTA

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE :
INGENIERO AGRONOMO FITOTECNISTA

PRESENTADO POR :
LIGIA JEANNETTE CLARAMOUNT COLOCHO

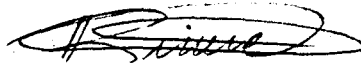
SAN SALVADOR, JUNIO DE 1989

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL



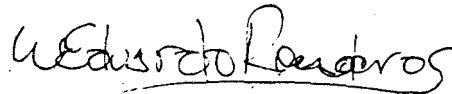
Ing. Agr. GALINDO ELEAZAR JIMENEZ

ASESOR :



Ing. Agr. RENE ALFONZO PEREZ RIVERA

JURADO CALIFICADOR :



Ing. Agr. WILLY EDUARDO RENDERÓS ROSALES



Ing. Agr. EDUARDO RIVERA FAGUNDO



Ing. Agr. CARLOS RENE GRANILLO

RESUMEN

Con el propósito de detectar el virus de la tristeza en cítricos, se realizó este trabajo en el Banco de Germoplasma de Cítricos del CENTA, en la Estación Experimental de San Andrés # 1, km 33 1/2 carretera a Santa Ana, Departamento de La Libertad, a 460 msnm.

Utilizando dos métodos para la determinación de esta enfermedad ELISA y Yodo, se pudo constatar la presencia del virus.

Los resultados demuestran que el virus de tristeza está presente y el análisis de la Prueba de t de doble cola, nos dice que tanto un método como el otro son confiables para decir hay virus de tristeza en el lugar de estudio, ya que no se encontró diferencia significativa entre los métodos. Se pudo corroborar que patrones como Naranja Agrio y Mandarina Cleopatra son sobre los cuales las pruebas resultaron positivas al virus.

AGRADECIMIENTOS

- En forma muy especial lleva este trabajo mi profundo agradecimiento al Ing. René A. Pérez Rivera, por su acertada asesoría y su gran calidad profesional.
- A los Drs. Pete Timmer y R.F. Lee del Laboratorio de Citrus Research and Education Center de la Universidad de Florida.
- Al Departamento de Protección Vegetal de la Escuela de Agricultura Panamericana El Zamorano y en especial al Dr. Keith Andrews.
- A los Ingenieros : José E. Mancía, Pastori Bonilla, Víctor Rodríguez, y Dr. Saúl Contreras, por su apoyo profesional.
- A los Ingenieros : René Alvarado L., Agr. Wilfredo Marengo, Sr. Antonio Martínez, por su colaboración en el diseño y análisis estadístico.
- Al Ing. Wilfredo Rosa, Señores : Daniel Meléndez, Tiburcio Benavides y Eduardo Funes, por la información aportada.
- Al Centro de Tecnología Agrícola (CENTA), por haberma facilitado su Banco de Germoplasma para efectuar el estudio y análisis en que basa este trabajo.
- Al Ing. Carlos René Granillo, por la valiosa colaboración que me prestó para el feliz término de este estudio.
- A la Lic. Digna de García M., sin cuya dedicación y confianza no habría terminado mi carrera.
- A la señora Marina Rodríguez, por su trabajo de mecanografía; y
- Con especial cariño y eterno agradecimiento a las Señoras : Blanca Gretty de Ayala y Zotyen Quan O., por el tiempo dedicado para la elaboración y tiraje de este trabajo.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO :

Ser Supremo del Universo y por haber puesto su mano bendita sobre este trabajo, que a pesar de las adversidades, me iluminó para realizarlo.

A MI PADRE :

Antonio Claramount Roseville, como un recuerdo a su memoria, y hoy te digo: "He triunfado papá", gracias a tu empuje, amor y apoyo que siempre recibí, aún desde el cielo que se que allí estás, porque el día que nos reunamos te sentirás más orgulloso de mí.

A MI MADRE :

Clelia Colocho Bosque de Claramount, siempre me dije, cuando crezca quiero parecerme a mi mamá, para que mis hijos se sientan tan orgullosos de mí como yo lo siento de tí, gracias por tu paciencia y tu fe en mí.

A MI ESPOSO :

Juan Francisco Marengo, tu ayuda, confianza y amor me dieron fuerzas para seguir adelante y realizar este trabajo.

A MI HIJA :

Ligia Reneé Marengo Claramount, te debo tanto porque a pesar de tus dos escasos años, entendías mi poca dedicación durante todo este tiempo.

A MIS HERMANOS :

Clelia, Desiré y José A. Avilés, por todos los momentos en que me alentaron a seguir y el cariño que me brindaron.

A MIS TIOS Y PRIMOS :

Por su interés y cariño.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS :

Por participar hoy de mi triunfo

LIGIA JEANETTE CLARAMOUNT DE MARENCO

I N D I C E

	Página
RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	v
INDICE DE CUADROS	ix
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
3.1 Antecedentes	4
3.2 Distribución geográfica	8
3.3 Naturaleza de los virus	11
3.4 Sintomatología de tristeza	12
3.5 Razas	14
3.6 Daños	16
3.7 Mecanismos de propagación	16
3.7.1 Vectores	17
3.8 Técnicas serológicas y de tinción para el diagnóstico de tristeza	19
3.9 Medidas de control o combate	20
3.10 Patrones tolerantesw.....	21
3.11 Patrones susceptibles	22
4. MATERIALES Y METODOS	23
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSION	33

	Página
7. CONCLUSIONES	45
8. RECOMENDACIONES	46
9. BIBLIOGRAFIA	47
10. ANEXOS	53

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Condiciones climáticas de la Estación Experimental San Andrés (S.A.)	6
2.	Cantidad de árboles, variedades y áreas totales en cada bloque	24
3.	Cantidad de árboles y variedades muestreadas por bloques	24
4.	Código del total de árboles muestreados en el Banco de Germoplasma de Cítricos	25
5.	Prueba estadística para efecto comparativo del Método de ELISA y Tinción con yodo	33
6.	Resultados de las muestras de cítricos enviados de El Salvador (CENTA) para detección de tristeza por el método de ELISA en la Universidad de Florida ..	41
7.	Resultados de coloración positiva al C.T.V. por el método de Tinción con yodo	37
8.	Incidencia numérica y porcentual de tristeza, según especies de cítricos por los métodos de ELISA y Yodo	35
9.	Número de árboles positivos en cada bloque y en cada método	35
10.	Especies de árboles muestreados por bloque en el método de ELISA y método de Tinción con Yodo	43

11.	Especies de árboles muestreados por bloque en el método de Tinción con Yodo	39
-----	---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
A-1	54
Planos de campo	

1. INTRODUCCION

El Salvador, país pequeño, eminentemente agrícola, se concentró en la explotación del café, algodón y caña de azúcar que han sido considerados como la fuente principal de la economía nacional, pero que actualmente está siendo afectado por los bajos precios en mercados internacionales y por razones de conflicto interno que involucran a la agricultura, como uno de los componentes en la economía nacional.

Ante esta situación se ve la necesidad de impulsar la diversificación agrícola, tratando de explotar otros cultivos no tradicionales que anteriormente no se les dió la importancia debida y que generan ingresos. La citricultura es una rama importante en la agricultura, principalmente en aquellos países comprendidos dentro de la faja citrícola mundial en la que incluye a Centro América.

En estos últimos años el cultivo de los cítricos ha cobrado un interés de mucha importancia, incrementándose sensiblemente el área cultivada, ya se han hecho gestiones para la industrialización de éstos. Si se hace énfasis en la necesidad de diversificación de cultivos se llegará a la conclusión de que los cítricos son muy importantes en el país, por razones como demanda, clima, topografía y suelo, ya que en nuestra área son favorables para el desarrollo de esta industria.

Para iniciarse en una empresa como ésta es necesario mantener nuestros cítricos libres de enfermedades y plagas que puedan impedir el buen desarrollo de proyectos de gran envergadura. Uno de los problemas potenciales es el Virus de la Tristeza, siendo ésta una enfermedad devastadora y que puede llegar a causar una pérdida económica muy elevada. Es necesario contar con un programa fitosanitario, sobre todo en el Banco de Germoplasma del CENTA, ya que éste ha sido la fuente original para la propagación de los cítricos

distribuidos en todo el país.

Por esta razón es urgente hacer un muestreo para determinar la presencia del virus de tristeza de los cítricos (C.T.V.), por medio de métodos como ELISA y YODO. De manera que se pueda obtener una base científica que justifique la renovación del huerto. En caso de estar presente la enfermedad, al mismo tiempo, poder corroborar la confiabilidad entre los dos métodos.

2. OBJETIVOS

Objetivo general :

- Determinar la presencia del virus de la tristeza en el Banco de Germoplasma de Cítricos del CENTA.

Objetivos específicos :

- Determinar la confiabilidad entre los métodos de ELISA y Tinción de Yodo.
- Contar con una base científica para plantear y justificar la renovación, del Banco de Germoplasma del CENTA si se determina la existencia de dicha enfermedad.
- Plantear recomendaciones específicas a los citricultores del país en base a los resultados de este trabajo.

3. LITERATURA REVISADA

3.1. Antecedentes

El Ministerio de Agricultura y Ganadería de El Salvador, a través de su Institución de Investigación, que en el transcurso del tiempo ha recibido - diferentes denominaciones, tales como: Servicio Cooperativo Agrícola Salvadoreño Americano (SCASA); Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola (DGIEA) y otras, que a la fecha tiene el nombre de Centro de Tecnología Agrícola (CENTA, tuvo desde sus inicios la visión amplia de trabajar en la generación de tecnología y extensión agrícola, con cultivos de granos básicos, hortalizas, agroindustriales y frutales, con este último grupo fue su preocupación primordial la formación de colecciones amplias con muchas - especies que sirvieron a futuro como Bancos de Germoplasma, para la promoción de dichos cultivos a escala comercial y garantizar a la vez la conservación del germoplasma en sus propias áreas de trabajo, es así, como a iniciativa de los Doctores Wilson Popenoe y Watkins, en 1950 se realiza la primera introducción de variedades comerciales y algunos patrones de cítricos provenientes de Florida (U.S.A.), los cuales están localizados en el lote 2, de la Estación Experimental de San Andrés no. 1, posteriormente hubo una segunda introducción, 1959-1962, en la cual se introdujo variedades comerciales y patrones certificados provenientes de California (U.S.A.), los cuales se encuentran localizados en los lotes no. 14 y 13 respectivamente de la Estación Experimental de San Andrés no. 1.^{1/}

Los materiales introducidos fueron observados y evaluados sobre todo en

1/ Tiburcio Benavides, Encargado de Frutales. Operaciones de Campo, CENTA, 1989.

lo relacionado a rendimiento y se promovió el fomento del cultivo en aquellas variedades más sobresalientes, aspecto que se mantiene hasta la fecha, esta situación implica que la mayoría de los cultivos de cítricos en El Salvador (aproximadamente 95%), tengan como fuente original el Banco de Germoplasma del CENTA, ya sea por compra directa de plantas a la Institución o que aunque hayan sido adquiridas en viveros particulares, éstos obtuvieron su material de patrones y fuentes de yemas en el CENTA.

Los cítricos, a pesar de ser considerados como frutas de características sub-tropicales, se adaptan entre los 40 grados latitud norte y 40 grados latitud sur, en cuyo intervalo se encuentra Centro América y lógicamente El Salvador. En nuestras condiciones se han adaptado y producido adecuadamente, encontrándose cultivos desde 10 hasta 1 400 msnm.

Las condiciones climáticas en donde se encuentra el Banco de Germoplasma de Cítricos, son: 1 701 mm de lluvia anual, 23,8 °C de temperatura, 76% de humedad relativa y 460 msnm (2). (Cuadro 1).

Según datos de la Dirección General de Economía Agropecuaria (3), actualmente hay cultivados 7 700 manzanas de cítricos con una producción de 2 117 500 qq, y un rendimiento de 275 qq/mz; sin embargo, no somos autosuficientes con la producción y somos importadores, en el período de los últimos 10 años (1978-1987), los cítricos ocuparon el tercer lugar en cuanto al valor de importación de frutas, situación que puede agravarse debido a muchos factores, especialmente fitopatológicos.

Las variedades de cítricos que en mayor volumen se han propagado por el CENTA y viveristas particulares son: Naranja Jaffa, Valencia, Washington Navel, Bonilla y Piña. Mandarinas Reina, Clementina, Dancy. Limones Pérdico y Criollo. Híbridos Tangelos Orlando, Minneole y Tangerinas.

Cuadro 1. Condiciones climáticas de la Estación Experimental de San Andrés (S.A.).

FACTORES	M E S E S												PROMED. ANUAL
	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Sep.	Oct.	Nov.	Dic.	
Temperatura en °C.	22,5	23,2	24,6	25,5	25,2	24,3	24,1	24,2	23,8	23,6	22,8	22,2	23,8
Humedad re- lativa en %	69	68	68	71	78	84	82	82	85	83	77	72	76
Precipitación en mm.	7	2	10	66	182	295	322	296	304	173	37	7	1701

Fuente : Almanaque Salvadoreño 1987. Centro de Recursos Naturales (2).

Respecto a los antecedentes de carácter fitosanitario, se encuentran nu merosos reportes sobre incidencia de gran cantidad de plagas y de enfermedada des de tipo fungoso, tanto a nivel de CENTA, como a nivel de huertos parti- culares; sin embargo, no se encuentra ninguno de ellos con carácter formal en la determinación de la presencia de enfermedades de tipo viroso, espe- cialmente de tristeza. No obstante lo anterior, en informaciones persona- les con técnicos que están o han estado manejando el Banco de Germoplasma de Cítricos^{1/}, se manifiestan serias sospechas sobre la presencia del virus de la tristeza y de otras enfermedades virosas, debido a la observación por ellos realizadas sobre sintomatología y muerte en varias plantas sobre todo en los últimos años; también ha sido la opinión personal de algunos cientí- ficos y técnicos^{2/} visitantes a dichas áreas de cultivo. Algunas de las va- riedades perdidas son: Limón Cubano, Naranja Tehuacán, Feldi, Carter Navel, Lima, Cidra Stron Carpenter, Tangelo San Jacinto, Tangelo Orlando y Grape Fruit Marsh.

Dentro de la información generada sobre tristeza de los cítricos, hay dos aspectos importantes :

1) Patrones : Se reconoce por muchos autores y en El Salvador se re- porta por Montenegro H. (33) que el patrón de naranjo agrio (Citrus aurantium) Linn, por sí solo es resistente al virus de la tristeza, pero es intolerante en la asociación con variedades susceptibles, esto es preocupan- te ya que un alto porcentaje de los huertos de cítricos en el país se en- cuentran sobre patrón de agrio.

1/ Ing. René Pérez Rivera. Técnico en Frutales, CENTA, 1989.
Tiburcio Benavidez. Encargado de Frutales. Operaciones de Campo, CENTA, 1989.

2/ Dr. Gerald Barbón, Fundación Francesa. 1989.
Dr. Ramón Lastra, CATIE. 1988.

2) Vectores : La transmisión del virus de la tristeza, es por dos mecanismos, injertos y a través de vectores, dentro de éstos se reportan como agentes principales los áfidos, y en El Salvador Montenegro H. (33), y Quezada, R. (43); reportan la presencia de Toxoptera auranti, Aphis gossypii y Aphis espirocolla.

En Centro América, se ha reportado la presencia de tristeza en Honduras (27); y por información personal del Dr. Gerhard Barbón, técnico de la Misión de Cooperación Técnica del Gobierno de Francia, quien manifiesta la presencia de tristeza en Nicaragua, para lo cual Francia ha proporcionado recientemente germoplasma certificado libre de virus y también informa sobre la presencia de dicha enfermedad en Costa Rica, causa que ha motivado que a finales de 1988, se haya prohibido la utilización de naranjo agrio como patrón de cítricos.

Montenegro H. (33), menciona los efectos desastrosos que la tristeza ocasionó en Brasil, Argentina, especialmente por la utilización de naranjo agrio como patrón de las variedades comerciales.

3.2. Distribución geográfica

El virus de la tristeza se encuentra diseminado en la mayoría de los países del mundo, mostrando sintomatología más o menos similar, determinándose algunas variantes y dependiendo del vector que esté involucrado en su transmisión. Así es la intensidad de la enfermedad, en algunos países esta enfermedad es devastadora y causa daños bastante altos.

En El Salvador hasta esta fecha no se ha tenido reportes que confirme la presencia del virus de tristeza.

Para 1988, investigadores de CATIE tuvieron sospechas del virus en el Banco de Germoplasma del CENTA, lo cual ha sido expresado también por otros visitantes pero a manera de opinión personal.^{1/}

Herrera M. (22), reporta la presencia de tristeza en Honduras, en el Valle del Zamorano (E.A.P.), donde se encontraron dos árboles del huerto de cítricos de copa Grape Fruit sobre patrón de limón rugoso, con sintomatología visible típica de tristeza, por lo cual él concluye que el virus se encuentra en Honduras, ya que los resultados de ELISA efectuados en la Universidad de Florida salieron con niveles cercanos al T3 aunque ninguno tan positivo como el de Florida, aunque se tiene presencia del vector Toxoptera citricida en los cítricos del país, se cree que probablemente no se ha expandido debido a las condiciones ambientales y a que los cítricos de la Escuela Agrícola Panamericana se encuentran en un valle y bastante alejados de las plantaciones comerciales. Timmer^{2/}, estima que es importante el muestreo de cítricos en Honduras y El Salvador, ya que este virus es transmitido por un insecto vector alado, Toxoptera citricidus y ha sido detectado recientemente en Nicaragua, país fronterizo con Honduras y éste a su vez con El Salvador, se realicen evaluaciones ya que registros de la presencia del CTV en Centro América son escasos.

Varios autores citan la presencia del virus en Estados Unidos, en California, Florida, Texas, su diseminación y métodos de transmisión desde 1946 (47). Al igual que la infección natural de especies relativos y de híbridos y, el incremento rápido de tristeza en Florida (10).

Brasil es uno de los países más afectados por este virus, su aparición

^{1/} Ph. D. Pete Timmer, Profesor Plant Patology, Citrus Research and Education Center. 1989.

^{2/} Ibid.

la tuvo en San Pablo a través de plantas importadas de Africa del Sur, en 1946 quedó establecido que era una enfermedad causada por un virus (11).

El virus de la tristeza en los cítricos es un complejo viral que está ampliamente distribuido en todas las áreas de los países en donde se siembra cítricos (1).

En Argentina y por primera vez en América del Sur, Carrera (1933, 1935), fué dada a conocer la presencia de la enfermedad (46).

Más tarde, en 1943 Weather, citado por Sarasola (46), comparó la enfermedad Argentina con la de Africa del Sur, estableciendo que el naranjo agrio de pie franco, el dulce o mandarino o injertado sobre limón rugoso se desarrollan bien, y que sólo el dulce, el mandarino y el pomelo injertados sobre agrio son afectados por la enfermedad y terminan por morir (46, 38).

Bitancourt (1940), encontró la misma enfermedad en Brasil, y en años antes Fawcett la observó en California (E.U.A.), llamándola quick decline (46).

En Egipto está presente el virus de la tristeza; transmitido por Aphis gossypii pero en forma menos violenta que T. citricidus, aunque éste no está presente en el país, los autores reportan como parte de un programa de reconocimiento de virosis y enfermedades de los cítricos, que realizaron injertos experimentales de porciones de árboles sospechosos de tristeza, y al ser examinado el ensayo, se observaron que las plantas injertadas con sospechas de virus presentaban los síntomas característicos de la tristeza (36).

La misma situación se presentó en Colombia y se cree que posiblemente el virus exista desde 1933 con la introducción del limón Meyer de California (42).

En Venezuela, fue reportado el C.T.V. en 1960, pero hasta el momento no

se ha localizado en siembras comerciales, pero constituye una gran amenaza ya que su vector Toxoptera citricidus está diseminado en toda la zona (49). Este virus está corrientemente presente en Limoneros Meyer, en Chile con la ventaja de no encontrarse en huertos caseros y comerciales (51).

3.3 Naturaleza de los virus

Los virus son entes infecciosos, submicroscópicos, compuestos de una o varias moléculas de ácido nucléico. La mayoría de los virus que afectan las plantas consisten de ácido ribonucleico (ARN) a diferencia de los virus que afectan animales consisten de ácido desoxiribonucleico (ADN). Estos se multiplican solamente en las células vivas, el ácido nucléico viral contiene toda la información genética necesaria para organizar su multiplicación pero depende por entero de componentes aportados por la célula, en ocasiones este proceso de multiplicación requiere la presencia de otros virus.

En la partícula viral madura e inactiva, el ácido nucléico está rodeado por una cubierta protectora de proteína, pero durante el proceso intracelular de multiplicación el ácido nucléico actúa por sí solo (26). Otro concepto lo ofrece García Alvarez (23), diciendo que virus es el principio infeccioso o agente etiológico capaz de atravesar los filtros que retiene las bacterias.

Las técnicas para el estudio de los virus son muy especiales, requieren de instrumental complejo, apropiado y detallado (46).

En 1957 se estableció en Tucuman que plantas enfermas por virus, mostraban disminución de la reserva de glucóidos y proteínas, posiblemente por la reducción de clorofila y de la actividad fisiológica limitada a la fun-

ción ción respiratoria y enzimática, cuya consecuencia es la menor moviliza-
ción del energético (almidones) hasta las hojas (46).

El virus de la tristeza de los cítricos es un Closterovirus y es una de
las virosis más frecuentes de las plantas. Es una partícula aproximadamen-
te de 2 000 nm de largo por 12 nm de diámetro, está presente solamente en
las células del floema, no es transmitido mecánicamente, pero sí por injer-
tos y vectores (1, 46).

3.4. Sintomatología de tristeza

Agrios (1), menciona que la tristeza presenta síntomas como debilita-
miento general del árbol (rápida o lenta), hojas amarillentas que pueden
caer o quedar secas sobre el árbol, la muerte de raíces secundarias y que
después toman parte las principales, brotaciones terminales nulas o morteci-
nas, se propagan las brotaciones interiores, cortas y con carencias, orifi-
cios pequeños, visibles a simple vista muy juntos debajo de la unión con la
yema, los frutos son de tamaño pequeño (inferiores a los normales) y colo-
rean prematuramente.

Los síntomas típicos de tristeza descritos por Agrios, varían según
huésped y en cada huésped si crecen en diferentes rizomas para el declina-
miento crónico y rápido de las yemas sobre rizomas susceptibles, muerte re-
gresiva, depresión en las raíces, disminución del vigor y el fruto anormal,
son la evidencia típica del virus de la tristeza.

Rebour (41) describe la sintomatología como un agotamiento brusco y ge-
neralizado del árbol y que la muerte sobreviene en algunos años.

Moreira (34, 40), dice que los síntomas de tristeza son semejantes a --

los causados por la pudrición del pie y fallas de los rizomas, aunque se puede distinguir la tristeza examinando la raíz, y que las picaduras (pitting) permite identificar el virus en pomelos y limas, obstrucción de vasos que conducen alimento, ocasiona la muerte de las raíces. Manchas de deficiencia en las hojas, defoliación, muerte de las ramas y grave enanismo, estos síntomas pueden ser visibles.

Para Elsaid (21) la identificación de tristeza en naranja agria son necrosis del floema en el tallo y raíz a nivel de las células cromáticas del floema.

Autores como Araujo y Vasconcellos (4), citan que un síntoma descrito son las raspaduras y el cual al finalizar sus investigaciones concluyó que las raspaduras eran causadas por el agente causal de la tristeza.

Planes (38), asegura que no existe una sintomatología clara de la tristeza, pues ninguno de los síntomas externos que aparecen sobre un árbol afectado pueden considerarse como específicos de la enfermedad, la acción de la misma en una combinación sensible se manifiesta por la necrosis de los vasos liberanos, lo que restringe la circulación de la savia hacia las raíces, provocando agotamiento y muerte de los mismos, el decaimiento, tamaño del fruto anormal, defoliación y finalmente el árbol muere.

Sarasola (47), a través de una recopilación del curso avanzado de Bacteriosis virosis, nos dice que la clorosis seguida de un decaimiento general se presentan en árboles de cualquier edad en un plazo de 6 meses o menos; un aumento en la fructificación, defoliación, y la pudrición de las raíces son síntomas generales.

Para Rohm y Pratt (43, 39), un síntoma específico de tristeza es el efecto de panales que consiste en pequeños orificios apiñados, en la parte baja del injerto a simple vista, pero que pueden distinguirse más fácilmente

te con lente de aumento.

La tristeza presente en América del Sur, es distinta a la del Hemisferio Norte del Viejo continente. Knorr (1956-1957), fue uno de los autores que más estudió este aspecto de la enfermedad, dice el autor que la tristeza de Argentina, Brasil como también Africa del Sur y Australia, se caracteriza por producir picaduras (pitting) y dentro de las acanaladuras, el tejido toma la apariencia de cuerdas que se deshilachan.

Este síntoma tan característico no se observa en América del Norte en donde la enfermedad por otra parte, produce necrosis en el floema en la unión de naranjo dulce sobre agrio estando por lo contrario en Sur América extendida sobre Lima y Pomelo. Otro síntoma son ramas principales torcidas, crecen hacia abajo, síntomas de deficiencia de zinc y manganeso, frutos ácidos y con poco jugo (45).

3.5. Razas

Cuando se estudian las diferentes reacciones de las especies y variedades de cítricos inoculado con material vegetativo de diferentes grados de afección, por el Virus de la Tristeza; los diferentes tipos de reacciones inducidos en las plantaciones son las que nos indican que del virus responsable existen razas distintas, incluso la concentración de partículas virales de los extractos que sacados del material vegetativo confirma la existencia de diferentes razas, los extractos ricos en partículas virales producen sintomatología leve y los pobres en partículas virales producen síntomas moderado-graves (20).

En Africa se ha establecido la existencia de razas benignas de virus puros, pero no se ha obtenido una conclusión exacta y aseveran que deben expe

rimentar más aún para conocer una respuesta verdadera (30).

En 1951 Grant y Costa, demostraron la existencia de diferentes razas ("Strains") del virus. En general son razas muy leves, leves severas y muy severas, estando a veces mezcladas.

En Australia Fraser (1952), describió una enfermedad llamada Ywllows seedlings, que puede volver a desaparecer, es decir que el follaje puede volver a recuperar su color verde normal que había sido modificado por una característica clorosis foliar; esta clorosis debe ser considerada como una raza del virus de la tristeza, pues según Costa, Grant, McClean y Van der Plank siempre va acompañada de los otros síntomas como clorosis y picaduras, Wallace y Drake (1961), separaron Yellows seedlings por el color, determinando además la preferencia del virus por las yemas de la base o del extremo del brote, otra raza de tristeza fue estudiada por Matsumoto y Wang al que llamaron Licubin (algunos autores lo incluyen como micoplasma y no como virus) encontrándolo más semejante a la tristeza de América del Sur y además produce reacción sobre Aeglopsis Chevalieri, Swingle. Esta especie pariente de los citrus, es muy sensible por lo que Knorr la utilizó como tests en Argentina, ya que produce clorosis y Stem-pitting. En el Japón -- fue estudiada por Tanaka otra raza que llamó Hassahu dwarf, existen pues gran cantidad de razas que producen síntomas diferentes, las razas de América del Norte son menos virulentas que en América del Sur, las razas se van formando naturalmente por mutaciones y un día pueden afectar a una variedad o especie que parece no ser sensible (46).

Tristeza es la más grave de todas las virosis, es causada por un complejo virótico sp. "citriver viatoris", constituido por 3 cepas: T1 (virus muy débil), T2 (virus débil); T3 (virus severo), combinaciones binarias y terciarias (16, 27).

3.6. Daños

En cuanto a daños ocasionados por el virus de la tristeza parece ser que en Honduras no representa un problema serio por el momento, ya que en estudios hechos por Herrera dice que los análisis efectuados por el Método de ELISA en la mayoría de los árboles fueron negativos, algunos salieron dudosos y otros, talvés positivos pero no había ninguno que fuera tan positivo como el T3 de Florida (27). En América del Sur han sido catastróficos los efectos económicos principalmente sobre los frutos, al producirse una reducción en el tamaño normal, en aumento en la acidez y otras alteraciones que perjudican el valor comercial (44).

El contenido protéico encontrado en el floema del injerto de árboles enfermos, es significativamente menor que el determinado en árboles sanos (10, 31).

El ingeniero Rafael Francios (35), considera que las enfermedades virosas son las que constituyen el mayor factor de costo de producción de los cítricos, ya que hasta el momento son incurables y los árboles enfermos, reducen mucho su producción y su vida comercial.

Se estima que 40 millones de árboles han sido destruidos por C.T.V. en América del Sur, cuyo patrón era Auranti (naranja agrio), que es altamente susceptible al virus, en Honduras este virus representa un problema para los cítricos de esta región, ya que un gran número de árboles están injertados sobre ese patrón susceptible (27).

3.7. Mecanismos de propagación

La tristeza es una enfermedad causada por un complejo viral cuya acti

vidad patogénica obstruye los vasos que conducen alimentos, en la unión de las yemas de algunas combinaciones de cepas y púa. La enfermedad varía considerablemente en gravedad debido a que existen diversas razas o cepas de virus (39), la misma situación se presenta en los mecanismos de transmisión, ya que puede ser a través del injerto y por vectores que pertenecen al grupo de los áfidos (pulgonos) (1, 32, 41).

Es importante decir que este virus no se transmite por semilla ni savia (1, 7, 46).

3.7.1. Transmisión por vectores

En el campo la mayoría de los virus que afectan a las plantas son transmitidos por insectos, sólo unos pocos son por nemátodos, hongos y ácaros. Los vectores más importantes son los áfidos, Orden Homóptera, Familia Aphidae) que se han demostrado como transmisores de más de 170 virus (26).

Entre los años 1969 y 1972, el Dr. Rutilio Quezada hizo un muestreo en algunos departamentos de nuestro país, sobre las principales especies de insectos asociados al cultivo de los cítricos en El Salvador.

De la Estación Experimental San Andrés # 1 y a nivel nacional, de donde son reportados los insectos de la Familia Aphidae entre los cuales están: Pulgón Negro Toxoptera auranti, pulgón verde Aphis spiraeicola y pulgón de el algodón Aphis gossypii; todos éstos se reproducen en forma partenogénica (40).

Meneghini (1946-1948), determinó que la transmisión de la enfermedad se producía por el áfido Paratoxoptera citricidus en Brasil (49) al igual que Aphis tabaresi (31) y está en Argentina el P. argentinensis. El mismo año

Faucett y Wallave determinaron en California la transmisión por injerto, aunque Dickson (44), en 1951 comunicó que el insecto transmisor en California no es el mismo que en la Argentina, sino que se trata del Aphis gossypii.

Los vectores se tornan infectivos poco tiempo después de alimentarse sobre la planta y pierden rápidamente la habilidad para transmitir. El Aphis gossypii en California se infecta en 5 minutos y pierde efectividad a las 2 horas; P. citricida se infecta en 1 hora, inocula plantas sanas en 30 minutos y pierde efectividad en 24 horas, si queda en ayunas puede conservar al go del poder infectivo pero no más de 48 horas, esta especie inocula todas las razas.

Norman y Grant (1957), en Florida (E.U.A.), determinaron como transmisor al Aphis spiraeicola o pulgón verde y también a Toxoptera orangi que es el áfido cafetalero, Hughes y Lister citaron al coccido Ferrisia virgata como probable transmisor en Africa, pero no ha sido comprobado (44).

De acuerdo a investigaciones realizadas, varios autores han determinado que Toxoptera citricida es un vector que presenta alto nivel de eficiencia para la transmisión, en California (37), en Filipinas (29) y en Bolivia - (48).

A pesar de la gran diseminación de árboles infectados en diversas zonas productoras de Agrios en Chipre, parece que ha habido poca propagación natural, los autores concluyen que cepas locales de Aphis gossypii y Toxoptera auranti son vectores poco eficientes para transmitir el C.T.V. en Chipre (37). En 1960 en Venezuela no se había localizado la enfermedad en siembras comerciales, pero constituyen una grave amenaza debido a la presencia de T. citricidus, y por el porta-injerto utilizado "naranja casera" es extremadamente susceptible al virus (49). Se demostró que en California y en

Florida, el Aphis gossypii puede transmitir el virus, en Florida se consiguió también la transmisión con A. spiraecola (50).

3.8. Técnicas serológicas y de Tinción para diagnóstico de tristeza.

Existe una serie de técnicas para la detección del virus de la tristeza, entre los cuales están : El método de reservas de almidón con tinción de yodo. Garnsey-Youn, Bawden y Fawcett (1, 7, 24), describen este método con el fin de determinar el almacenamiento de las sustancias energéticas (almidones). Las cuales en las plantas sanas y normales siempre está presente aunque en proporciones diferentes, aún en la misma, ya sea por la estación o demanda de la cosecha (fruta). En las enfermedades virales de las plantas, en múltiples estudios se ha demostrado la relación en proporción inversa del contenido de almidón por las plantas infectadas que puede llegar hasta la depleción del mismo, tales reservas pueden ser determinadas visualmente utilizando el método de tinción con yodo, exponiendo el material a investigar (raíz o tallo) a la solución yodada de 2% de yoduro de potasio y 0.2% de yodo elemental, durante unos minutos para obtener una coloración azul oscura que denota la presencia de almidón, indicando esto la ausencia del virus, en el punto de unión del patrón-injerto y una coloración clara en este mismo sitio si no existe almidón lo que presume la presencia del virus de tristeza.

La técnica serológica de ELISA (complejo enzima-inmunsorbente-antisuero) descrita por varios autores (34, 6), en la que realizan esta prueba utilizando fosfatasa alcalina conjugada con un purificado de gamma-globulina de antisuero para un purificado de C.T.V., el virus fue rápidamente detectado

en los extractos de las plantas inoculadas experimentalmente y en extractos de muestras infectadas colectadas del campo en la cual el método de ELISA demostró igual efectividad para la detección de la tristeza de Israel y Florida (24), el virus fue detectado en varios tejidos conteniendo floema, durante las estaciones de frío y calor, aunque fue más fácilmente detectable en la cáscara de frutos pediculados. Este examen fue generalizado para la aplicación en la detección de plantaciones grandes, pero cuando reusó del complejo enzima-anticuerpo para cuatro aplicaciones consecutivas (24).

Clark y Adams (17, 18), describen el principio de la técnica de ELISA, de esta manera: En un recipiente colocan el anticuerpo específico absorbido, luego esta muestra es lavada, en seguida se le agrega la muestra a examinar conteniendo el virus, lava la muestra nuevamente y se le agrega la enzima etiquetada para el anticuerpo específico, vuelve a lavar la muestra y se agrega el sustrato enzimático, midiendo la intensidad del color que va en proporción a la concentración del virus en este preparado. Las muestras son lavadas con soluciones bufer, la enzima utilizada es fosfatasa alcalina.

3.9. Medidas de control

En vista de que la enfermedad del virus de la tristeza (C.T.V.) es un problema grave en casi todos los países, y debido a la forma de propagación de ésta, se tomaron medidas de control tanto para su diseminación, como para la eliminación, los autores citados a continuación (8, 9, 22, 28, 29, - 32, 41, 49), indicaron que la solución para el combate y control más eminentes y adecuadas eran: determinar la dispersión de la enfermedad en el país, injertar sobre patrones tolerantes, uso de variedades resistentes, control

permanente de áfidos, extirpación del pulgón negro (Toxoptera auranti) y hacerles pruebas de virulencia a todos los posibles vectores, propagación de yemas libres del virus, eliminación e incineración "in situ", injerto por aproximación reinjertación de la copa con limonero, medidas culturales más específicas como mantener el cultivo limpio, sobre todo de posibles hospederos de los vectores y muestreos continuos de éstos; reemplazos en los huertos por árboles jóvenes, control de calidad a los frutos, determinación de las razas más virulentas y la existencia de éstas en el país.

El uso de productos químicos como Dimetoato, Folithion, Mecarban, Baygon, Methil Parathion mostraron eficiencia para el control de Toxoptera citricidus en Brasil en 1968 (14) y el uso de Pirimicarb (Pirimor) en Venezuela.

Para la obtención de plantas libres de virus se ocupa la termoterapia siendo éste el método más utilizado con el objeto de obtener plantas o parte de éstas libres del virus, esta técnica se fundamenta en la temperatura que permite la inactivación del virus o impide su síntesis sin afectar la viabilidad de ellos, la temperatura varía entre 35 °C a 54 °C; y el tiempo entre minutos a horas (45).

3.10. Patrones tolerantes recomendados

Bondel (12), recomienda que aunque la toronja es muy sensible a la tristeza, ésta es casi siempre utilizada para patrón de injerto en las regiones mediterráneas. En razón de la amenaza de esta enfermedad, resulta necesario reemplazar la toronja por patrones nuevos; entre éstos están: Poncirus trifoliata, citranger troyer y naranjo mandarino cleopatra (39, - 50).

Fusagri (15), estudió las características principales en relación a comportamiento de enfermedades virosas de portainjerto entre las cuales reporta como patrón resistente a citrange carriso, citrange Morton, citrunelo swingle y tolerantes a Mandarina Cleopatra, Limón Rugoso, Mandarina Sunki, Tangelo Orlando, Lima Rangpur, Naranja Dulce, Citrus Amblycarpa y Citrus - Volkameriana.

Agrios y Sarasola (1, 44) reportan que el naranjo dulce, la lima o mandarina Rag Pur, tangerine, M. Cleopatra, limón rugoso; P. trifoliata, son los principales portainjertos tolerantes; Citranger toyer es también reportado como uno de los principales (1).

3.11. Patrones susceptibles

El principal patrón o portainjerto susceptible es el Naranjo Agrio y el Pomelo Marsh (2, 44).

Wathers en 1943 estableció que Naranjo Dulce, Mandarino y Pomelo injertados sobre Naranjo Agrio son afectados por la enfermedad, anteriormente en 1928 en Java, Toxopeus observó la muerte de plantas de 8 a 12 meses que habían sido injertados sobre agrio.

Los efectos de Naranjo Agrio como patrón portainjerto susceptible datan desde 1890 en Africa del Sur en donde se observó que al injertar Naranjo -- Dulce sobre pie agrio sufría una rápida declinación, síntoma característico de tristeza (44).

4. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó de diciembre de 1988 a abril de 1989, en la Estación Experimental San Andrés # 1 en el Banco de Germoplasma del Centro de Tecnología Agrícola CENTA, km 33 1/2 carretera a Santa Ana, departamento de La Libertad, a una altura de 460 msnm, con una latitud Norte de 89,24° y una longitud Oeste de 13,59 °; con una temperatura media de 23,8°C, precipitación 1 701 mm/año/año y humedad relativa 76%, topografía plana y suelo franco arenoso con bajo contenido de fósforo y nitrógeno, bueno en potasio y pH 6,7; el área total muestreada fue de 34 112 m² (Cuadro 2). Se muestrearon 58 variedades de cítricos con distanciamiento de 8 x 8 m.

Se muestrearon 3 lotes los cuales se dividieron en 6 bloques, con 533 árboles en total, cada uno de estos bloques contenían diferentes cantidades de árboles, variedades y área (Cuadro 3), para las muestras se tomaron en cuenta las variedades presentes (Cuadro 4) en los bloques. Cada árbol seleccionado fue debidamente marcado con spray para un posterior reconocimiento. Se tomaron de 4 a 5 submuestras en diferentes posiciones del árbol obteniendo al final una sola muestra homogenizada. Estas consistían en brotes tiernos del árbol, se colocaron en bolsas plásticas y luego depositadas en viales de 7 cms de alto y 1,5 cm de diámetro, el vial contenía secante y algodón, el secante utilizado fue sulfato de calcio, el objetivo de éste fue absorber la humedad, las muestras fueron debidamente tapadas y así evitar entrada de hongos al ser trasladadas a los laboratorios del Citrus Research and Education Center de la Universidad de Florida/Institute of Food and Agricultural Science, Lake Alfred, en donde se le aplicaría el método de ELISA. Al árbol que se le tomó la muestra de brotes tiernos para

Cuadro 2. Cantidad de árboles, variedades y áreas totales en cada bloque.

Bloques	Arboles Total en Bloques	Variedades en cada bloque	Area muestreada (m ²)
I	47	19	3 008
II	80	13	5 120
III	61	28	3 904
IV	168	47	10 752
V	124	12	7 936
VI	53	1	3 392
T O T A L	533	168	34 112

Cuadro 3. Cantidad de árboles y variedades muestreadas por bloque.

Bloques	Arboles total en bloque	Variedades muestreadas por bloque	Arboles muestreados
I	47	7	7
II	80	8	16
III	60	8	8
IV	168	35	44
V	124	9	19
VI	53	1	6
T O T A L	533	68	100

Cuadro 4. Código de total de árboles muestreados en el Banco de Germoplasma de cítricos del CENTA.

No.	Variedades muestreadas	Código	B L O Q U E S					
			I	II	III	IV	V	VI
1	Naranja Hamlin	1.01.04	x					
2	Naranja Piña	1.01.05	x					
3	Mandarina Reina	1.02.01	x					
4	Kunquat Nagami	1.03.01	x					
5	Kunquat Marumi	1.03.05	x					
6	Limón Persico	1.04.02	x					
7	Naranjo Agrio	1.04.05	x					
8	Naranja Valencia	2.01.02		x				
9	Naranja Valencia	2.01.02		x				
10	Naranja Washington	2.01.04		x				
11	Naranja Valencia	2.05.03		x				
12	Naranja Valencia	2.05.06		x				
13	Naranja Valencia	2.05.11		x				
14	Naranja Jaffa	2.06.01		x				
15	Naranja Jaffa	2.06.05		x				
16	Naranja Jaffa	2.06.08		x				
17	Tangelo Orlando	2.07.03		x				
18	Tangelo Mineole	2.07.06		x				
19	Naranja Piña	2.07.08		x				
20	Naranja Malagueña	2.08.09		x				
21	Naranja Hamlin	2.08.02		x				
22	Naranja Hamlin	2.08.04		x				

Cuadro 4. (Continuación).

No.	Variedades muestreadas	Código	B L O Q U E S					
			I	II	III	IV	V	VI
23	Naranja Catlin	2.08.07		x				
24	Naranja C.E.S. 25-77	3.01.05			x			
25	Naranja Majorca	3.01.06			x			
26	Poncirus Trifoliata	3.02.04			x			
27	Grape Fruit Mercedes	3.02.13			x			
28	Naranja Clementina	3.03.03			x			
29	Dancy Tangerine	3.03.06			x			
30	Grape Fruit Progr.	3.05.06			x			
31	Naranja Jaffa	4.01.03				x		
32	Naranja Jaffa	4.01.06				x		
33	Naranja Valencia	4.01.11				x		
34	Naranja Valencia	4.01.14				x		
35	Naranja Hamlin	4.02.03				x		
36	Naranja Hamlin	4.02.05				x		
37	Naranja Enterprice	4.02.14				x		
38	N. Parson Browan	4.02.16				x		
39	N. Washington 22-4	4.03.06				x		
40	N. Washington 22-4	4.03.07				x		
41	N. Washington 23-5	4.03.14				x		
42	N. Washington 23-5	4.03.15				x		
43	Naranja DGIA	4.04.02				x		
44	Naranja DGIA	4.04.06				x		

Cuadro 4. (Continuación).

No.	Variedad muestreada	Código	B L O Q U E S					
			I	II	III	IV	V	VI
46	N. Page Orange	4.04.10				x		
47	N. Page Orange	4.04.11				x		
48	Nova Tangelo	4.05.03				x		
49	Robinson Tangerine	4.05.05				x		
50	Lee Tangerine	4.05.12				x		
51	Queen Pineapple	4.05.16				x		
52	Mandar. Marcottss	4.06.05				x		
53	Naranja Agria	4.06.08				x		
54	Dancy Tangerine	4.06.14				x		
55	Grape Fruit Ruby-Red	4.07.05				x		
56	Grape Fruit Duncan	4.07.07				x		
57	Grape Fruit Foster	4.07.09				x		
58	Citron Corcican	4.07.11				x		
59	N. Ruby Red	4.08.04				x		
60	Lima Selc. Nacional	4.08.07				x		
61	Mandarina Libert.Criolla	4.09.03				x		
62	Limón Pérsico	4.09.07				x		
63	Limón Pérsico	4.09.08				x		
64	Limón Pérsico	4.09.09				x		
65	Mandarina Meardi	4.10.01				x		
66	Valencia Sob.Patr. Trifo liada.	4.10.05				x		
67	Valencia Sob.Patr. Ling Mung.	4.10.06				x		

Cuadro 4. (Continuación).

No.	Variedades muestreadas	Código	B L O Q U E S					
			I	II	III	IV	V	VI
68	Valencia Sob.Patr. Red Ling Mung.	4.10.08				x		
69	Valencia Sob.Patr. Citremon	4.10.10				x		
70	Valencia Sob. Patr. Loonar	4.10.12				x		
71	Valencia Sob. Patr. Citrandarin	4.11.01				x		
72	Valencia Sob. Patr. Smiki Mandarin	4.11.03				x		
73	Valencia Sob.Patr. Misribatabi	4.11.05				x		
74	Valencia Sob.Patr. Trifoliata Rubidaux	4.11.07				x		
75	Valencia Sob.Patr. Cleopatra	4.11.10				x		
76	Leonardi	5.01.06						x
77	Citrandarin	5.01.08						x
78	Smiki Mandarin	5.01.10						x
79	Red Ling Mung	5.01.12						x
80	Rubidaux Trifoliata	5.02.02						x
81	Naranja Agria Certificada	5.02.04						x
82	Naranja Agria Certificada	5.02.07						x
83	Naranja Agria Certificada	5.03.01						x
84	Mandarina Cleopatra	5.04.02						x
85	Mandarina Cleopatra	5.04.08						x
86	Mandarina Cleopatra	5.06.06						x

Cuadro 4. (Continuación).

No.	Variedades muestreadas	Código	B L O Q U E S						
			I	II	III	IV	V	VI	
87	Mandarina Cleopatra	5.08.03						x	
88	Mandarina Cleopatra	5.08.07						x	
89	Poncirus Trifoliata	5.09.01						x	
90	Poncirus Trifoliata	5.10.05						x	
91	Carriso	5.11.02						x	
92	Carriso	5.12.04						x	
93	Carriso	5.13.04						x	
94	Carriso	5.14.05						x	
95	Naranja Agrio	6.03.03							x
96	Naranja Agrio	6.03.05							x
97	Naranja Agrio	6.07.02							x
98	Naranja Agrio	6.07.03							x
99	Naranja Agrio	6.11.02							x
100	Naranja Agrio	6.12.02							x

ELISA se le hizo también el método de Tinción con Yodo. Las muestras se co
dificaron para efectos de identificación.

Cada método se consideró como un tratamiento y se usó un diseño de muestreo
azarizado estratificado en especies, basándose en la fórmula matemática de :

$$n = \frac{Nt^2 pq}{Nd^2 + t^2 pq}$$

En donde :

N = Población total de árboles

q = Probabilidad 0,5

p = Probabilidad 0,5

d = Valor de confiabilidad de 0,1

t = t Student 120 grados de libertad

n = Número de muestras tomadas

Aplicando la fórmula se obtuvo un n de : 82,78 muestras, como mínimo, -
para efectos de seguridad en caso de perderse alguna muestra se tomó un --
n = 100.

$$n = \frac{533(1,98)^2 (0,5) (0,5)}{533(0,1)^2 + (1,98)^2(0,5)(0,5)}$$

n = 82,78 ---- 83 muestras mínimas.

Codificación de las muestras (Cuadro 4)

E.S. CENTA

1.01.05/89 en donde :

E.S. = El Salvador

CENTA = Lugar de recolección

1 = Bloque

- 01 = Línea (según plano de campo)
05 = Pos-ción dentro de la línea (árbol)
/89 = Año de recolección.

Las muestras de brotes tiernos fueron tomadas los días 2 y 3 de enero - de 1989 y éstas fueron enviadas a Florida el 7 de enero de 1989, la prueba del Yodo se hizo 4 y 5 de enero.

Los métodos utilizados fueron dos, los que se describen a continuación:

A) Método de tinción con yodo

Está basado en la reacción con yodo (yoduro potásico) con el almidón, que se adquiere un tinte azul-negro, o una coloración clara; la prueba se - realizó en la unión injerto-patrón.

El procedimiento a seguir fue el siguiente:

Un raspado longitudinal en la unión patrón-injerto de forma rectangular de más o menos 12 cms de largo en la corteza, y en esta área desnuda se le aplicó una solución de yoduro de potasio al 2,0%, obteniendo en unos una coloración café oscura, tanto en injerto como patrón y en otros una coloración clara, este último resultado fue tomado como positivo para C.T.V. por cuanto demostró la ausencia o la poca existencia de almidones en dicha zona, lo cual es usual en las enfermedades virales.

B) Método ELISA

Método del complejo enzima-inmunosorbente-antisuero utilizado en este - trabajo fue el Clark, de doble anticuerpo sandwich, que es el método clásico. Las muestras fueron de los brotes tiernos de las yemas terminales, las cuales fueron molidas en un mortero, se usó un anticuerpo de una cepa del - virus de tristeza de Florida, ya que el germoplasma en estudio es procedente del mismo estado, y este anticuerpo es de tipo policlonal, lo cual perm

te detectar cualquier raza de tristeza.

Con esto se midió la intensidad de la reacción colorimétrica a 410 nm (nm = nanómetros, unidad de absorbencia) en espectrofotómetro.

El test fue corrido a cargo de los Drs. L.W. Timmer y R.F. Lee de la -- Universidad de Florida.

Para efectos de comparación de los 2 métodos se utilizó la prueba estadística t de doble cola, en la cual se pretende una distribución entre dos medias (métodos), a efectos de verificar si existe diferencia entre los dos métodos (Cuadro 5), se hizo un reconocimiento de áfidos a los cítricos y - cultivos vecinos en el momento de la recolección de muestras y así poder conocer los vectores presentes en nuestro país, en una época determinada, tomando en cuenta la vegetación y cultivos existentes a los alrededores de - los lotes muestreados, los áfidos fueron : Aphis gossypii y Toxoptera auranti.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

En el análisis estadístico t de doble cola en el Cuadro 5, nos indica - que al comparar la distribución de los dos métodos utilizados ELISA y YODO para establecer la comparación entre éstos, obtuvimos un resultado no signi- ficativo, para lo cual se puede decir que desde el punto de vista matemáti- co el Método de Tinción de Yodo (método realizado en el campo) y ELISA (mé- todo de laboratorio), se comportan de la misma manera, también se puede no- tar en el Cuadro 9, que sólo hay una diferencia de 3 muestras entre un mé- todo y otro y, aunque se cuenta con el problema que el método de Yodo es vi- sual, por lo tanto no es exacto y está sujeto al criterio de la persona que lo efectúa, además de no ser específico para C.T.V., por lo tanto no se po- dría recomendar para hacerlo en un muestreo nacional y decir que existe C.T.V. en una plantación de cítricos.

Cuadro 5. Prueba t de doble cola.

$\frac{1/}{n}$	M E T O D O S	
	(A) Yodo	(B) ELISA
1	0,411	0,357
2	0,125	0,125
3	0,381	0,381
4	0,25	0,375
5	0,00	0,00
6	0,00	0,50
7	0,00	0,00
8	0,00	0,00
9	0,00	0,00

1/ n = Especies.

En donde :

n	9	9
\bar{M}_x	1,167	1,738
\bar{M}_{x_2}	0,392	0,679
F.C.	0,151	0,336
\bar{x}	0,130	0,193

$$Sc2 = \frac{(0,392 - 0,151) + (0,679 - 0,336)}{16}$$

n = Especies :

- | | |
|-----------------|----------------|
| 1 = Naranja | 6 = Kunqueat |
| 2 = Limón | 7 = Lima |
| 3 = Mandarina | 8 = Cidra |
| 4 = Grape Fruit | 9 = Sin nombre |
| 5 = Tangelo | |

$$Sc2 = \frac{(0,241) + (0,343)}{16} = 0.037$$

$$/t/ = \frac{(0,130 - 0,193) - 0}{2(0.037)/9} = \frac{-0,063}{0,082} = -0,692$$

$$/Tc/ \quad Tt$$

$$0,05$$

$$- 0,692^{ns} \quad 2,365$$

Partiendo que son números de árboles con virus del total muestreados.

Cuadro 9. Número de árboles positivos en cada bloque y en cada método.

METODO	B L O Q U E S						TOTAL
	I	II	III	IV	V	VI	
ELISA	3	4	4	17	4	1	33
YODO	5	5	3	14	4	5	36
TOTAL	8	9	7	31	8	6	

Cuadro 8. Incidencia numérica y porcentual de tristeza, según especies de cítricos, por los métodos de ELISA y Yodo.

Especie	No. total <u>ár</u> boles por <u>es</u> pecie	No. árboles muestreados por especie	Reacción Positiva			
			YODO	%	ELISA	%
Naranja	291	56	23	41,1	20	35,7
Limón	37	8	1	12,5	1	12,5
Mandarina	128	21	8	38,1	8	38,1
Grape Fruit	38	8	2	25	3	37,5
Tangelo	19	3	-	0	-	0
Kunquat	5	2	2	0	1	50
Lima	6	1	-	0	-	0
Cidra	4	1	-	0	-	0
Sin nombre	5	-	-	0	-	0
T O T A L	533	100	36		33	

Para efectuar el análisis estadístico, se transformaron los datos a porcentajes, así tenemos que para el método de Yodo en Naranja se obtuvo 41,1%, Limón 12,5%, Mandarina 38,1%, Grape Fruti 25%, para Tangelo, Kinquat, Lima y Cidra no se obtuvo ningún porcentaje. Los resultados de los patrones más susceptibles en el método de Yodo (Cuadro 7), de 36 muestras positivas fueron Naranjo Agrio 41,66% y 27,77% sobre Mandarina Cleopatra, 25% en semilla, 2,77% en Smiki Mandarina y Cintradarin. El Cuadro 11 presenta el número de árboles muestreados por bloque, y se observa que en el bloque IV es el que mayor número de muestras positivas presenta, aunque este bloque cuenta con el mayor número de árboles, variedades y área. Al comparar estos resultados con los de Herrera (27); y podemos decir que hay una diferencia muy grande, ya que allá no resultaron positivos con Yodo ninguno de los árboles; sin embargo, en el presente estudio contamos con una mayor cantidad de árboles y sí se encontró respuesta positiva con Yodo.

Cuadro 7. Resultados de la coloración positiva en árboles muestreados en -
 el Banco de Germoplasma del CENTA, para la detección de tristeza
 por el método de Tinción con Yodo.

Código del árbol	Resultado (Positivo)	Patrón
1.02.01	Positivo	M. Cleopatra
1.03.01	Positivo	M. Cleopatra
1.03.05	Positivo	M. Cleopatra
1.04.02	Positivo	M. Cleopatra
1.04.05	Positivo	M. Cleopatra
2.02.01	Positivo	M. Cleopatra
2.07.08	Positivo	M. Cleopatra
2.05.11	Positivo	M. Cleopatra
2.07.09	Positivo	N. Agrio
2.08.04	Positivo	N. Agrio
3.01.02	Positivo	N. Agrio
3.01.06	Positivo	N. Agrio
3.02.13	Positivo	N. Agrio
4.01.06	Positivo	N. Agrio
4.02.03	Positivo	N. Agrio
4.02.14	Positivo	N. Agrio
4.02.16	Positivo	N. Agrio
4.03.14	Positivo	N. Agrio
4.04.06	Positivo	N. Agrio
4.04.10	Positivo	N. Agrio
4.05.05	Positivo	N. Agrio

Cuadro 7. (Continuación).

Código del árbol	Resultado (Positivo)	Patrón
4.05.12	Positivo	N. Agrio
4.06.05	Positivo	N. Agrio.
4.10.01	Positivo	N. Agrio
4.11.01	Positivo	Citradarin
4.11.03	Positivo	Smiki Mandarin
4.11.10	Positivo	M. Cleopatra
5.01.08	Positivo	Semilla
5.02.04	Positivo	Semilla
5.02.07	Positivo	Semilla
5.13.04	Positivo	Semilla
6.03.03	Positivo	Semilla
6.03.05	Positivo	Semilla
6.07.03	Positivo	Semilla
6.11.02	Positivo	Semilla
6.11.22	Positivo	Semilla

Cuadro 11. Especies de árboles muestreados por bloque en el método de Yodo.

Especie	NUMERO DE ARBOLES POSITIVOS MUESTREADOS					
	B L O Q U E S					
	I	II	III	IV	V	VI
Naranja	1/3	5/14	2/4	7/22	2/8	5/6
Limón	1/1	0/0	0/0	0/5	0/1	0/0
Mandarina	1/1	0/0	0/2	6/9	1/9	0/0
Grape Fruit	0/0	0/0	1/2	1/5	0/1	0/0
Tangelo	0/0	0/2	0/0	0/1	0/0	0/0
Kunquat	2/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Lima	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0
Cidra	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0

Al comentar sobre los resultados de ELISA se puede decir que es un método seguro por ser una prueba serológica, ya que el Dr. Timmer reporta la incidencia de C.T.V. en Bolivia por medio de esta prueba. El Cuadro 8 nos muestra también la incidencia porcentual y numérica de tristeza, para las diferentes especies, en Naranja 35,7%, Limón 12,5%, Mandarina 38,1%, Grape Fruit 37,5%, Kunquat 50% y para Tangelo, Lima y Cidra no hay porcentaje ya que los árboles muestreados no resultaron positivos a C.T.V. ninguno de ellos, en cuanto a patrones susceptibles en el método de ELISA el Cuadro 6 indica que sobre Naranjo Agrio hay 60,60% sobre Mandarina Cleopatra 15,16%, de semilla 15,15% y 3,03% sobre Citrandarin, Red Ling Mung y Misri Batabi, al igual que en Yodo, el Cuadro 10 indica que el bloque IV es el que mayor número de muestras positivas presenta, siempre por tener mayor número de árboles, variedades y área.

Cuadro 6. Resultados de las muestras enviadas de El Salvador (CENTA), para la detección de tristeza, por el Método de ELISA en Citrus Research and Education Center, IFAS, U.S.A. Florida.

Código de la Muestra	Resultados	Patrón
1.02.01	0.0505	M. Cleopatra
1.03.05	0.0560	M. Cleopatra
1.04.05	0.0505	M. Cleopatra
2.05.11	0.0415*	M. Cleopatra
2.06.08	0.0605	N. Agrio
2.07.08	0.0275*	M. Cleopatra
2.08.07	0.0350*	N. Agrio
3.01.02	0.0880	N. Agrio
3.01.06	0.0570	N. Agrio
3.02.13	0.0715	M. Cleopatra
3.05.06	0.1970	N. Agrio
4.01.06	0.0465*	N. Agrio
4.02.03	0.0540	N. Agrio
4.02.14	0.0715	N. Agrio
4.02.16	0.0270*	N. Agrio
4.03.14	0.2000	N. Agrio
4.04.02	0.1030	N. Agrio
4.04.06	0.0965	N. Agrio
4.04.10	0.1195	N. Agrio
4.05.05	0.1405	N. Agrio
4.05.12	0.0540	N. Agrio

Cuadro 6. (Continuación).

Código de la Muestra	Resultados	Patrón
4.06.05	0.0690	N. Agrio
4.09.05	0.0290*	N. Agrio
4.10.01	0.0315*	N. Agrio
4.10.08	0.0610	N. Agrio
4.10.10	0.0960	N. Agrio
4.11.05	0.1155	N. Agrio
4.11.10	0.0520	M. Cleopatra
5.01.08	0.0495*	Semilla
5.02.04	0.0615	Semilla
5.13.04	0.1050	Semilla
5.14.05	0.0465*	Semilla
6.07.02	0.1420	Semilla

* Valores comprendidos entre 0.02 y 0.05 son de dudosa positividad.

Cuadro 10. Especies de árboles muestreados por bloque en el método de ELISA.

Especie	NUMERO DE ARBOLES POSITIVOS MUESTREADOS					
	I	II	B L O III	Q U E IV	V	VI
Naranja	1/3	4/14	2/4	9/22	3/8	1/6
Limón	0/1	0/0	0/0	1/5	0/1	0/0
Mandarina	1/1	0/0	0/2	1/5	0/1	0/0
Grape Fruit	0/0	0/0	2/2	1/5	0/1	0/0
Tangelo	0/0	0/2	0/0	0/1	0/0	0/0
Kunquat	1/2	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Lima	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0
Cidra	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0

La sintomatología de los árboles muestreados en el Banco de Germoplasma fueron: declinamiento, exceso de rebrotes nuevos, amarillamiento en las hojas, orificios pequeños debajo de la unión con la yema, algunos frutos pequeños, defoliación, muerte regresiva, disminución del vigor y muerte de árboles. Esto concuerda con los resultados por el método de ELISA y al mismo tiempo coincide con algunos de los síntomas citados por Agrios, Sarasola y Rebour.

La vida útil de los cítricos depende de la variedad, del patrón utilizado, condiciones ambientales y tipos de manejo que se les proporciona, la cual podría oscilar desde 40 hasta 60 años, la colección de germoplasma de cítricos del CENTA muestra una declinación un tanto generalizada debido a su edad (30-39 años) y el manejo deficiente provocado en los últimos años por la falta de recursos que han impedido su normal mantenimiento, lo cual se estima que ha causado una alteración fisiológica de las plantas y ha permitido una mayor proliferación de enfermedades y plagas, sobre todo áfidos (Aphis gossypii y Toxoptera auranti), que junto con la presencia del C.T.V. han provocado a la fecha el colapso de las variedades o combinaciones más susceptibles.

Estos vectores son los mismos reportados por Florida y nos da una pauta para decir que son los posibles vectores del C.T.V. en nuestro país.

6. CONCLUSIONES

1. En el Banco de Germoplasma del CENTA se ha detectado la presencia del virus de la tristeza.
2. Se concluye que matemáticamente las dos metodologías para determinar la presencia del virus son confiables. Sin embargo, en la práctica el método de yodo presenta inconveniente, ya que la coloración es subjetiva.
3. Los patrones susceptibles en el Banco de Germoplasma son Naranja Agrio y Mandarina Cleopatra.
4. Los posibles vectores presentes en el jardín de variedades en estudio fueron Aphis gossypii y Toxoptera auranti.
5. La sintomatología de C.T.V. observada en el Banco de Germoplasma de CENTA coincide con la reportada en otros países y con los resultados de ELISA y en alguna medida con el método de Yodo.

7. RECOMENDACIONES

1. Renovar totalmente el Banco de Germoplasma de cítricos de CENTA, en vista de que se determinó la presencia del virus de la tristeza.
2. Que el Ministerio de Agricultura y Ganadería a través de organismos competentes debe legislar y supervisar la propagación de frutales, principalmente de cítricos a nivel gubernamental y privado.
3. Hacer un censo de los huertos de cítricos y muestrearlos por el Método de ELISA.
4. Continuar con investigaciones del virus de tristeza, tales como los vectores y lo relacionado con variedades y patrones.
5. Inducir al país y fomentar la utilización de patrones tolerantes o resistentes a plagas y enfermedades, especialmente al virus de la tristeza.

BIBLIOGRAFIA

1. AGRIOS, G.N. 1988. Specific crop caused by vireuses plant pathology. *Academi espres* 3:689-692.
2. ALMANAQUE SALVADOREÑO. 1987. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Centro de Recursos Naturales. Servicio de Meteorología e Hidrología. p. 51, 83, 88.
3. ANUARIO DE Estadística Agropecuaria. 1988. Dirección General de Economía Agropecuaria, MAG. Enero-Junio. 1988.
4. ARAUJO, C.M. y VASCONCELLOS, H.O. 1966. Um sintoma nao descrito de tristeza en limos ácidos. *Agronomia. Brasil.* 24:41-44.
5. BAR-JOSEPH, M.; GARSEY, S.M.; GONSALVES, D. 1979. The use of enzyme linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopatology* 69(2):190-194.
6. BAR-JOSEPH, M.; MOSCOVITZ, M.; SHARAFI, Y. 1979. Re use of coated - enzyme linked immunosorbent assay plates. *Phytopatology* 69(4): 424-426.
7. BAWDEN, F.C. 1964. *Plant viruses and virus diseases.* 4th ed. Ronald Press. p. 158-159.
8. BAZAN DE SEGURA, C. 1952. La tristeza de los cítricos en el Perú, Lima. Estación Experimental Agrícola La Molina. Informe no. 77. 14 p.
9. BAZAN DE SEGURA, C. 1953. La tristeza; temible enfermedad de los cítricos. *La Hacienda* 48(8):50.

10. BELTRAN, J.; CONEJERO, V. 1976. Actividades e Isoenzimas de peroxidasa y Ribonucleasa en combinaciones resistentes sensibles de naranja afectadas de tristeza. Revista Agronómica y Tecnología de alimentos. 16(2):208.
11. BITANCOURT, A. 1967. Tristeza dos citrus. Biológico (Brasil) 33(12): 271-273.
12. BONDEL, L. 1967. Quelques aspects generaux du remplacement du bigaradiu et de Lutilisation de porte greffe nouveaux. fruits 22(1):19-26.
13. BRIDGES, G.D.; YOUTSEY, C.O. 1972. Natural tristeza infection of citrus species relatives and hybrids at one Florida location from 1961-1971. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 85:44-47.
14. CALZA, R. 1968. Efeito de alguns novos insecticidas no combate ao Pulgao Preto. dos citurs. Biológico (Brasil) 34(12):262-264.
15. Características de portainjertos tolerantes al virus de la tristeza. 1979. Noticias Agrícolas (Venezuela) 8(27):105-107.
16. CARRERA, J.M. 1971. Virosis de los agrios. Madrid, España. Cap. IV. p. 75-102.
17. CLARK, M.F.; ADAMS, J.M. Thresh and R. CASPER. 1976. The detection of plum pox and other viruses no woody plants by enzyme linked. Immunosorbent assay (ELISA). Acta Hortícola. 67:51-57.
18. CLARK, M.F.; A.M. ADAMS. 1977. Characteristics of the microplato method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses J. Gem. Virol 34:475-483.
19. CELINO, C.S.; PANALIGAN, D.R.; MOLINO, U.V. 1966. Studies of insect trsmission the tristeza virus in the Philippines. Philippine Journal of Plant Industry 31 (2): 89-93.

20. CUNAT, P.; GARRD, R.; MONCHOLI, V. 1979. Razas del virus causante de la tristeza de los cítricos en España. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 19(3):339.
21. ELSAID, H.M.; SINCLAIR, J.B. 1965. Use of stains and pathological histology to detect virus infection in citrus. *Phytopathology* 55(5):543-545.
22. FUNDACION SERVICIO para el agricultor, CAGUA. 1978. La tristeza de los cítricos. *Noticias Agrícolas (Venezuela)* 8(18): 70-71.
23. GARCIA ALVAREZ, M. 1982. *Patología vegetal práctica*. Edit. Limusa, México. p. 63.
24. GARNSEY, S.M.; YOUNG, R.H. 1975. Water flow rates and starch reserves in citrus roots from thees affected by blight and Tristeza. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 88:79-84.
25. GARSEY, S.M.; JACKSON, J.L. 1975. A destructive out break of tristeza in central Florida. *Proceeding of the Florida State Horticultural Society* 88:65-69.
26. GONZALEZ, L.C. 1981. *Introducción a la fitopatología*. Instituto para la agricultura. San José, Costa Rica. p. 48-56.
27. HERRERA, J.J.; LEE, R.F.; TIMMER, L.W.; ANDREWS, K.L. 1985. Determinación de la existencia y distribución del virus de la tristeza de los cítricos en Honduras. *In XXXI Reunión Anual del Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios*, San Pedro Sula, Honduras.
28. KNORR, L.C.; MALAGUTI, G.; SERPA, D. 1960. Descubrimiento de la tristeza de los cítricos en Venezuela. *Agronomía Tropical (Venezuela)* 10(1):3-12.

29. KNORR, L.C.; MOIN SHAH, S. 1971. Problemas mundiales de los cítricos. V. Nepal. Boletín Fitosanitario de la FAO 19(4):79.
30. McCLEAN, A.P.D. 1956. La tristeza y el Stom Pitting de los cítricos en Africa del Sur. Boletín Fitosanitario de la FAO 4(6):89-95.
31. MENECHINI, M. 1946. Sobre a natureza e transmissibilidade da doenea tristeza dos citrus. Biologico (Brasil) 12(12):287.
32. MOJICA, B.M. 1968. Enfermedades de los cítricos. Agricultura Tropical (Colombia) 24(2):117-121.
33. MONTENEGRO, H. 1971. Curso avanzado de citricultura. 22-27 de noviembre. Publicación del Banco Hipotecario de El Salvador. P. 30-35.
34. MOREIRA, C.S.; COSTA, A.S.; GRANT, T.J. 1954. Métodos para identificación e controle da tristeza dos citros. Bragantia (Brasil) 13(19): 223-236.
35. MORIN, C. 1980. Tristeza. In Cultivo de cítricos. 2 ed. Lima, IICA. p. 588-590.
36. NOUR-ELDIN, F.; BISHAY, F. 1958. Presencia del virus de la tristeza en Egipto. Boletín Fitosanitario FAO 6(10):158-159.
37. PAPASOLOMENTOS, A.; ECONOMIDES, C.V. 1968. La presencia del virus de la tristeza en algunas especies de agrios en Chipre. Boletín Fitosanitario de la FAO. 16(1):8-9.
38. PLANES, G.S. 1970. Diez temas sobre agrios. Ministerio de Agricultura. Madrid. p. 143-150.
39. PRATT, R.M. 1983. Guía de Florida sobre insectos, enfermedades y trastornos de la nutrición en los frutos cítricos. Edit. Limusa, México. p. 84-86.

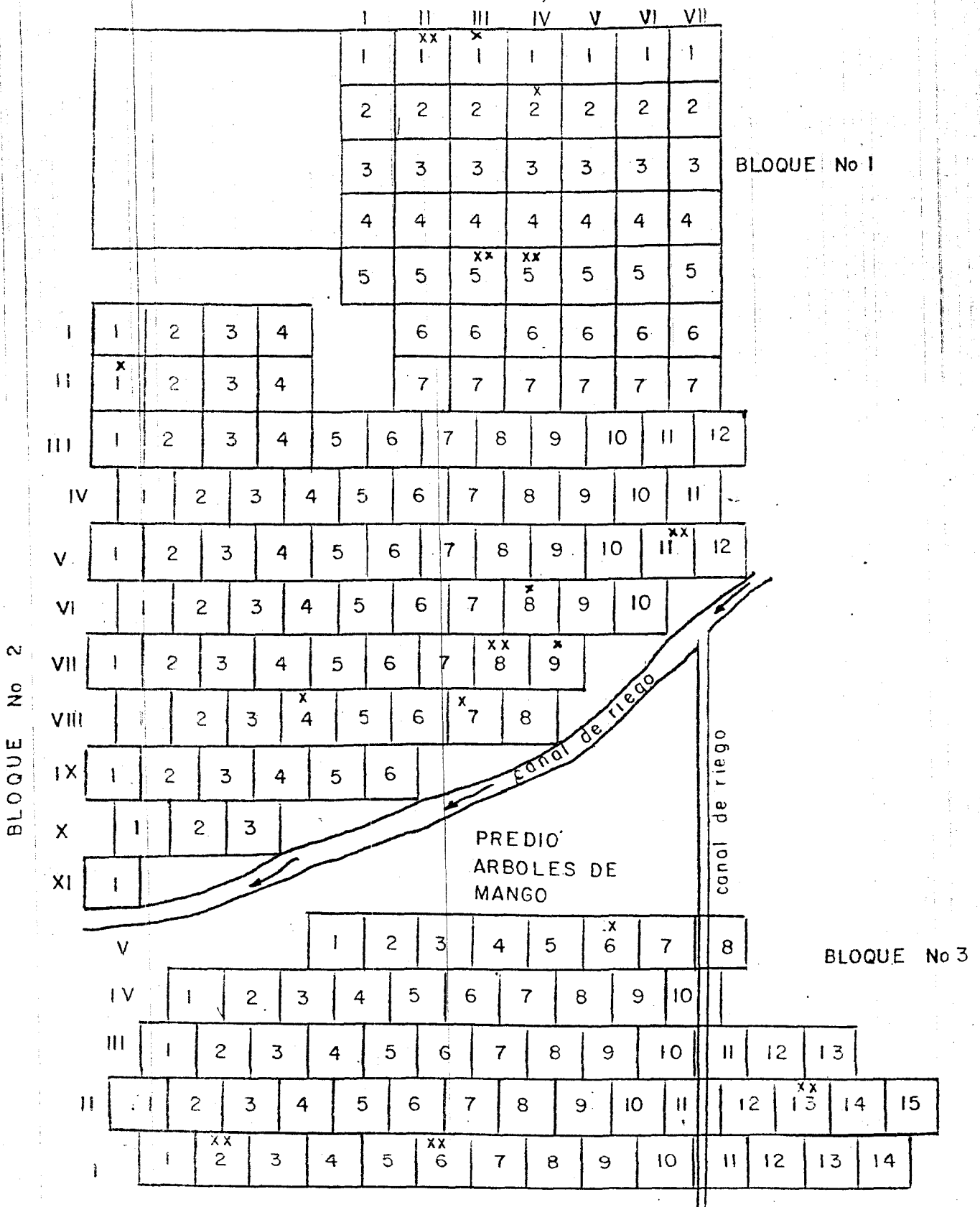
40. QUEZADA, J.R. 1974. Principales especies de insectos asociados a los cultivos de cítricos en El Salvador. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Santa Tecla, El Salvador. p. 34-35.
41. REBOUR, H. 1969. Tristeza o degeneración infecciosa de los cítricos. In. Los agrios. Manual práctico de citricultura. 2 ed. rev. y ampl. Madrid, Mundi-Prensa. p. 259-261.
42. RIOS, C.D.; GIACOMETTI, D.C. 1965. La tristeza de los cítricos en Colombia. Agricultura Tropical (Colombia) 21(3):161-165.
43. ROHM and HAAS. 1959. Compendium of plants diseases. Philadelphia. p. 140.
44. ROISTACHER, C.N., BAR-JOSEP, M.; GUMPF, D.J. 1984. Transmission of tristeza and seedling yellows tristeza. Virus by small populations of Aphis gossypii. Plant disease 68:494-496.
45. SANCHES DE BUSTAMANTE, C.A. 1975. Tristeza o podredumbre de las raicillas. In Sarasola, A. Fitopatología. Curso Moderno Buenos Aires. Hemisferio Sur. Vol. 3. p. 180-187.
46. SARASOLA, A.A.; ROCA DE SARASOLA, M.A. 1975. Fisiogénicas prácticas en fitopatología. Tomo IV. Buenos Aires. ed. Hemisferio Sur.
47. SARASOLA, A.A. 1975. Fitopatología. Curso moderno Tomo III. Bacteriosis Virosis. Buenos Aires. Ed. Hemisferio Sur. 180-189.
48. TIMER, L.W.; SCORZA, R.; LEE, R.F. 1981. Incidence of tristeza and other citrus diseases in Bolivia. Plant Disease 65:515-517.
49. VIROSIS DE los cítricos. 1979. Noticias Agrícolas. (Venezuela) 8(32): 125-128.

50. WALLACE, J.M. 1956. La tristeza de los cítricos con referencia especial a su situación en los Estados Unidos. Boletín fitosanitario de la FAO. 4(6):77-78.
51. WEATHERS, L.G.; SANCHES, A.L.; PLATT, R.G. 1969. Naturaleza y distribución de las enfermedades virosas de cítricos en Chile. Agricultura Técnica. (Chile) 24(4):166-167.

A N E X O S

PLANO DE CAMPOS

Carretera a Sta. Ana

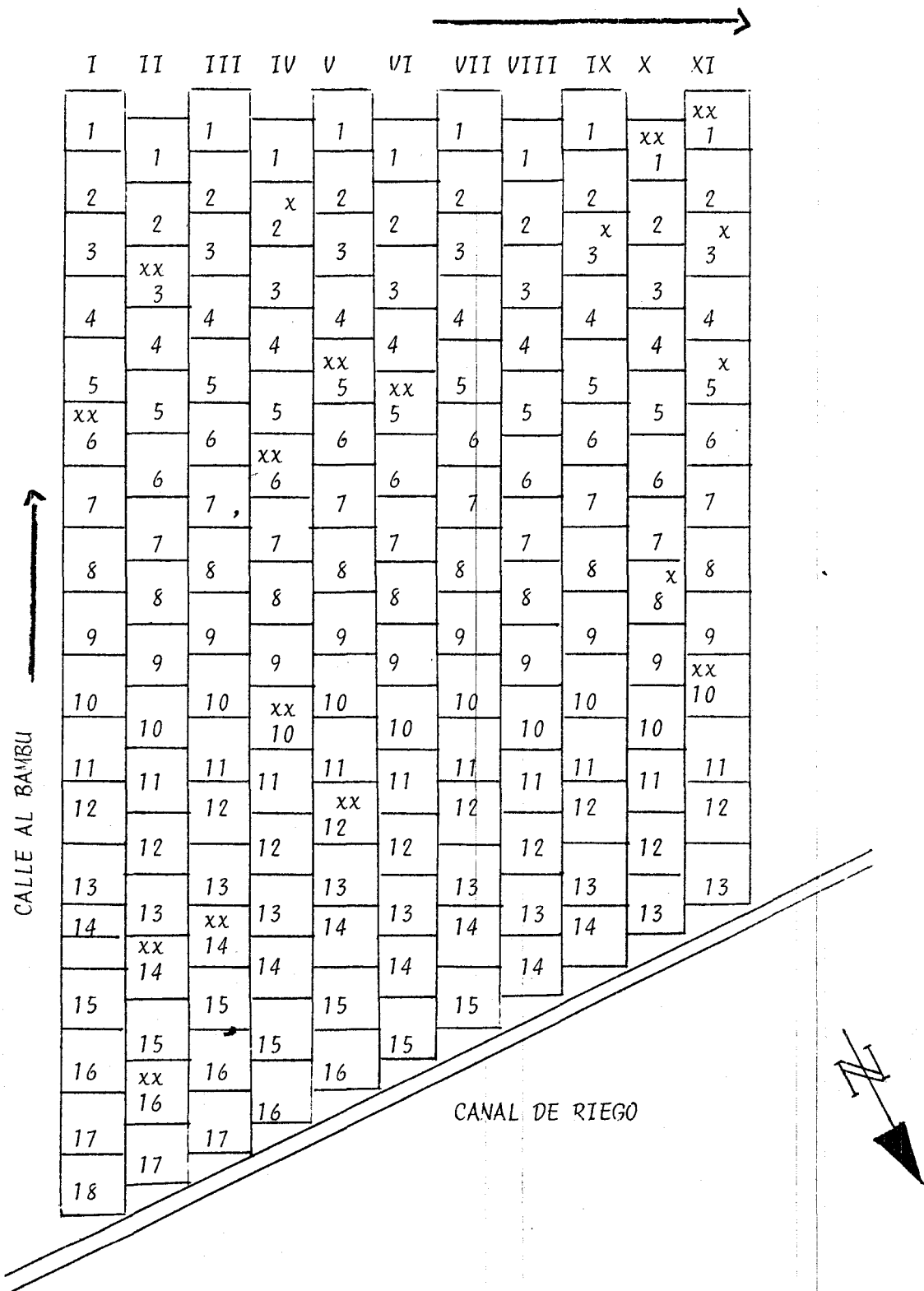


xx POSITIVAS LAS DOS PRUEBAS

PLANO DE CAMPO

BLOQUE # 4

CALLE A FRUTALES



xx Positivas las dos pruebas.

PLANO DE CAMPO
 BLOQUE # 5
 CALLE A FRUTALES



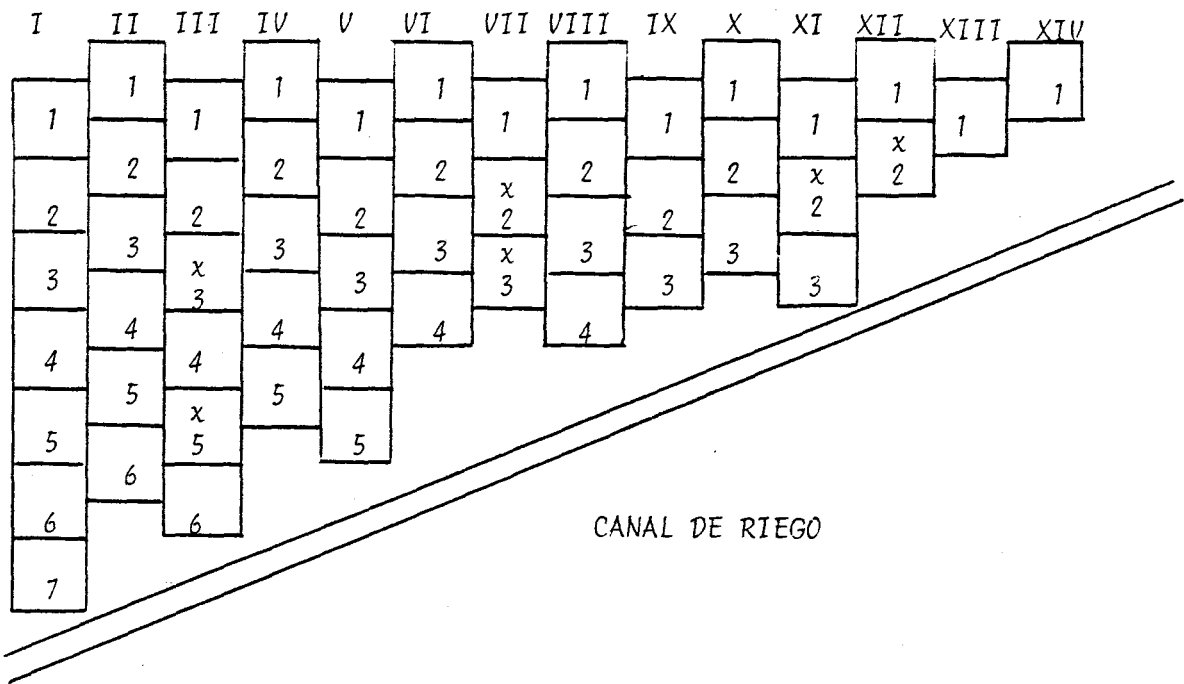
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
4	xx 4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3 xx 4	4
5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	x 5
6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	x 7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
xx 8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

xx Positivas las dos pruebas.

PLANO DE CAMPO

BLOQUE # 6

CALLE A FRUTALES



x Positivas las dos pruebas.