

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades  
Departamento de Ciencias Agrícolas

Metodología para la implementación del primer  
invernadero multiplicador y comercial de cítricos  
certificado; libre de virus (Tristeza, Psorosis,  
leprosis y woody gall), viroides (exocortis y  
cachexia-xyloporosis) y bacterias fastidiosas  
(*Xylella fastidiosa*) de importancia económica en  
Guatemala

Trabajo de investigación presentado por Irwin Ronaldo  
Donis González para optar al grado de Ingeniero  
Agrónomo

Guatemala  
2005



Metodología para la implementación del primer invernadero multiplicador y comercial de cítricos certificado; libre de virus (Tristeza, Psorosis, leprosis y woody gall), viroides (exocortis y cachexia-xyloporosis) y bacterias fastidiosas (*Xylella fastidiosa*) de importancia económica en Guatemala

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades  
Departamento de Ciencias Agrícolas

Metodología para la implementación del primer  
invernadero multiplicador y comercial de cítricos  
certificado; libre de virus (Tristeza, Psorosis,  
leprosis y woody gall), viroides (exocortis y  
cachexia-xyloporosis) y bacterias fastidiosas  
(*Xylella fastidiosa*) de importancia económica en  
Guatemala

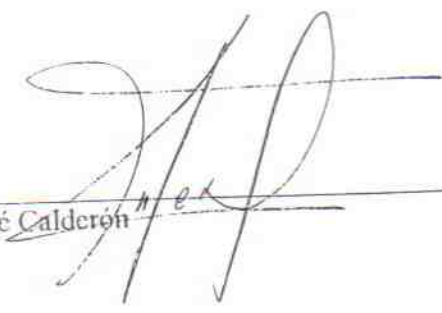
Trabajo de investigación presentado por Irwin Ronaldo  
Donis González para optar al grado de Ingeniero  
Agrónomo

Guatemala  
2005

Vo.Bo.:

(f)

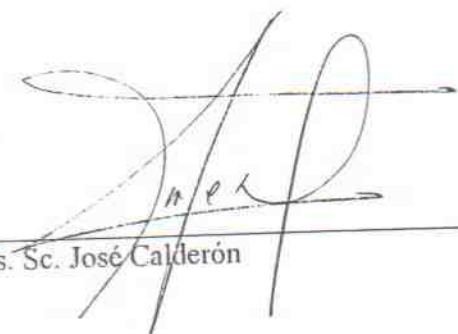
Ms. Sc. José Calderón  
Asesor



Tribunal:

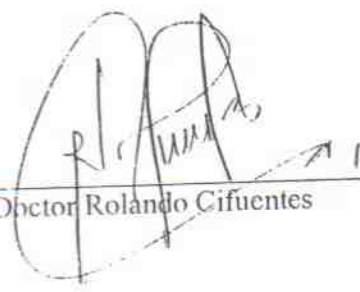
(f)

Ms. Sc. José Calderón



(f)

Doctor Rolando Cifuentes



(f)

Licenciada Margarita Palmieri



Fecha de aprobación 31 de Enero del 2005

## **DEDICATORIA**

A Dios y a la Virgencita, quienes me dieron la vida para cumplir con el trabajo y mis estudios, ellos me proporcionaron de un gran entusiasmo y fuerza a seguir adelante

A mis padres Ronaldo Donis y Ana Luisa de Donis, quienes le debo todo lo que soy y todo lo que he logrado en esta vida, sin ellos no habría podido llegar hasta aquí

A mis hermanos Ana Melisa Donis y Erick Donis, quienes siempre me entusiasmaron ha dar lo mejor de mi y a seguir adelante

## AGRADECIMIENTO

A la Licda. Margarita Palmieri, por su gran asesoría, su apoyo y por la oportunidad que me ha dado de trabajar en el Departamento de Protección Vegetal de la UVG. De la misma manera al Ms. Sc. José Calderón y al Dr. Rolando Cifuentes, por su enseñanza, gran ayuda y asesoría, lo cual me ayudo a finalizar con el texto.

A Fredy Mejía mi buen amigo, que siempre estuvo a la par mía trabajando con muchas ganas, ofreciendo y aportando sus conocimientos y consejos muy valiosos para fortalecer cada vez más el documento y mi experiencia.

A todo los trabajadores del National Clonal Germoplasm Repository for citrus and dates. Universidad de Riverside, California, U.S.A, en especial al encargado de la institución el Ph.D Richard Lee, por su valiosa colaboración con el proyecto, por compartir sus conocimientos y experiencias y por facilitar una gran cantidad de material que se utilizó en este trabajo. A la vez, todos ellos facilitaron y amenizaron la capacitación realizada en esta institución.

A la Gremial de Exportadores y AID, que confiaron en mí y me proporcionaron los fondos para recibir la capacitación, compra de materiales y equipo; a la vez que incentivaron la realización de un proyecto.

A todos los trabajadores de la Agropecuaria Popayán S.A., en especial al Ingeniero Francisco Viteri, Ingeniero Héctor Rammazzini y Walter Girón, que siempre estaban anuentes a colaborar con el proyecto, proporcionando datos sumamente y su valioso conocimiento.

A todas las personas, profesores, amigos, compañeros de estudio y trabajadores del a Universidad del Valle de Guatemala, que de alguna manera hicieron posible este trabajo. Con los cuales compartí muchas experiencias, amistad y siempre estuvieron para darme apoyo.

## PREFACIO

En Septiembre del año 2003, se inicia el proyecto para crear un invernadero certificado libre de enfermedades en Guatemala, como resultado de la inexistencia del mismo, así como la ausencia de una metodología local para desarrollarlo. A partir de esta fecha, el Ingeniero Francisco Viteri, propietario de la Agropecuaria Popayán, manifiesta su interés en apoyar la creación de este tipo de estructura, para proveer a los agricultores nacionales de material vegetal de cítricos libre de enfermedades. Así mismo, se tenía como objetivo final el evitar las pérdidas económicas causadas por las mismas.

Se efectúan una serie de reuniones, en conjunto con el Ingeniero Viteri, agricultores e investigadores de La Universidad del Valle de Guatemala (Licda. Margarita Palmieri y Lic. Fredy Mejía), para la elaboración del proyecto. A principios del año 2004 se finalizó de estructurar el protocolo. Durante el mes de Marzo del mismo año se postulo a la convocatoria AGEXPRONT-AID, para obtener fondos para su ejecución, los cuales fueron autorizados en junio. En consecuencia, durante el periodo del 7 al 26 de julio se realizó un viaje de capacitación al «National Clonal Germoplasm Repository for citrus and dates». Riverside, California, U.S.A. Durante esta época el Doctor Richard Lee, encargado de esta entidad, dio sus comentarios sobre el protocolo y se realizaron las modificaciones y correcciones recomendadas para su adecuada elaboración. En la capacitación se trataron los siguientes temas:

- Mantenimiento y cuidados de invernaderos certificados de cítricos libres de enfermedades.
- Manejo de invernaderos, lo cual incluye el cuidado de plantas, medios utilizados, fertilización, riego, etc.
- Métodos de indexación biológica y observación de síntomas en cítricos para enfermedades virales y viroidales.
- Métodos curativos de termoterapia y micro-injertación en cítricos.
- Procedimientos de ELISA (Por sus siglas en inglés Enzyme Linked Immuno Sorbent Asssay) para el diagnóstico de enfermedades virales, en el laboratorio.

Desafortunadamente, a finales del mes de agosto se informó de un recorte del presupuesto de más de un 50%, por lo que no se pudo finalizar la infraestructura del invernadero, ya que los fondos iban a cubrir el diagnóstico serológico y biológico de enfermedades; las cuales asegurarían la sanidad de las plantas ubicadas dentro del invernadero certificado. Esto originó que se desarrollara este documento, el cual además de contener la metodología de certificación, pruebas de diagnóstico y descripción de la estructura, define las bases teóricas y el estudio de factibilidad para la elaboración del mismo. De la misma manera, con la asesoría de la Licda. Margarita Palmieri, Ms. Sc. José Calderón y el Lic. Fredy Mejía se desarrollaron los parámetros adecuados para desarrollar un invernadero de ese tipo en Guatemala.

Con este documento, la empresa Popoyán estudiará la posibilidad de elaborar el proyecto durante el año 2005. El documento también sirve como base para el desarrollo de todo tipo de invernaderos certificados en el país, tanto para plantas cítricas, así como para cualquier otra especie de importancia económica nacional, que se reproduzca en forma vegetativa. Finalmente, puede incentivar a las entidades del Estado a iniciar e implementar un Programa Nacional de certificación.

## RESUMEN

La tristeza, psorosis, leprosis y vein enation (woody gall) son enfermedades virales, la exocortis y la cachexia-xyloporosis son enfermedades viroidales y la *Xylella fastidiosa* es una enfermedad donde el agente causal es una bacteria fastidiosa. En general todas éstas se encuentran dispersas en la mayoría de las áreas citricolas del mundo y se tiene conocimiento que hay presencia de algunas de ellas en Guatemala. El mayor problema de este tipo de enfermedades es que no se pueden controlar en forma química, biológica o cultura, como la mayoría de las enfermedades causadas por hongos bacterias. Las anteriores afectan significativamente el rendimiento de las plantaciones o causan la muerte de ellas.

El proyecto establece la metodología adecuada para realizar el primer invernadero multiplicador en el país, así como su correspondiente estudio de factibilidad. Con lo anterior, se puede asegurar y verificar que los cítricos allí presentes estén libres de los patógenos antes mencionados y poder certificar éste según inspección del Departamento de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Es un proyecto de importancia económica porque se podrá aumentar y mejorar la calidad de la producción y la industria citrícola en Guatemala. Así mismo, este invernadero se utilizará para el suministro de yemas a los productores nacionales, como también permite abrir una ventana de exportación del producto, en especial para el área Centroamericana. Además éste documento pretende servir como una referencia bibliográfica para la creación, manejo y cuidados de otros invernaderos certificados de cítricos u otros frutales tropicales y subtropicales, así como con sus debidas modificaciones puede ayudar a la creación de invernaderos certificados de otro tipo y especies de plantas, según las condiciones climáticas de Guatemala.

# ÍNDICE

DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTO .....	V
PREFACIO .....	VI
RESUMEN.....	VIII
LISTA DE CUADROS:.....	XII
LISTA DE ILUSTRACIONES Y GRÁFICAS:.....	XIII

Capítulos	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
A. GENERALES:.....	3
B. ESPECÍFICOS:.....	3
<b>III. HIPÓTESIS:.....</b>	<b>4</b>
<b>IV. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
A. BOTÁNICA DE PLANTAS CÍTRICAS:.....	4
Clasificación y especies (Infoagro 2003):.....	4
B. SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA CITRÍCOLA EN GUATEMALA .....	4
1. Tamaño del posible segmento de productores de cítricos interesados en adquirir plantas cítricas certificadas:.....	8
C. GENERALIDADES DE LAS ENFERMEDADES Y SU DESCRIPCIÓN:.....	10
1. Virus:.....	10
a. Virus de la tristeza de los cítricos (CTV):.....	10
b. Psorosis:.....	11
c. Leprosis:.....	11
d. Woody gall (En Inglés; Vein enation):.....	12
2. Viroides:.....	12
a. Exocortis:.....	12
b. Cachexia-xyloporosis:.....	13
3. Bacterias fastidiosas:.....	13
a. Clorosis variegada de los cítricos (CVC) <i>Xylella fastidiosa</i> :.....	13
D. DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES .....	16
1. Recolección de muestra y su almacenamiento:.....	16
a. Recomendaciones generales para la recolección y transporte de material vegetal (Frison & Taher 1991):.....	17
2. Metodología de indexación biológica y síntomas a observar en plantas indicadoras:.....	17
3. Controles positivos y negativos:.....	20
4. Tiempo de observación de síntomas y de crecimiento de plantas indicadoras:.....	21
E. CARACTERÍSTICAS Y DISEÑO DEL INVERNADERO MULTIPLICADOR, COMERCIAL Y CERTIFICADOR DE INDEXACIÓN:.....	26
1. Definición de los diferentes tipos de invernaderos:.....	26
a. Invernadero comercial o propagador e invernadero de fundación o multiplicador:.....	26
b. Invernaderos para indexación o pruebas biológicas:.....	27
2. Características de la estructura de los invernaderos:.....	27
a. Sistemas de calefacción:.....	28

b. Sistemas de enfriamiento: .....	28
c. Mesas o camas:.....	28
d. Suelo:.....	28
e. Control de temperatura y humedad:.....	28
f. Luz artificial:.....	29
3. Recomendaciones de manejo y cuidados dentro de los invernaderos:.....	29
4. Muestreo teórico de plantas para la detección de enfermedades en invernadero de fundacion multiplicador e invernadero propagador comercial:.....	29
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
A. ELABORACIÓN DEL DOCUMENTO Y METODOLOGÍA DE CERTIFICACIÓN .....	31
B. METODOLOGÍA DE MUESTREO, METODOLOGÍA DE CERTIFICACIÓN, CARACTERÍSTICAS LOCALES DEL INVERNADERO CERTIFICADO: .....	32
C. DESCRIPCIÓN DE LA EMPRESA, FODA, ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD Y COSTO DEL PROYECTO A MEDIANO PLAZO (7 AÑOS): .....	38
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
A. DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS LOCALES DEL INVERNADERO MULTIPLICADOR CERTIFICADO E INVERNADERO COMERCIAL CERTIFICADO, UBICADO EN LA AGROPECUARIA POPOYÁN: .....	40
1. Bodega de almacenamiento:.....	40
2. Área de doble puerta:.....	41
3. Invernadero certificado:.....	41
4. Invernadero comercial y propagador:.....	41
5. Invernadero de fundación o multiplicador: .....	43
B. METODOLOGÍA PARA LA CERTIFICACIÓN DEL INVERNADERO MULTIPLICADOR Y COMERCIAL LIBRE DE ENFERMEDADES PROPUESTAS: .....	43
1. Porcentaje de muestras a tomar según el invernadero: .....	48
a. Invernadero de fundación o multiplicador: .....	48
b. Invernadero comercial o propagador: .....	48
C. DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS FODA DE LA EMPRESA «AGROPECUARIA POPAYÁN»:.....	55
D. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD PARA LA IMPLEMENTACIÓN DEL PROYECTO: .....	58
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>
<b>X. ANEXO .....</b>	<b>69</b>
A. PRECIO DE PRUEBAS, COSTOS E INGRESOS DEL PROYECTO, NÚMERO DE PLANTAS PRESENTES EN INVERNADERO CERTIFICADO: .....	69
B. METODOLOGÍAS Y PROTOCOLOS PARA DETECCIÓN DE ENFERMEDADES EN LABORATORIO (PRUEBAS SEROLÓGICAS): .....	73
1. Generalidades de las metodologías serológicas para la detección de enfermedades: .....	73
a. ELISA:.....	73
b. PCR:.....	74
2. Protocolos específicos para la detección serológica de enfermedades según datos recopilados en laboratorio de virología, Universidad del Valle de Guatemala: .....	77
3. ALTERNATIVAS PARA LA ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS EN PLANTAS CÍTRICAS: .....	87
a. Plantas de origen nuclear (Germinación convencional de semillas de variedades poliembriónicas):.....	83
b. Micro injerto:.....	83
c. Termoterapia:.....	89
4. PROGRAMAS DE CERTIFICACIÓN NACIONALES:.....	89
a. Programa de cuarentena:.....	90

b. Programa de saneamiento:.....	90
c. Programa de certificación de material vegetal:.....	90
d. Bancos de germoplasma:.....	91
e. Bloques de fundación:.....	91
f. Vivero multiplicador o propagador:.....	91
g. Vivero comercial:.....	91
5. FUNCIONES DE ALGORITMO EN PROGRAMA R:.....	92

## LISTA DE CUADROS:

Cuadro	Página
Cuadro 1. Formas de control y métodos de detección de las enfermedades .....	14
Cuadro 2. Sintomatología de las enfermedades en condiciones naturales de crecimiento .....	15
Cuadro 3. Tiempo que tardan las plantas para alcanzar un metro, tamaño adecuado para realizar la indexación biológica, Universidad de California Riverside. ....	21
Cuadro 4. Síntomas observados en diferentes especies de plantas indicadoras cítricas, número de plantas a inocular y condiciones de crecimiento para la detección biológica de virus y viroides .....	22
Cuadro 5. Síntomas observados en diferentes especies indicadoras herbáceas, número de plantas a inocular y condiciones de crecimiento para la detección biológica de virus y viroides .....	25
Cuadro 6. Información requerida en etiqueta y/o marchamo .....	27
Cuadro 7. Frecuencia de muestreo y pruebas a realizar según enfermedad, inicia a partir del segundo año .....	30
Cuadro 8. Estimado del número de plantas producidas para la venta al año por el invernadero propagador certificado, ganancia neta por planta e ingresos totales por venta .....	42
Cuadro 9. Pruebas que se deben realizar para confirmar la sanidad de plantas presentes en invernadero multiplicador y comercial certificados. El primer año indica la construcción del invernadero o siembra de plantas. Año 2005 .....	46
Cuadro 10. Flujo de caja del establecimiento y mantenimiento de invernadero certificado. Cifras en quetzales (Q.) y en dólares hasta al año 7. Inflación anual del 10%. Iniciando año 2005 .....	54
Cuadro 11. Resultado de índice para el análisis de factibilidad del proyecto .....	55
Cuadro 12. Precio por prueba en quetzales (Q.) y dólares (\$.). Año 2005 .....	65
Cuadro 13. Costo de pruebas por planta en invernadero de fundación multiplicador (Muestreo del 100% del total de la población). Cifras en quetzales (Q.) y en dólares hasta al año 7. Inflación anual del 10%. Iniciando año 2005. ....	65
Cuadro 14. Costo de pruebas por planta en invernadero comercial propagador (Muestreo del 20% del total de la población, muestras compuestas por 4 plantas, tomadas en forma sistemática). Cifras en quetzales (Q.) y en dólares hasta al año 7. Inflación anual del 10%. Iniciando año 2005. ....	66
Cuadro 15. Costo total de pruebas en invernadero de fundación multiplicador e invernadero propagador comercial (Invernadero certificado), en base a un número estimado de plantas presentes en el mismo (Vid. Cuadro 16). Cifras en quetzales (Q.) y en dólares hasta al año 7. Inflación anual del 10%. Iniciando año 2005. ....	67
Cuadro 16. Número estimado de plantas presentes en los invernaderos certificados y muestras a tomar para su certificación.....	68

## LISTA DE ILUSTRACIONES Y GRÁFICAS:

Ilustración o gráfica	Página
Ilustración 1. Historia de la siembra de cítricos en Guatemala .....	8
Ilustración 2. Mapa de áreas aptas para la siembra de plantas cítricas en Guatemala .....	9
Ilustración 3. Etiqueta de identificación, laboratorio de virología vegetal, departamento de protección vegetal UVG .....	17
Ilustración 4. Descripción de la metodología de indexación biológica en plantas cítricas. Detección de woody-gall (vein enation) injertado sobre limón rugoso (Rouge lemon) .....	18
Ilustración 5. Descripción de la metodología de inoculación mecánica. Síntomas de TMV en <i>Datura stramonium</i> .....	20
Ilustración 6: Síntomas severos de tristeza en lima mexicana. Hojas maduras amarillas, enanismo y flaqueado (cupping) de hojas jóvenes. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California .....	24
Ilustración 7: Síntomas leves de tristeza en lima mexicana. Hojas jóvenes con las nervaduras claras con flaqueadas (cupping). Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California .....	24
Ilustración 8: Síntomas de woody gall-vein ination en naranja agria. Pequeña enación o tumor en envés de hoja. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California .....	24
Ilustración 9: Síntomas de shock de psorosis en Madame vineos. Muerte severa de brote apical. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California .....	24
Ilustración 10: Síntomas de psorosis en Madame vineous. Anillos cloróticos en hojas. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California .....	25
Ilustración 11: Síntomas de exocortis en Mandarina Pearson injertada sobre rough lemon. Enrollamiento hacia adentro en hojas. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California .....	25
Ilustración 12. Descripción del algoritmo de simulación de muestreo al azar .....	34
Ilustración 13. Ejemplo gráfico del algoritmo realizado. Simulación del muestreo al azar (Muestra del 20 %) .....	35
Ilustración 14. Descripción del algoritmo del muestreo sistemático .....	36
Ilustración 15. Ejemplo gráfico del algoritmo realizado. Simulación del muestreo sistemático (Muestra de 1 planta cada 5 plantas. 20%) .....	37
Ilustración 16. Esquema del invernadero certificado .....	40
Ilustración 17. Diagrama de flujo de actividades a realizar para la implementación y confirmación de la sanidad de plantas en invernadero multiplicador y comercial certificado .....	44

Ilustración 18. Cronograma de siembra y número de plantas cítricas y herbáceas a inocular por muestra. Guía para invernadero de indexación biológica .....	45
Gráfica 1. Método simulado de muestreo al azar, tomando una muestra de 10 % de la población .....	47
Gráfica 2. Método simulado de muestreo sistemático, tomando una muestra de 10 % de la población .....	48
Gráfica 3. Método simulado de muestreo al azar, tomando una muestra de 20 % de la población y muestras compuestas de 4 plantas .....	49
Gráfica 4. Método simulado de muestreo sistemático, tomando una muestra de 20 % de la población y muestras compuestas de 4 plantas .....	50
Ilustración 19. Análisis FODA (Fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas) de la “Empresa Popayán”, respecto al desarrollo del invernadero certificado.....	53
Gráfica 5. Flujo de capital al implementar invernadero certificado. Plazo de 7 años.....	55
Ilustración 20: Metodología de ELISA simple .....	70
Ilustración 21: Esquema de la Metodología de PCR .....	72
Ilustración 22. Esquema de electroforesis.....	73
Ilustración 23. Patrón germinado en tubo de ensayo. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.....	84
Ilustración 24. Plantas podadas a las que se le desea sanar por micro injertación. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.....	85
Ilustración 25. Colección de brotes para micro injertación (Ápices). Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.....	85
Ilustración 26. Microinjerto con corte triangular en patrón. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.....	86
Ilustración 27. Crecimiento de injerto en medio líquido. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.....	87
Ilustración 28. Plantas saneadas en invernadero de banco de germoplasma. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.....	87
Ilustración 29. Esquema de microinjertación .....	88
Ilustración 30. Cámara de termoterapia con iluminación artificial. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.....	89

# I. INTRODUCCIÓN

Un invernadero certificado como el que se presenta en este trabajo es de importancia debido a que es sostenible a largo plazo para el cultivo de cítricos y otros cultivos que se propagan principalmente en forma vegetativa. Esta certificación asegura la distribución y siembra de plantas cítricas libre de las enfermedades de mayor interés epidemiológico e impacto en el país. Así mismo, es un importante inicio para el desarrollo de un programa de certificación, en el cual ya se incluye un plan nacional donde se integran instituciones gubernamentales y privadas para producir y distribuir material libre de enfermedades, a la vez se protege a los cultivos locales al evitar la entrada de material vegetal infectado. Todo lo anterior se puede lograr por medio de cuarentenas, controles y metodologías para eliminación de virus y distribución de material vegetal de calidad y sanidad.

Un invernadero multiplicador de cítricos certificado libre de virus, viroides y de la bacteria fastidiosa de mayor importancia en este cultivo es necesario para impulsar la citricultura en Guatemala. Las yemas producidas en un invernadero certificado como libre de patógenos importantes beneficiarán a los productores nacionales y al mismo tiempo permitirán abrir una ventana de exportación, en especial hacia Centroamérica dentro de los tratados de libre comercio con México, Estados Unidos, Republica Dominicana y Chile. De esta manera, un invernadero de cítricos certificados beneficiará al sector citrícola de Guatemala abriendo oportunidades comerciales al mejorar la calidad de los cítricos producidos en el país, creando fuentes de empleo y reduciendo las pérdidas causadas por este tipo de patógenos.

El proyecto propuesto es pionero en su rama ya que no hay ninguna estructura de este tipo en Guatemala y tampoco en Centroamérica. Según el Dr. Lee, R.F. (1998), los programas de certificación deben ser obligatorios en todas las áreas donde se tienen cultivos cítricos y, cada país se debe acomodar a sus condiciones locales, para que en conjunto, se logre evitar eficientemente la diseminación de la enfermedad (*Lee 1998; Unidad de Normas y Regulaciones –UNR- 1999*).

La mayoría de las enfermedades causadas por bacterias y hongos puede ser manejada con un manejo cultural apropiado y con métodos químicos o biológicos. A diferencia de lo anterior, las enfermedades producidas por virus, viroides y bacterias fastidiosas, que son factores limitantes en la producción. Únicamente métodos preventivos y de manejo son aptos para evitar la infestación con los mismos. Entre estos métodos se encuentran la siembra de variedades resistentes y de mayor impacto la siembra de material vegetal libre de enfermedades, lo cual está cien por ciento ligado al establecimiento de invernaderos multiplicadores certificados, libres de cualquier enfermedad (*Lee et al. 1998*). Lo anterior, responde al cuestionamiento de productores del por qué hay que desarrollar y construir invernaderos certificados e incentivar programas de certificación Nacional. En la mayoría de casos se creó que las enfermedades se pueden manejar únicamente sembrando patrones o variedades resistentes o tolerantes. En el caso de los cítricos, esta situación no se cumple y es una de las razones primordiales de por qué se deben establecer estos invernaderos y los programas de certificación. Hasta el día de hoy se puede afirmar que aun no se ha encontrado ningún patrón resistente o tolerante a todas las enfermedades virales y viroidales presentes en los mismos (Lee 2004). A continuación se encuentran una serie de ejemplos donde lo anterior se cumple.

- La tristeza de los cítricos (CTV) no presenta síntomas en plantas de mandarinas o cultivos con patrón trifoliado. Sin embargo, cuando estas plantas infectadas se siembran cerca de plantaciones sobre patrón de naranja agria, naranja dulce o toronja altamente susceptibles y, hay presencia de áfidos transmisores de la enfermedad, causa efectos devastadores y altas pérdidas.
- El viroide Cachexia, la cual no induce síntomas en naranjas y toronjas, puede tener efectos devastadores en mandarinas y limones.
- Woody Gall, la cual es transmitida por áfidos y no induce síntomas en plantas maduras.
- Psorosis puede empezar a presentar síntomas evidentes de descascaramiento del tronco, después de que la planta tiene de 7 a 15 años de edad.
- Exocortis y la mayoría de los viroides puede no presentar síntomas en la mayoría de las naranjas dulces, mandarinas y toronjas; mientras que en las plantas sembradas sobre patrones trifoliados, Rangpur y limón dulce produce síntomas y debilitamiento extremo de las plantas (Roistacher 1998).

Lo anterior deja como la única opción viable para asegurar el crecimiento de plantaciones sanas, es la introducción de material vegetal sano para manejar estas enfermedades.

## II. OBJETIVOS

### A. Generales:

1. Elaborar el procedimiento para el desarrollo del primer invernadero multiplicador de cítricos certificado libre de virus, viroides y bacteria fastidiosa de importancia económica en Guatemala.

### B. Específicos:

1. Determinar la fuente más adecuada de adquisición de yemas para injerto y semillas, libres de virus, viroides y bacterias fastidiosas para la implementación del jardín multiplicador certificado.
2. Determinar la factibilidad del proyecto a mediano plazo (7 años), realizando un análisis de costo/beneficio.
3. Adaptar el invernadero certificado a las condiciones locales de Guatemala, según proyectos visitados en el extranjero y requisitos especificadas por La Unidad de Normas y Regulaciones (UNE) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGA).
4. Establecer las bases de manejo y estructura del invernadero certificado libre de enfermedades.1. Elaborar el procedimiento para el desarrollo del primer invernadero multiplicador de cítricos certificado libre de virus, viroides y bacteria fastidiosa de importancia económica en Guatemala.
5. Establecer las bases metodológicas y técnicas de muestreo para la determinación de la presencia/ausencia de los virus: Tristeza, psorosis, leprosis y woody gall; viroides: exocortis y cachexia; bacteria fastidiosa *Xylella fastidiosa*, en las plantas de un invernadero certificado.

### III. HIPÓTESIS:

El desarrollo y utilización de metodologías adecuadas permitirán que las plantas del invernadero certificado esté libre de virus (Tristeza, Psorosis, Leprosis y woody-gall), viroides (exocortis y cachexia-xyloporosis) y bacteria fastidiosa (*Xylella fastidiosa*) de importancia económica en Guatemala. En respuesta a lo anterior; al final del proyecto de tesis no se podrá aceptar o rechazar ninguna hipótesis, ya que el lapso para determinar la presencia o ausencia de enfermedades después de la implementación del proyecto es de dos a tres años. A pesar de ello en el siguiente párrafo, se propone una hipótesis, para poder ser analizada por la empresa y la entidad certificadora. Se podrá aceptar o rechazar la misma al comparar el comportamiento del invernadero certificado con otros invernaderos no certificados, ubicados en la misma Finca Popayán.

- Desarrollar el procedimiento para desarrollar un invernadero multiplicador de cítricos certificado, libre de virus, viroides y bacterias fastidiosas de importancia nacional, el cual será económicamente rentable y mejorara la calidad y la sostenibilidad de los sistemas de producción de cítricos, en comparación con la metodología tradicional de multiplicación.

## IV. ANTECEDENTES

### A. Botánica de plantas cítricas

Los cítricos se originaron hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones debidas a la selección natural y a hibridaciones tanto naturales como producidas por el hombre. Mutaciones espontáneas han dado origen a numerosas variedades que actualmente conocemos.

- Clasificación y especies (Infoagro 2003):
- Familia: Rutaceae.
- Género: Citrus.
- Especies: Naranja dulce (*Citrus sinensis*), limón o limonero (*Citrus limon*), mandarina (*Citrus reticulata*) (*C. Unshiu*), (*C. reshni*) clementinas, satsumas y comunes. Toronja (*Citrus pardisi*), lima ácida (*Citrus aurantifolia*), naranjo agrio (*Citrus aurantium*), citranges carrizo (*Citrangle carrizo*), troyer (*Citrangle troyer*), pomelo swingle (*Citrumelo swingle*), taiwanica (*Citrus taiwanica*), naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*), limón rugoso (*Citrus jambhiri*), lima Rangpur (*C. limonia*), entre otros (Reyes & Margarita, 1997).
- Altura: Reducido (6-10 m). Ramas poco vigorosas (casi tocan el suelo). Tronco corto.
- Hojas: Limbo grande, relativamente pequeñas, con espinas (varía dependiendo de la especie y variedad).
- Flores: Ligeramente aromáticas, solas o agrupadas con o sin hojas. Los brotes con hojas (campaneros) son los que mayor cuajado y mejores frutos producen.
- Fruto: Hesperidio. Consta de: exocarpo (flavedo; presenta vesículas que contienen aceites esenciales), mesocarpo (albedo; pomposo y de color blanco) y endocarpo (pulpa; presenta tricomas con jugo).

### B. Situación actual de la industria cítrica en Guatemala

En Guatemala, se reporta el cultivo de los cítricos desde la época de la colonia, introducidos por los españoles. A principios del siglo se habían establecido huertos frutales no comerciales, estos servían como fuente de fruta para trabajadores y colonos de las fincas de café y algodón. En los años 30, se inicia la siembra de las primeras plantaciones de cítricos en el occidente del país, las cuales oscilan entre 3 a 15 ha, pero los materiales introducidos eran de baja calidad y bajo rendimiento. A partir de los años 50, el Ministerio de Agricultura fomentó el desarrollo del cultivo en la costa del Pacífico y se introducen materiales de alta calidad y alto rendimiento, provenientes de la Universidad de California. Entre las variedades sembradas en ese entonces, se encontraban las mandarinas Dancy, naranjas Valencia, Washington Navel, Victoria, Shamouti, toronjas y limas ácidas (Limón persa). En la década de los 70, el panorama de los cítricos en Guatemala empezó a cambiar positivamente; el gobierno en conjunto con Asociación Nacional de Cafetaleros (ANACAFE) promovió la diversificación de cultivos en el área cafetalera. A partir de ello se establecieron plantaciones de medianas, de 20-45 ha. Hasta el momento se había estado cultivando más que todo naranja dulce de

diferentes variedades y mandarina, pero a partir de la década de los 80 se comenzó a cultivar la lima persa, conocido como limón persa y en los últimos años se ha fomentado el potencial de éste cítrico para exportación en fresco a Estados Unidos, México y Europa (Programa de fruticultura (PROFRUTA) 2003).

Existen aproximadamente 7,343 ha de cítricos sembrados en el país. De esta área el 57% (4115 ha) se dedica a cultivar naranja dulce (Valencia y Washington), el 38% (2774 ha) a limón criollo (lima mexicana) y a lima persa, el 6% (419 ha) corresponde a mandarinas Dancy y otros como toronjas y tangelo. Al analizar los datos reportados del área sembrada durante el año 1999 (6,000 ha) y compararlas con el año 2002, se ve que hay una tendencia creciente a la siembra de plantas cítricas, reportándose una constante siembra de, aproximadamente 450-500 ha al año. Los rendimientos nacionales, oscilan de 7.5 TM/ha a 55 TM/ha, reportándose una producción de 50,000 TM de fruta por temporada. La mayoría de esta producción esta destinada al consumo de fruta fresca y para jugos. El nivel de exportación ha sido mínimo y se restringe a El Salvador, Honduras y el sur de México (PROFRUTA 2003) y (Obiols 2004).

Según Gutiérrez (2003), en el diario eco2site afirma que «Centroamérica es la región que más está sintiendo la crisis del café con un desempleo que ha afectado a más de 1,5 millones de personas. Casi la mitad de la población dedicada al cultivo de los cafetales en Guatemala ha tenido que cambiar de trabajo o marchar a la ciudad o migrar fuera del país. La razón de lo anterior, no ha sido otra que una sobreoferta de producción indiscriminada».

Como alternativa para contrarrestar la crisis del café y de la agricultura en Guatemala, el Ministro de Agricultura, Byrón Dardón (2003) dijo que: «Como parte del nuevo proceso será el encontrar nuevos mercados (como el comercio de cítricos), así mismo se pretende proporcionar a pequeños y medianos productores apoyo en comercialización. De esa manera se espera que la cadena productiva sea fortalecida y los agricultores, especialmente los pequeños y medianos puedan tener mejores ingresos por su trabajo».

Del mismo modo, según información publicada en el panfleto informativo, denominado «Programa de incentivos a la fruticultura», elaborado por el proyecto de desarrollo de la fruticultura y agroindustria (PROFRUTA) en el año 2004, se menciona sobre una novedad, en la cual se crea el denominado Programa de incentivos a la fruticultura (PINFRUTA). Este programa inicia en el año 2005 y beneficiará con incentivos fiscales, asistencia técnica y capacitación a los productores que siembren árboles frutales, entre los cuales se encuentran los cítricos como el limón persa, limón criollo y mandarinas. El requisito indispensable para recurrir a este crédito es que las plantaciones deben ser mayores de una hectárea y las plantas deben provenir de viveros certificados, libres de enfermedades y registrados por la Unidad de Normas (UNR) y Regulaciones del Ministerio de Ganadería y Agricultura (MAGA), inspeccionados por el Programa de fruticultura (PROFRUTA). Ambas instituciones han estado incentivando recientemente la siembra de cítricos debido a su alto potencial para exportación, en especial en el cultivo de limón persa.

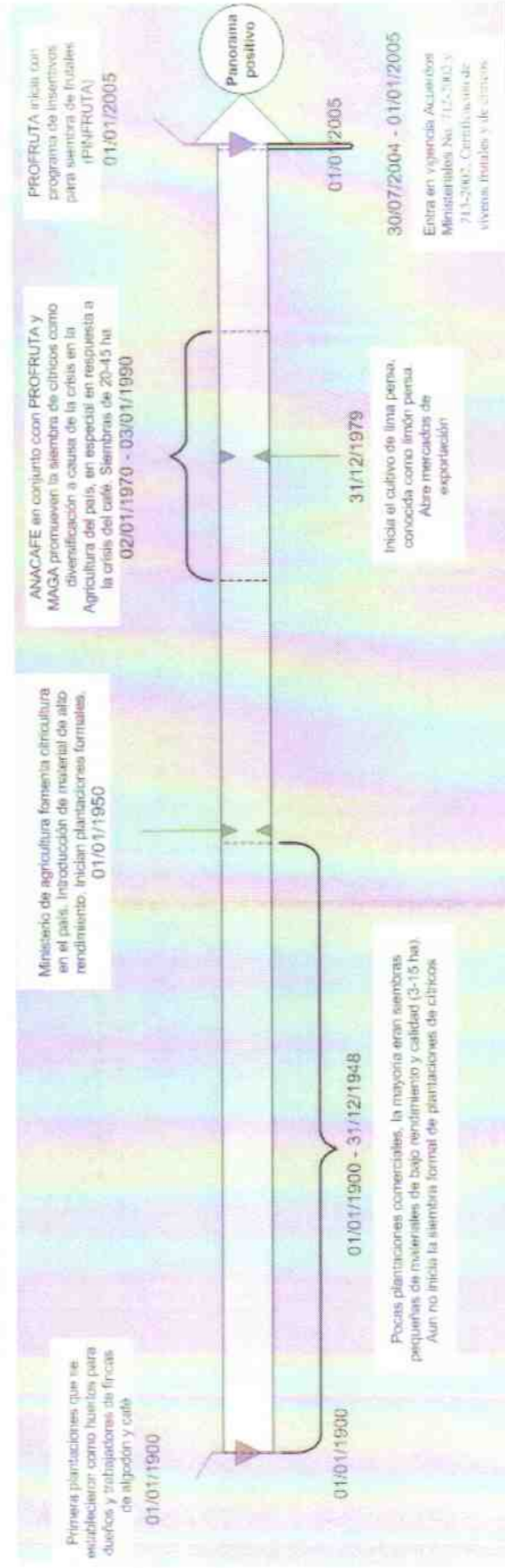
El Estado, debido a la situación agraria, continúa incentivando a los agricultores para que ellos siembren diferentes variedades de cítricos en el país. Cabe mencionar que tanto los agricultores y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) están buscando en forma insistente el mejorar la calidad y el rendimiento nacional. Los objetivos finales de ello es el poder competir

internacionalmente, mejorar los ingresos internos y enriquecer la genética de la fruticultura nacional. En general los anteriores han observado que este tipo de frutales están sujetos a ser afectados por muchos problemas fitosanitarios, entre los cuales están los causados por insectos, ácaros, hongos, bacterias, nemátodos, virus y viroides. Estos organismos afectan la calidad y la cantidad de la producción, así mismo el vigor y la longevidad de las plantas establecidas. Muchos de estos problemas pueden ser resueltos a nivel de campo por los métodos convencionales de manejo de plagas, sin embargo, cuando se enfrentan con enfermedades causados por virus, viroides o bacterias esto no ha sido posible. En respuesta a ello, a partir de septiembre del año 2004, según la UNR del MAGA, entra en vigencia los Acuerdos Ministeriales No. 712-2002 y 713-2002. En ellos se recalca sobre la importancia de un Programa de Certificación de plantas frutales y se establecen los requisitos aplicables a la producción, certificación, importación, exportación y comercio de semillas, partes de plantas y plantas de frutales certificadas y cítricos en específico. El fin de los mismos es el brindar a los usuarios y viveristas, las directrices jurídicas principales, para proporcionar apoyo a una producción frutícola tecnificada y altamente competitiva en el país (*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación 2004*).

Lo anterior indica que el panorama de la siembra de cítricos en Guatemala podrá mejorar significativamente, ya que se tratará de incentivar y mejorar las condiciones de mercado para la siembra de cultivos de este tipo. En consecuencia a todo ello, la demanda de plantas certificadas para siembra y re-siembra de fincas podría aumentar significativamente, en comparación con años anteriores.

El cultivo de cítricos es muy importante en regiones tropicales y subtropicales, los mayores productores son: América del Sur (Brasil y Argentina), Asia (Sudáfrica, China y Japón) quienes producen el 37% de la producción total; América del Norte y Central aportan el 36% y la región del Mediterráneo (España, Italia, Marruecos, Grecia, Israel y Chipre) los cuales tienen el 27% de la producción total. Los árboles de cítricos, en especial la naranja y el limón, se consideran como las frutas de mayor importancia en el mundo. Los frutos frescos tienen un amplio mercado en el consumo doméstico y local. Así mismo, el cultivo de los cítricos ofrece un amplio grado de industrialización, procesando los mismos en forma de mermeladas, concentrados, enlatados y en mayor importancia como jugos naturales. El cultivo de los cítricos es de mucha importancia socioeconómica, ya que es una fuente generadora de empleos desde la producción a los procesos de comercialización, son altos en vitamina C, contribuye al aprovechamiento de los recursos naturales del país y a la vez es una alternativa viable para la diversificación agrícola en Guatemala (*Proyecto de Desarrollo de la Fruticultura y Agroindustria 2003*).

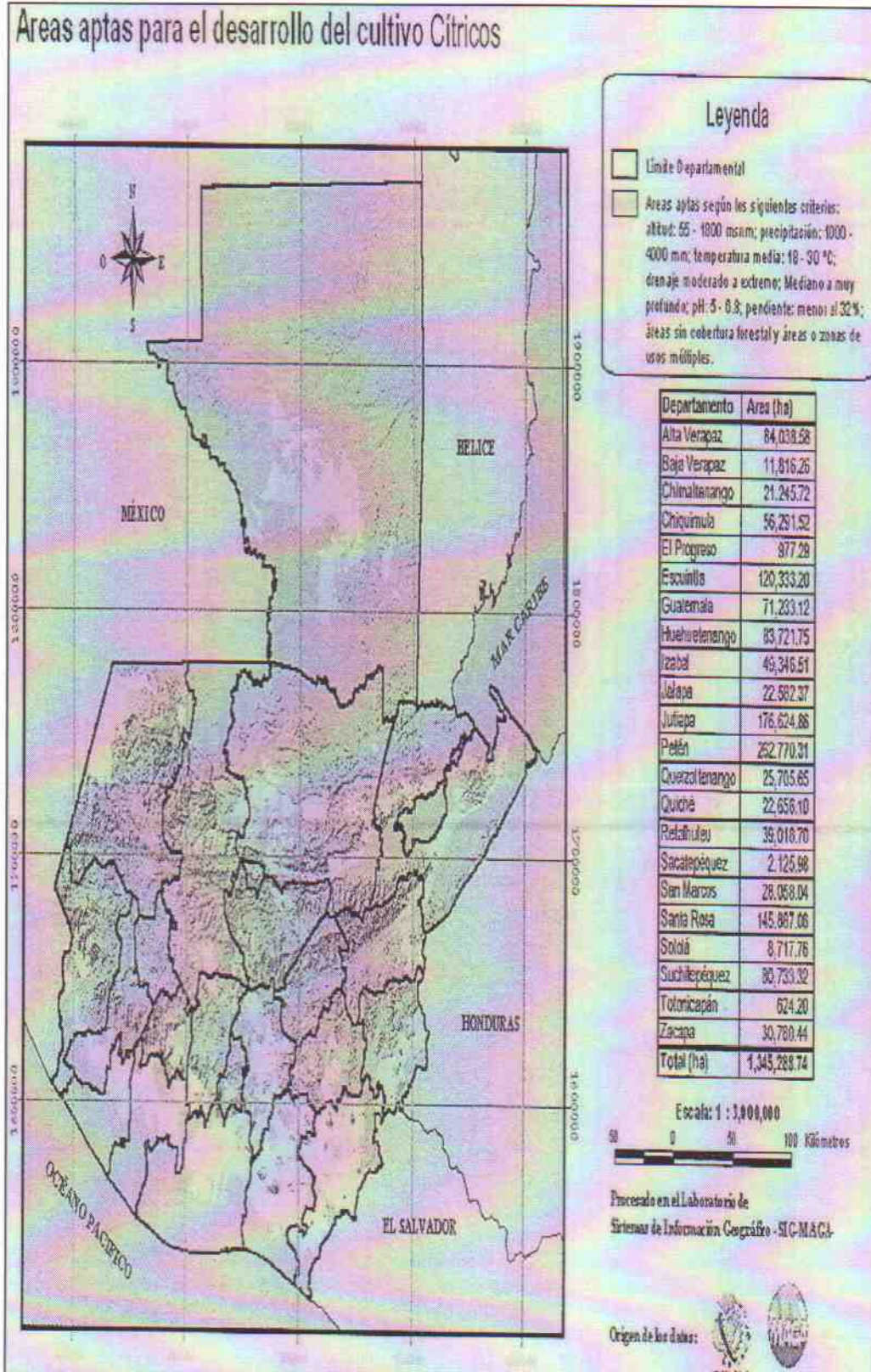
**Ilustración 1. Historia de la siembra de cítricos en Guatemala**



**I. Tamaño del posible segmento de productores de cítricos interesados en adquirir plantas cítricas certificadas:**

No se puede obtener un dato exacto de cuál será la demanda de plantas para siembra y resiembra en Guatemala, pero se puede realizar un aproximado de acuerdo al potencial de desarrollo del cultivo y la tendencia del mercado a la compra de este tipo de plantas. Como se puede ver en la Ilustración 1, el área aprovechable ideal para la siembra de cítricos en Guatemala es de aproximadamente 1,345,288.74 ha El área cosechada actual es de 7,343 ha Lo anterior nos indica que únicamente el 0.05% del área potencial esta siendo aprovechada para su siembra. Cabe mencionar que según los criterios utilizados para elaborar el mapa, no se tomo en cuenta el área que ya se encuentra sembrada con otros cultivos, en especial con el cultivo del café (*Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación 2003*).

**Ilustración 2. Mapa de áreas aptas para la siembra de plantas cítricas en Guatemala**



Fuente: PROFRUTA E ICDF 2003.

## C. Generalidades de las enfermedades y su descripción:

### 1. Virus:

Los virus, en su etapa de virión, es decir, fuera de cualquier célula viva, son un agregados moleculares con un cápside (capsula que recubre al virus, asemejando una pared celular), que no se pueden reproducir, metabolizar, ni llevar a cabo otras funciones; pero si son capaces de unirse a una célula de cualquier huésped vivo, para iniciar su infección. Hay un sin número de variedades, tamaños y formas de virus y en general, contienen una limitada información genética. El genoma de un virus contiene desde tres genes diferentes hasta quinientos y únicamente esta constituido por DNA o por RNA, en cadenas doble o sencilla. Cualquiera que sea su tamaño, el virus depende de la célula huésped para llevar a cabo la formación de más partículas virales (parásito obligado) (Karp 1987).

Durante el estado de infección de la célula viva, el material genético del virus se libera dentro de la célula, en donde puede adquirir ciertas propiedades. En ciertos casos, dentro de la célula, el virus puede mostrar nuevas partículas, con la cual se produce la muerte de la célula, puede permanecer en el interior de la misma sin presentar ningún efecto o afectando de modo drástico su comportamiento y composición. (Karp 1987). En los cultivos de interés agrícola afectan drásticamente reduciendo su rendimiento y apariencia y en casos extremos causando la muerte de las plantas (Agrios 2002).

#### a. Virus de la tristeza de los cítricos (CTV):

Enfermedad viral producida por un Closterovirus. Es un virus flexible, filamentosos y limitado al floema. Los daños pueden ser leves o bien letales dependiendo de la cepa. No se ha comprobado su transmisión por semillas, ni a través del suelo o raíces, se transmite por injerto y de forma natural, por medio de diferentes especies de áfidos, tales como: *A. gossypii* (Glover), *A. citricola* (Van der Goot), *A. craccivora* (Koch), *Myzus persicae* (Sulzer), *Uroleucon jaceae* (Lin) y el *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), principal vector del virus. Los hospederos de este virus, incluyen la mayoría de las variedades de cítricos y algunas especies de otros géneros de la familia *Rutacea*. Fuera de esta familia, solamente se ha podido multiplicar en algunas especies de *Passiflora* (Peña et al. 2002).

Para lograr un diagnóstico confiable se deben seleccionar muestras abundantes de tejido floemático alrededor de todo el árbol (cuatro puntos cardinales) como brotes jóvenes, pedúnculos del fruto o pecíolos de las hojas, ya que este virus frecuentemente se encuentra en bajas concentraciones y con distribución irregular en el árbol (Peña et al. 2002).

Se dice que el virus se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, ha causado grandes daños en plantaciones de España, Argentina, Brasil, Venezuela, California, Florida e Israel (Peña et al. 2002) y es seguro que se encuentre en la mayoría de los países productores de cítricos (Roistacher 2004). En Guatemala se realizó un muestreo del virus en el año 1993, reportando el mismo en las cepas moderadas y severas. La mayoría de las plantaciones eran susceptibles, ya que se encontraban sobre patrón de naranjo agrio (Reyes y Palmieri 1994)

#### b. Psorosis:

Enfermedad viral producida por un Ophiovirus (*Martin et al. 2002*). Por sus características se encuentra ubicado en un nuevo género de virus vegetales, el agente causal es el citrus psorosis virus (CPSV). Aunque su impacto económico es bajo, en plantaciones viejas se ha presentado con frecuencia y puede disminuir considerablemente el rendimiento de los árboles. Puede haber árboles que no presenten síntomas. En general, el tiempo en que empiezan a aparecer los síntomas de la enfermedad es entre los siete y catorce años de edad del árbol o llegar a los 50 sin presentar síntoma alguno, por lo que es una enfermedad sumamente delicada, ya que no se puede detectar visualmente hasta que la plantación está establecida o en plena producción. El virus puede ser diseminado por instrumentos usados en el invernadero o en campo, pero principalmente por injerto. No hay evidencias experimentales de que pueda ser transmitido a través del polen, semillas o por un vector, pero no hay que descartar las posibilidades (*Peña et al. 2002*).

El virus en el campo puede variar considerablemente, de modo que es necesario utilizar varios métodos de diagnóstico y épocas de recolección para la detección del virus (*Peña et al. 2002*). Se dice que la mejor época para muestreo de esta enfermedad es en la época fría del año, ya que en este clima el virus se encuentra a una mayor concentración (*Alioto et al. 2001*). En el caso de Guatemala, la época fría y la mejor época para hacer un muestreo es durante los meses de noviembre a mediados de febrero.

Para lograr un diagnóstico confiable se deben seleccionar muestras abundantes tejido en crecimiento, como brotes jóvenes, pedúnculos del fruto o peciolo de las hojas (Corona del árbol), ya que este virus frecuentemente se encuentra en bajas concentraciones y con distribución irregular en el árbol. Aunque en Guatemala no se ha comprobado su presencia, el virus puede estar distribuido en todo el mundo y, en algunos casos se puede presentar en árboles asintomático (*Roistacher 2004*).

#### c. Leprosis:

Enfermedad viral local, producida por un Rhabdovirus. Ocasiona graves lesiones en hojas, ramas y frutos, provocando pérdidas considerables de las cosechas cuando los daños son muy severos (*Peña et al. 2002*).

Los vectores que transmiten la enfermedad son los ácaros del género *Brevipalpus*, de las especies *phoenicis*, *obovatus* y *californicus*, de los cuales se tiene conocimiento que las especies *phoenicis* y *californicus*. Se transmite por larvas, ninfas y adultos, siendo el estado larvario el más efectivo. Las larvas de *B. phoenicis*, pueden transmitir la enfermedad después de 24 horas de adquisición del virus y los síntomas aparecen de 14 a 30 días después. De forma mecánica se ha logrado la transmisión entre cítricos y plantas herbáceas (*Peña et al. 2002*).

El diagnóstico se basa generalmente en la observación de síntomas en campo *Peña et al. 2002*). Pero entre los métodos de detección rápida se incluyen la microscopía electrónica y hay primers específicos para la enfermedad. Se sospecha que hay 2 cepas o más en el mundo, ya que las muestras analizadas en Guatemala y en otras partes, difieren a aquellas analizadas en Brasil. En Brasil el virus se encuentra en mayor concentración en el núcleo en comparación con el citoplasma, en cambio en Guatemala, se encuentra en mayor concentración en el citoplasma<sup>1</sup>.

El virus fue descrito en Estados Unidos, reportado en Brasil, Argentina, Uruguay, Venezuela y algunos países de Centroamérica, como Panamá, Costa Rica y Guatemala (Peña et al. 2002).

d. Woody gall (En Inglés; Vein enation):

Enfermedad viral sistémica, producida por un Luteovirus. El virus reduce la calidad del fruto, la producción y la morfología de las plantas, causando enanismo a las mismas (Buchen y Osmond 1987).

La enfermedad puede ser transmitida por injerto, mecánicamente por frotar cítricos sanos con enfermos, por plantas parásitas (Cuscutacea: *Cuscuta sublincosa*) y por vectores en forma persistente (Áfidos: *Toxoptera citricida*, *Myzus persicae* y *Aphis gossypii*) (Weathers y Harjung, 1964).

El diagnóstico se basa generalmente en la observación de síntomas en campo. Pero entre los métodos más eficientes se encuentra la indexación por medio de injertos en variedades susceptibles de cítricos ("Mexican lime" Citrus limon, Naranja agria, Volkameriana, naranja dulce y mandarina) (*Handbook detection of virus in citrus*). Graca y Clark, en el año 2000 reportaron que hay un método de detección rápida utilizando un kit ELISA para Luteovirus, pero se dice que el método no es del todo confiable y que aun se encuentra en proceso de investigación. Así mismo, se puede incluir la microscopia electrónica (Graca et al. 2000).

El virus se encuentra distribuido en Australia, Sur África, Estados Unidos (California) y en la mayoría de áreas cítricas del mundo, aun así, no se sabe el impacto mundial que ha causado la enfermedad (Buchen y Osmond 1987).

2. Viroides:

Son los agentes causales más pequeños y simples descritos. Son diez veces más pequeños que un virus y constan de una sola molécula de ácido ribonucleico con una configuración que les permite gran estabilidad ante el calor y otros tratamientos que inactivan a los virus. En Guatemala, provocan dos enfermedades de importancia económica, la exocortis y la cachexia, causadas por el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) y una variante del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd), el viroide de la cachexia de los cítricos (CCaVd), respectivamente. Además se han identificado otras especies, tales como: el viroide de la hoja corvada de los cítricos (CBLVd), los viroides III (CVd III) y viroide IV (CVd IV) de los cítricos, que no causan daños tan significativos a variedades comerciales (Peña et al. 2002).

a. Exocortis:

El agente causal es el viroide de la exocortis de los cítricos, del que se ha identificado un gran número de variantes de distinta agresividad. Puede causar reducción de hasta un 60% en las cosechas (Peña et al. 2002).

Puede ser transmitida por injerto y de manera mecánica a través del uso de grandes pérdidas económicas, por bajas en el rendimiento. Se ha observado que los daños son mayores cuando las plantas son infectadas en el invernadero o en su propagación en comparación con la infección mecánica (Peña et al. 2002).

La enfermedad se encuentra distribuida en la mayoría de las áreas citrícolas de todo el mundo (Peña et al. 2002 y Roistacher 2004) y ya se comprobó que está presente en Guatemala.

b. Cachexia-xyloporosis:

Viroide que ha sido caracterizado como una variante del viroide del enanismo de lúpulo (HSVd) y las variantes de esta especie de viroides identificadas en cítricos, se han denominado viroide II de los cítricos. Puede tener un efecto letal (Peña et al. 2002) o bien puede causar grandes pérdidas económicas (Roistacher 2004).

Puede transmitirse por injerto y de manera mecánica utilizando herramientas contaminadas (Peña et al. 2002).

La enfermedad se encuentra distribuida en la mayoría de las áreas citrícolas de todo el mundo (Roistacher 2004).

3. Bacterias fastidiosas:

Bacterias que pertenecen a la clase Mollicutes que se caracterizan por no contener una pared celular. Las mismas no se pueden cultivar en medios artificiales (Dawn et. Al. 1994) (Agrios 2000).

a. Clorosis variegada de los cítricos (CVC) Xylella fastidiosa:

Es una bacteria que afecta a todas las variedades comerciales de cítricos, en especial a la naranja. La enfermedad puede causar grandes pérdidas económicas, ya que un árbol infectado disminuye drásticamente el tamaño de los frutos afectando así su rendimiento y forma una cáscara dura siendo frutos de rechazo. Así mismo, se reduce el tamaño de las plantas, hay muerte de hojas y ramas, pero la planta no muere. El problema se debe a que las plantas se agotan después de aproximadamente dos años de producción teniendo impacto sobre la producción de las mismas.

Se ha demostrado que la bacteria puede ser transmitida mecánicamente, pero principalmente por injerto de yemas infectadas. Se cree que puede ser transmitida por medio de vectores, entre ellos el de mayor importancia es la chicharrita de la especie *Oncometopia nigricans* (Lee R.F. et al. 1991).

En el Cuadro 1, se pueden observar la forma de control y los métodos de detección de las enfermedades descritas anteriormente.

Cuadro 1. Formas de control y métodos de detección de las enfermedades

Enfermedad	Detección	Prevención/Control
<b>Tristeza de los cítricos (CTV)</b>	Procedimientos biológicos (inoculación de plantas indicadoras)*. Microscopía óptica y electrónica. Técnicas inmunoenzimáticas y moleculares. ELISA**	Uso de material certificado. Utilizaciones de patrones resistentes. Aislamiento de áreas afectadas. Control de los vectores.
<b>Psorosis (CPsV)</b>	Procedimientos biológicos*. Anticuerpos monoclonales de aislados de CPsV para su uso en ELISA. Primers para RT-PCR**.	Control tipo preventivo, propagando yemas libres del virus mediante programas certificados. Desinfección de las herramientas de campo. Supresión de fuentes de inóculo.
<b>Leprosis (CLV)</b>	Observación de síntomas en campo. Inoculación de plantas indicadoras. RT-PCR**.	Uso de material certificado. Eliminar fuentes de inóculo. Control del vector (aplicación de acaricidas). Eliminar ramas afectadas mediante poda severa y quema de los restos, debido a su carácter local.
<b>Vein enation (Woody Gall)</b>	Inoculación o indexación por medio de injerto en variedades susceptibles**. ELISA no específicos para detección de luteovirus. Microscopía electrónica.	Control de vector. Evitar presencia de plantas parásitas. Utilización de variedades tolerante (Mandarina Cleopatra, Citrumelo CPB 4475 y <i>Citrus macrophylla</i> ). Control tipo preventivo, propagando yemas libres del virus mediante programas certificados. Tratamiento de yemas por termoterapia o ubicación de árboles en lugares calientes. Supresión de fuentes de inóculo (Eliminación de árboles infectados).
<b>Exocotris (CEVd)</b>	Plantas indicadoras. Análisis de los ácidos nucleicos (sPAGE) y hondas (HAN) con mayor sensibilidad. RT-PCR.**	Utilización de plantas y yemas sanas procedentes de un programa de certificación. Desinfección de herramientas de trabajo.
<b>Cachexia (CCaVd)</b>	Plantas indicadoras. Análisis electroforéticos de ácidos nucleicos y por medio de sondas con la impresión de tejidos frescos. RT-PCR.**	Utilización de plantas y yemas sanas procedentes de un programa de certificación. Desinfección de herramientas de trabajo.
Clorosis variegada de los cítricos (CVC) <i>Xylella fastidios</i> .	ELISA utilizando antisuero para CVC. Microscopía electrónica.**	Desinfección de manos, herramientas y ropa. Control tipo preventivo, propagando yemas libres del virus mediante programas certificados. Supresión de fuentes de inóculo (Eliminación de árboles infectados). Control del vector (poco eficiente y no económico).

\* Mas aceptada, \*\* Mas usada

Fuente: (Peña et al. 2002), (Dean G.), (Davis, et.al.1991) (Brlansky 1990) (Buchen y Osmond 1987)(Roistacher y Calavan, 1974).

El Cuadro 2 presenta el detalle de la sintomatología de las enfermedades producidas por virus y viroides y bacterias fastidiosas.

**Cuadro 2. Sintomatología de las enfermedades en condiciones naturales de crecimiento**

Enfermedad	Descripción de la sintomatología
<b>Tristeza de los cítricos (CTV)</b>	<p>Declinamiento rápido y muerte (1-2 años después de la infección) de naranjos, toronjas y mandarina injertadas sobre patrón naranjo agrio (<i>Citrus aurantium</i>) y la acanaladura en la madera de los naranjos, toronjas y limones ácidos, con independencia del patrón. La enfermedad provoca un anillado en los árboles, causando una clorosis, marchites, abundante fructificación y destrucción de las raíces. El tronco del patrón (Justo debajo del injerto) tiene pequeños orificios en la corteza que tiene forma de agujas, llamado panal de abejas. Las ramas principales y el tronco pueden tener aspecto arrugado. Las plantas infectadas son enanas y la calidad del fruto y tamaño se reduce significativamente.</p>
<b>Psorosis (CPsV)</b>	<p>Presencia de descamaciones en el tronco y ramas. Las formas leves de la enfermedad (Psorosis A) se caracteriza por una descamación lenta muy localizada del tronco y ramas principales. Las más severas (Psorosis B), afecta en forma más drástica incluso a ramas delgadas. En los límites de las zonas descamadas se exuda goma. Cuando se hace un corte transversal a través de la zona afectada se observan zonas con madera de color pardo oscuro irregular. A causa de lo anterior, se produce un decaimiento progresivo, se secan las ramas se reduce la producción, calidad de los frutos y en casos extremos muere el árbol. Las hojas jóvenes tienen flecos cloróticos que normalmente se encuentran entre los nervios laterales de la hoja y paralelo a ellos. Hay formas de psorosis (ringspot) que induce flecos, manchas y anillos cloróticos en las hojas y en ciertos casos en ramas y frutos.</p>
<b>Leprosis (CLV)</b>	<p>En árboles en producción se observan daños corticales en tronco, ramas y frutos. En las ramas jóvenes, hojas y frutos aparecen anillos cloróticos y en ocasiones con necrosis central que evoluciona en canchros de 5-6 mm. De diámetro rodeado por un halo clorótico. Estas lesiones pueden ser visibles de ambos lados. Sobre los frutos las lesiones se presentan en forma irregular en forma de manchas amarillas, que van tornándose más oscuras a medida que el fruto madura. En daños muy severos los brotes se pueden secar, los frutos pueden sufrir abscisiones. En las ramas los daños tienen coloración caramelo oscuro (café), y al envejecer se tornan de color grisáceo.</p>
<b>Vein enation (Woody Gall)</b>	<p>Se forman agallas leñosas en el tronco y en las ramas en aquellas plantas que se encuentran sobre injertos susceptibles (limón o volkameriana). Se observan enaciones, como abultamientos en forma de espinas en las hojas, enanismo de plantas, reducción en rendimiento.</p>
Enfermedad	Descripción de la sintomatología
<b>Exocotris (CEVd)</b>	<p>Enanismo, rajaduras y descamación de la corteza del tronco. Cuando la infección se debe a cepas severas se produce deterioro parcial o total del árbol (4-5 años). En cultivares como limones y limas ácidas se puede observar un moteado clorótico y rajaduras de la corteza en tronco y ramas.</p>
<b>Cachexia (CCaVd)</b>	<p>Debilitamiento general del árbol, clorosis, enanismo, raquitismo y deterioro (5-6 años). Aparecen síntomas de acanaladuras en la cara cambial de la madera y proyecciones en la corteza interna con fuerte impregnación de goma.</p>
<p>Clorosis variegada de los cítricos (CVC) <i>Xylella fastidios.</i></p>	<p>Afecta generalmente a los árboles jóvenes. Se puede observar clorosis intervenal muy parecida a la deficiencia de zinc. La clorosis aparece en hojas jóvenes mientras maduran, pero también puede aparecer en hojas adultas. Mientras las hojas maduran aparecen lesiones gomosas de color café en el envés de la hoja las cuales posteriormente se convierten de color café oscuro y se necrosan, en cambio en el haz estas zonas, se tornan de color amarillo. El tamaño de los frutos se reduce significativamente y la cáscara de los mismos se torna extremadamente dura, teniendo problemas a la hora de querer extraer el jugo de las mismas. El número de frutos no se reduce pero el rendimiento se ve afectado por el tamaño de los mismos y su calidad.</p>

Fuente: (Peña et al. 2002) y (Lee et al. 1991)(Schubert y Sun 2001) (Handbook detection of virus in citrus).

#### **D. Descripción de los procedimientos para la detección de enfermedades**

La detección de una enfermedad, se puede definir como el procedimiento o cualquier prueba que confirma la presencia (o ausencia) de cualquier enfermedad. Cada método de detección debe ser específico para cada enfermedad. En el caso de la detección de enfermedades virales, viroidales y aquellas provocadas por bacteria fastidiosas en cítricos, las metodologías más utilizadas son la detección por medios biológicos (indexación por injerto en plantas cítricas e inoculación en plantas herbáceas) y la pruebas serológicas (ELISA, PCR, RT-PCR y otras). En general, cualquier cambio morfológico en la bioquímica de las plantas, medible (que se pueda observar y cuantificar) y consistente se considera como un adecuado procedimiento de detección. El objetivo primordial de lo anterior es poder eliminar, curar o prevenir la distribución e importación de baretas para injerto o plantas enfermas. Con ello, se podrá confirmar exitosamente que cualquier invernadero multiplicador certificado este libre en enfermedades de este tipo y, se puedan fundar plantaciones libres de patógenos altamente productivas (Roistacher 1998).

La mayoría de las enfermedades se pueden detectar por síntomas en campo, sin embargo la mayoría de las enfermedades propuestas están presentes en las plantas en forma asintomática y en muchos casos únicamente se pueden detectar por pruebas biológicas o serológicas. El problema de ello es que si no se tiene conocimiento alguno de la presencia de la enfermedad, la plantación infectada sirve como fuente de inóculo, contagiando a todas las plantaciones cercanas (Roistacher 1998). Cada país debe establecer individualmente, según las condiciones locales, un sistema de certificación e inspección de viveros multiplicadores de cítricos, lo cual conlleva una serie de pasos e infraestructura adecuada para la certificación. Posiblemente lo más importante de todo sistema de detección es que se debe tener personal clasificados en el tema y, que este en continua capacitación e investigación para mantener los estándares de control los más adecuados posibles (Roistacher 1991). Las metodologías de indexación y detección se describen a continuación:

##### 1. Recolección de muestra y su almacenamiento:

Las baretas para injerto son el material utilizado para realizar la indexación biológica por medio de injertos (se pueden realizar injertos de hoja, injertos de corteza sin yema e injerto de yema), sin embargo, se debe recolectar tronco, corteza y hojas de diferentes edades para realizar las detecciones serológicas (1-2 baretas con 10 yemas viables y aproximadamente ½ libra de muestra vegetal «hojas y peciolo»). Las muestras no deben ser tomadas en épocas donde el clima es extremadamente caliente, ya que algunas enfermedades no se encuentran activas en ese momento. Conforme el clima se enfría las mismas retoman su actividad. Inmediatamente después de su recolección, el material vegetal se debe colocar en bolsas selladas de polietileno o en el caso de baretas, se pueden almacenar dentro de tubos plásticos no sellados con humedad al fondo (algodón o papel mojado), para evitar su desecación. En todos los casos las muestras deben estar debidamente rotuladas con su etiqueta de identificación (Ilustración 3). Después de su recolección el material se debe colocar en hieleras y ser transportadas lo antes posible al laboratorio. Al arribar al laboratorio todas las muestras se deben introducir en la refrigeradora o al cuarto frío entre 4°C y 6°C, tratando de evitar que las mismas se congelen. Las

baretas para injerto se pueden mantener bajo refrigeración hasta tres semanas, pero preferentemente se deben realizar las indexaciones de inmediato (Roistacher 1998).

### Ilustración 3. Etiqueta de identificación, laboratorio de virología vegetal, departamento de protección vegetal UVG

<b>LABORATORIO DE VIROLOGÍA VEGETAL</b> UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA	
<b>Fecha:</b>	_____ <b>No.</b> _____
<b>Proyecto:</b>	_____
<b>Especie:</b>	_____
<b>Lugar:</b>	_____
<b>Análisis sugerido:</b>	_____

#### a. Recomendaciones generales para la recolección y transporte de material vegetal (Frison & Taher 1991):

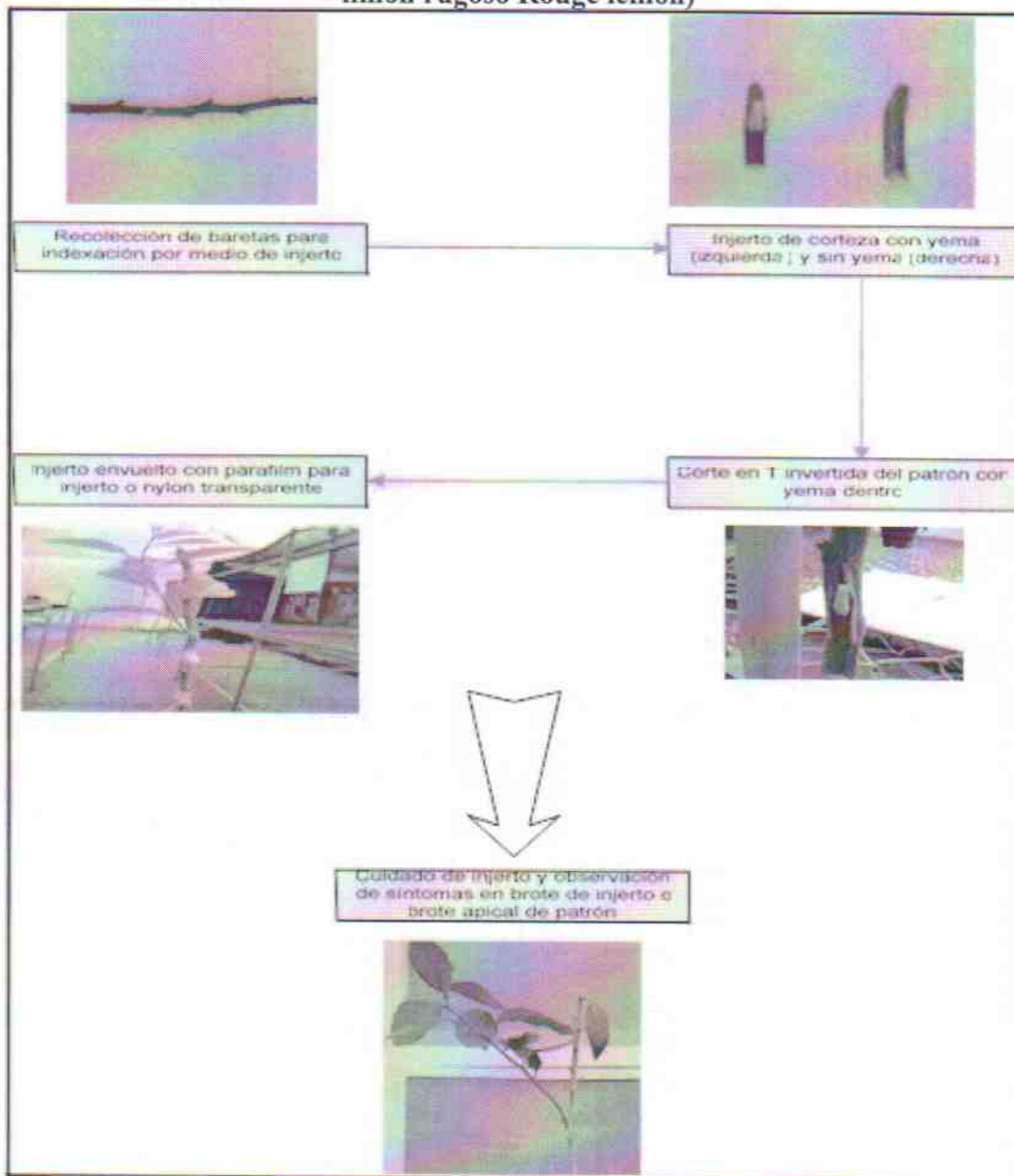
- Las herramientas de trabajo (cuchillos, tijeras podadoras, etc.) deben ser esterilizadas al sumergir las mismas en una solución de hipoclorito de sodio (2-10%), durante algunos segundos.
- Los brotes con yemas para injerto recolectadas deben ser de un brote maduro de la parte externa y superior del árbol. Se debe tratar de evitar el corte de ramas extremadamente jóvenes o muy adultas.
- Remover hojas y espinas, dejando los pecíolos. Identificar y mantener en hieleras.
- Lavar las baretas recolectadas con detergente y agua utilizando un cepillo suave. Después se deben sumergir en una solución de 0.5% de hipoclorito de sodio con 0.1% de agente humectante. Por último, se deben lavar completamente con agua y se deben secar al aire o con una toalla limpia.
- Es recomendable que las partes terminales de las estacas con yemas se sumerjan en cera de parafina derretida para evitar su desecación.
- El injerto se debe hacer lo antes posible, si no es así se pueden almacenar como se especifico anteriormente.

#### 2. Metodología de indexación biológica y síntomas a observar en plantas indicadoras:

La mayoría de las indexaciones biológicas en cítricos se hacen a partir injertos de material obtenido de la planta a que se le desea realizar la prueba, en plantas cítricas indicadoras sanas, dependiendo de cada caso. Hay diferente tipo de material que se puede utilizar para hacer este tipo de injertos. Se puede hacer injerto de corteza sin yema, con yema o de hoja (Ilustración 4). En general el tipo de injerto realizado en el tronco es del tipo T invertida, parche circular y rectangular en hojas, pero en algunos casos especiales (indexación de fitoplasmas), también se puede realizar el injerto de tipo de púa lateral. Para envolver el injerto se puede utilizar retazos de parafina de injerto o de nailon. Si se utiliza nailon se debe cortar y eliminar después de aproximadamente dos a tres semanas. Al eliminar el

nylon, o después de dos semanas a un mes se debe observar la viabilidad del injerto, si el injerto esta muerto (café opaco) se debe injertar de nuevo la planta, por ello se deben hacer de dos a tres repeticiones de injertos en una misma planta. Es de suma importancia que las herramientas utilizadas sean desinfectadas apropiadamente con una solución de hipoclorito de sodio al 2%.

**Ilustración 4. Descripción de la metodología de indexación biológica en plantas cítricas, a través del injerto. Detección de woody-gall (vein enation) injertado sobre limón rugoso Rouge lemon)**



Fotografías tomadas por Irwin Donis, Invernaderos del Departamento de Protección Vegetal,

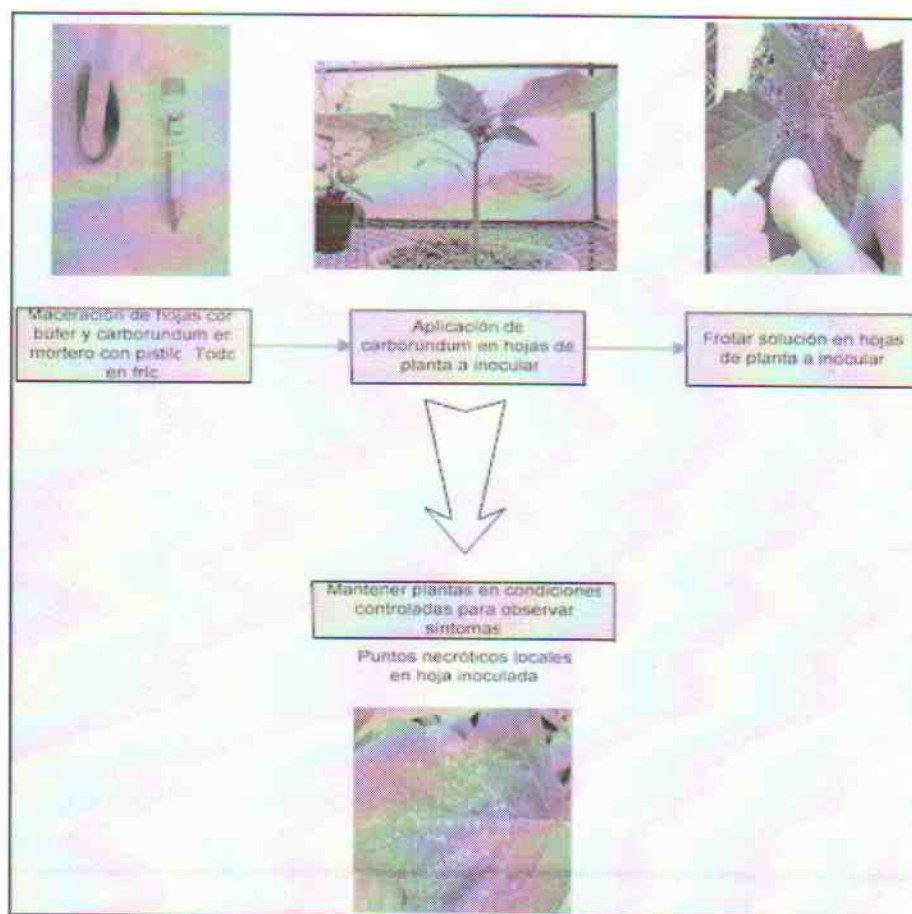
UVG.

Para inocular plantas herbáceas, en el caso de la detección de enfermedades como Psorosis y Leprosis, se realiza una inoculación mecánica por frotación descrita a continuación (Ilustración 5):

- Hay una gran variedad de Búffers utilizados para inoculación dependiendo del virus que se trate, el búffer que generalmente se utiliza es el fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0.01M-0.1 M, pH 8.
- Macerar hojas completas con pecíolos de plantas infectadas o posiblemente infectadas (muestra de invernadero) dentro de un macerador con un pistilo, en Búffer y un poco de carborundum (600 mesh.).
- Espolvorear carborundum (romper paredes celulares) a las hojas que se van a inocular en la planta indicadora.
- Frotar las hojas de las plantas a inocular con la solución preparada (búfer + planta).
- Dejar a la planta reposar durante 5-10 min.
- Lavar la planta por completo con agua destilada (En algunos casos este paso se puede omitir).
- Cada vez que se va a inocular una nueva planta con un virus o muestra diferente, se debe limpiar completamente el área y lavar las manos con jabón.
- Depositar las macetas en las mesas a 15 cms. Entre macetas para evitar el contacto entre ellas. Las macetas deben estar en platillo desinfectados (Cloro 5%), para evitar la contaminación del área a la hora de regar.
- Se debe evitar la aplicación de agroquímicos quemantes, ataques de insectos, enfermedades, para evitar la confusión de daños producidos por estos y, que la identificación de la enfermedad sea lo más confiable posible (Roistacher, 1991).

### Ilustración 5. Descripción de la metodología de inoculación mecánica.

#### Síntomas de TMV en *Datura stramonium*



### 3. Controles positivos y negativos:

Es importante que se mantengan controles positivos y negativos en cada indexación biológica realizada. Los controles positivos sirven como comparativo para saber observar los síntomas que presenta cada enfermedad. Los controles negativos inoculados y no inoculados, sirven para observar el crecimiento natural de las plantas e indicar posibles daños o efectos ambientales, así como aplicación de agroquímicos o ataque de patógenos. Así mismo, en cada institución donde se realizan las pruebas, se debería de mantener un reservorio de las enfermedades. Se ha encontrado que la mayoría de las naranjas dulces sirven como un excelente reservorio para este tipo de enfermedades. Estas plantas deben estar en continua observación y en continua indexación para asegurar la permanencia y estabilidad de la enfermedad (Roistacher 1991).

#### 4. Tiempo de observación de síntomas y de crecimiento de plantas indicadoras:

Dependiendo de cada enfermedad la aparición de síntomas y las condiciones de indexación pueden variar (Vid. Cuadros 3 y 4). Los síntomas se pueden observar en el brote del injerto o en los brotes apicales del patrón después de su indexación. Por ello, se debe mantener una minuciosa observación de las plantas y hojas de control, observando cualquier síntoma o cambio en la apariencia de las plantas inoculadas. Las hojas de control debe contener el código de inoculación, la fecha, muestra inoculada, planta indicadora utilizada, fecha de lecturas y un espacio para anotar observaciones. Las plantas inoculadas se deben mantener en condiciones adecuadas de temperatura y luz para que los síntomas se observen y desarrollen adecuadamente. En el caso de la mayoría de los virus se requieren de temperaturas bajas, mientras que en el caso de viroides y fitoplasmas se requieren temperaturas cálidas (Roistacher 1991). Algo muy importante es el saber cuánto tiempo se tardan en crecer las plantas indicadoras, para que las mismas sean inoculadas. Estos datos se presentan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Tiempo que tardan las plantas para alcanzar un metro, tamaño adecuado para realizar la indexación biológica, Universidad de California Riverside.**

Especie o variedad	Semanas	Promedio de semanas
Citrón	19-28	25
Limón Eureka	22-34	27
Rouge lemon (Limón rugoso)	23-34	28
<i>Citrus excelsa</i>	25-30	29
Naranja agria	26-38	32
Citrange Troyer	24-42	33
Limón mexicano	24-44	35
Dweet tangor	29-41	36
Toronja Duncan	28-48	40
Naranja dulce variedad Pineapple	48-56	51

Fuente: Roistacher 1998.

Cuadro 4. Síntomas observados en diferentes especies de plantas indicadoras cítricas, número de plantas a inocular y condiciones de crecimiento para la detección biológica de virus y viroides

Enfermedad	Planta indicadora	Tipo de plantas	Mínimo de plantas a inocular (Control negativo inoculado y no inoculado, control positivo e indexación de muestra)	Periodo de incubación (meses)	Síntomas en plantas indicadoras
<b>VIRUS</b>		<b>Temperatura de indexación: 24-27° C durante el día y 18-21° C durante la noche</b>			
<b>Tristeza</b>	Limon mexicano, citrón.	Semillas	2	2-6	Flequeado intermitente en hojas jóvenes y necrosis de nerviaciones en hojas adultas. Las nervaduras se aclaran. Acanaladuras en ramas, enanismo y clorosis (Ver ilustraciones 3 y 4).
<b>Vein enation-woody gall</b>	Limon mexicano, rouge lemon.	Semillas	2	2-6	Generalmente el segundo brote de hojas después de la inoculación presenta síntomas. Pequeños tumores en los nervios secundarios por el envés de las hojas generalmente maduras, que corresponden con depresiones en el haz. Agallas en el tallo cerca de las espinas (Vid. Ilustración 5).
<b>Psoriasis-Ringspot</b>	Naranja dulce (Pineapple o Madame vinous), citrón, lima mexicana o Toronja Duncan.	Semillas o Injertadas	2	2-6	Efecto de shock en el brote (Muerte repentina), flequeado foliar, anillos cloróticos y pustulas en hojas. El primer y segundo brote de hojas después de la inoculación tienden a presentar síntomas (Ver ilustraciones 6 y 7).
<b>Leprosis</b>	Naranja dulce	Semillas o Injertadas	2	No determinado	Manchas cloróticas que evolucionan a placas necróticas pardas en hojas y brotes

Enfermedad	Planta indicadora	Tipo de plantas	Mínimo de plantas a inocular ( <sup>1</sup> Control negativo inculado y no inculado, control positivo e indexación de muestra)	Período de incubación (meses)	Síntomas en plantas indicadoras
<b>VIROIDES</b>					
Exocortis y otros viroides	Cítron Arizona 861S-1 injertada sobre rouge lemon	Injertadas	2	1-6	Epinastia foliar (Enrollamiento hacia adentro severo de hojas), arrugado y necrosis de peciolo, grietas en el raquis hojas y la corteza. Enanismo de la planta (Vid. Ilustración 8).
Cachexia - Xiloporosis	Parson's Special injertado sobre rouge lemon Clemelin 11 - 20	Injertadas	2	6 -24	Agujeros en la madera que se corresponden con excrescencias de la corteza y gomosidad.

<sup>1</sup>: Se pueden sembrar únicamente varias plantas para el control negativo inculado, no inculado y el control positivo para una batería completa de inculación de varias muestras, no es necesaria la siembra de cada una de ellas por planta inculada.

Fuente: Roistacher 1991.

**Ilustración 6-11. Sintomatología de plantas indexadas o inoculadas en algunas plantas indicadoras**



Ilustración 6: Síntomas severos de tristeza en lima mexicana. Hojas maduras amarillas, enanismo y flaqueado (cupping) de hojas jóvenes. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.



Ilustración 7: Síntomas leves de tristeza en lima mexicana. Hojas jóvenes con las nervaduras claras con flaqueadas (cupping). Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.

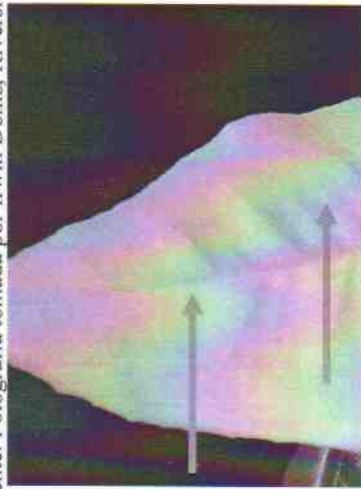


Ilustración 8: Síntomas de woody gall-vein ination en naranja agria. Pequeña enación o tumor en envés de hoja. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.



Ilustración 9: Síntomas de shock de psorosis en Madame vineos. Muerte severa de brote apical. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.



Ilustración 10: Síntomas de psorosis en Madama vinecous. Anillos cloróticos en hojas. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.



Ilustración 11: Síntomas de exocortis en Mandarina Pearson injertada sobre rough lemon. Enrollamiento hacia adentro en hojas. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.

**Cuadro 5. Síntomas observados en diferentes especies indicadoras herbáceas, número de plantas a inocular y condiciones de crecimiento para la detección biológica de virus y viroides**

Enfermedad	Planta indicadora	# de plantas a inocular (control negativo, repeticiones de inoculación de muestra) <sup>1</sup>	Período de incubación (semanas)	Síntomas en plantas indicadoras
<b>Psorosis</b>	<i>Chenopodium quinoa</i> <sup>2</sup> y <i>Gomphrena globosa</i> <sup>3</sup>	3	4-6	Lesiones locales circulares.
	<i>Chenopodium quinoa</i> , <sup>2</sup> <i>C. murale</i> y <i>Gomphrena globosa</i> <sup>3</sup>	3	5-7 14-16	Lesiones locales necróticas de 1-5 mm, de color pardo con centro clorótico en <i>Chenopodium</i> , de color pardo rojizo en <i>Gomphrena</i> .

<sup>1</sup>: Se pueden sembrar únicamente varias plantas para el control negativo inoculado, no inoculado y el control positivo para una batería completa de inoculación de varias muestras, no es necesaria la siembra de cada una de ellas por planta inoculada.

Nota: Días para que alcancen la madurez óptima para inoculación: 35<sup>o</sup>, 50<sup>o</sup>.

Fuente: Curso-Taller producción de material de propagación certificado de cítricos 2001.

## E. Características y diseño del invernadero multiplicador, comercial y certificador de indexación:

### 1. Definición de los diferentes tipos de invernaderos:

#### a. Invernadero comercial o propagador e invernadero de fundación o multiplicador:

El invernadero comercial es un área que establecen las empresas encargadas de suministrar plantas, para la venta al público interesadas en el establecimiento de plantaciones. Los materiales a comercializar deben partir de semillas y yemas certificadas (Unidad de Normas y Regulaciones 2002). El invernadero multiplicador es donde se multiplican materiales o variedades de interés y patrones en mayor volumen, con el objetivo de contar con suficiente material de propagación para el abastecimiento de yemas certificadas a lo invernadero comerciales. Utilizando patrones certificados y vigorosos (Unidad de Normas y Regulaciones 2002). Los dos invernaderos anteriores estarán ubicados en la Agropecuaria Popayán.

El objetivo primordial de un invernadero multiplicador y comercial certificado es el evitar la entrada o infección de las plantas presentes en el mismo, y pretende asegurar que esté libre de cualquiera de las enfermedades mencionadas. Para ello, se le debe dar un manejo adecuado y se deben realizar periódicamente ciertas pruebas comprobatorias, que nos aseguren su sanidad (Ver Metodología).

La finalidad es la obtención de suficiente material de propagación, que en este caso serían yemas certificadas que satisfagan las necesidades de los invernaderos comerciales o plantaciones comerciales. Estos invernaderos deben estar aislados con malla antiáfidos, con doble puerta, área donde se deben desinfectar las manos y los zapatos con compuestos de yodo o cloro, y como mínimo tener piso de arena. Las herramientas de trabajo se deben desinfectar cada vez que se trabajan las plantas, esto se puede realizar con una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Las plantas se dispondrán en hileras dobles formando bloques que agruparán las distintas variedades debidamente identificadas, según las condiciones propuestas por el ente certificador (MAGA 2002).

Según el artículo 14, requisitos del invernadero propagador o multiplicador protegido propuesto por el MAGA, en el acuerdo ministerial No. 712-2002 que lleva por nombre: «*Requisitos aplicables a la producción, certificación, importación, exportación y comercio de semillas, partes de planta y planta frutales certificadas*» indica que, los invernaderos deben estar protegidos con malla antiáfidos, malla perimetral, badenes de desinfección, doble puerta en la entrada, cuarto con cambio y ducha, piletas de lavado y herramientas propias. Se debe contar con un registro de comercialización del material propagativo, en el que se etiqüete las especies cítricas, cantidad comercializada, nombre del comprador y destino. Así mismo en el artículo 17, del mismo acuerdo, dice: Que a cada planta de cítrico certificada se debe adherir la etiqueta, marbete o marchamo, según corresponda, que contenga la información requerida (Cuadro 3), tomando en cuenta que el período de vigencia de las mismas, según el artículo 19, es de solamente 6 meses (MAGA 2002). Según Lee: «*La estructura del invernadero no tiene que ser altamente costosa, eso sí, se tiene que evitar la entrada de cualquier vector al mismo,*

utilizando la malla antiáfidos y por supuesto se le debe poner especial atención a la desinfección de las herramientas utilizadas dentro del invernadero” (Lee 2004).

**Cuadro 6. Información requerida en etiqueta y/o marchamo**

Etiqueta	Marchamo
Nombre de la variedad, lugar y ciclo de producción.	Número de registro del productor.
Clase de semilla.	Fecha de emisión.
Insumo utilizado en el tratamiento de la semilla.	
Porcentaje de germinación, pureza física, humedad (según el caso).	
Número de certificado fitosanitario.	
Nombre o razón social del productor y su residencia o sede social.	
Fecha de análisis de calidad de la semilla botánica.	

Fuente (MAGA 2002).

b. Invernaderos para indexación o pruebas biológicas:

Lugar donde se realizan las pruebas (Indexaciones biológicas) para comprobar el estado fitosanitario de las plantas presentes en el invernadero multiplicador y en el invernadero comercial (Unidad de Normas y Regulaciones 2002). El mismo, estará ubicado en las Instalaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

2. Características de la estructura de los invernaderos:

Las plantas se deben mantener en un invernadero, el cual no necesariamente tiene que ser de un alto costo. Se puede construir de madera o aluminio, dependiendo de los fondos disponibles. Como se mencionó anteriormente, todos los invernaderos involucrados en la certificación tienen que estar rodeada por una malla en contra de trips (<200 mesh) y cortinas de polietileno, todo ello se hace con el objetivo de evitar el paso de insectos y posibles vectores. La entrada debe ser de doble puerta el cual contenga un área oscura con pediluvio y aspersores para desinfección de manos (solución de vanodine 2%). El tamaño del invernadero depende de la cantidad de plantas a crecer, las necesidades del agricultor o cantidad de plantas a inocular (Roistacher 1991).

En el caso de los invernaderos para indexación se debe tener suficiente luz (40 a 50 candelas) y se debe poder controlar la temperatura. Preferentemente se tienen que tener tres secciones: La sección fría (24 ° C a 27° C durante el día y 18 ° C a 21° C durante la noche), para detección de la mayoría de los virus; la sección caliente (32 ° C a 40° C durante el día y 24 ° C a 27° C durante la noche), para detectar viroides, bacterias fastidiosas y fitoplasmas y, un área de temperatura variable (30 ° C a 35° C durante

el día y 20 ° C a 24° C durante la noche) para el crecimiento de las plantas indicadoras (Frison & Taher 1991). Para regular los parámetros especificados en éste párrafo, se enumeran los siguientes sistemas y características del invernadero.

a. Sistemas de calefacción:

Se puede adicionar calor a los invernaderos con la ayuda de calentadores de gas (ubicados fuera del invernadero, para evitar contaminación) soplando el aire caliente dentro del invernadero con ventiladores, calefacción por vapor utilizando radiadores o por tuberías con agua caliente colocadas alrededor de la estructura del invernadero. El sistema de calefacción se debe colocar según el área donde se construye el invernadero y, se deberá adaptar a las necesidades de cada invernadero de indexación (Roistacher 1991).

b. Sistemas de enfriamiento:

Hay tres métodos para enfriar invernaderos: Introduciendo aire frío del ambiente dentro del mismo, utilizando enfriadores por evaporación de agua (únicamente si la humedad relativa es baja) e instalando sistemas de enfriamiento (recomendados para invernadero pequeños) (Roistacher 1991).

c. Mesas o camas:

Para evitar el ataque de patógenos del suelo y que las bolsas o macetas estén aireadas, las plantas deben estar sobre mesas o camas elevadas del suelo. Estas pueden ser de madera tratada con aceite quemado o cobre colocadas sobre aluminio, concreto (sólido o planchas), plástico, etc. La altura de las mismas se define según el tamaño de plantas y se adapta para que las plantas se puedan manipular e injertar con facilidad (Roistacher 1991).

d. Suelo:

El suelo debe estar cubierto y tener un drenaje adecuado. Puede estar forrado con cemento, lona o bien de pedrín o grava (1 a 2 cm.). Se recomienda que el pasillo principal donde se transporta material y hay continuo movimiento, sea de cemento (Roistacher 1991).

e. Control de temperatura y humedad:

Este es un factor crítico, en especial en los invernaderos de indexación, pero también se debería tener un riguroso control en los invernaderos comerciales o multiplicadores. Lo ideal sería tener un control de temperatura diario con un termo hidrógrafo, si esto no es posible, se debe tener un termómetro de máximas y mínimas (Roistacher 1991).

f. Luz artificial:

Esto es necesario en algunos invernaderos de indexación. En ciertos casos se requiere de luz artificial para aumentar las horas luz o la intensidad de la misma. Esto se hace con el objetivo de que los síntomas en plantas indicadoras se presente. Por ejemplo, en la Universidad de Riverside, California (Latitud: 34°N) se requiere de luz adicional durante los meses de invierno (40-50 candelas) (Roistacher 1991).

3. Recomendaciones de manejo y cuidados dentro de los invernaderos:

- Como requisito indispensable, todos los invernaderos tienen que contener una entrada de doble puerta. Esta sirve como área de desinfección de manos y zapatos.
- Cada vez que se ingrese dentro del invernadero los individuos se tienen que desinfectar las manos y los zapatos en el área de doble puerta. Hay que tomar en cuenta que ésta desinfección no se hace una única vez en el día, se realiza cada vez que se entre al invernadero.
- Cada vez que se utilicen herramientas para poda u otros (tijeras, navajas), se tienen que desinfectar los mismos sumergiéndolos en una solución de hipoclorito de sodio al 2%.
- Todo el equipo (Fumigadoras, herramientas, etc.) y suministros (agroquímicos) que se utilizan dentro del invernadero certificador de indexación y los invernadero certificados libres de enfermedades, deben ser propios del lugar, no se pueden tomar de otros invernaderos, ni de aquellas utilizados en campo. Esto se puede hacer construyendo una bodega específica para el invernadero, cercana al área.
- Se deben aplicar las metodologías para el manejo integrado de plagas dentro del invernadero. Es de suma importancia, establecer un día fijo a la semana para revisar la presencia de plagas y en especial vectores. Esto se puede hacer en forma visual observando las plantas y colocando trampas de color amarillo dentro del invernadero (Frison y Taher 1991).

4. Muestreo teórico de plantas para la detección de enfermedades en invernadero de fundación multiplicador e invernadero propagador comercial:

- Anualmente para enfermedades transmitidas por vectores.
- Cada tres años para las enfermedades de transmisión mecánica.
- Cada 6-10 años para otras enfermedades (Lee, R.F. et al. 1998).

El objetivo del muestreo, es el de tomar plantas de los invernaderos para determinar si hay presencia de las enfermedades analizadas. Para ello, se debe muestrear el 100% de las plantas presentes dentro del invernadero fundador para multiplicación en forma individual. En el caso del invernadero propagador se recomienda hacer un muestreo del 10% de la población, tomando muestras al azar.

Cada vez que se realice el muestreo se debe determinar la presencia de posibles enfermedades, esto se hace observando la sintomatología de las mismas y por pruebas de indexación biológica o serológicas de laboratorio (OIRSA 2000). Si se determina que alguna planta está infectada, se deberá eliminar inmediatamente o aplicar una metodología de saneamiento según sea el caso, evitando de esta manera la diseminación de la enfermedad (Ver Anexos) (Camacho 2002) y (Lee, R.F. et al. 1998).

**Cuadro 7. Frecuencia de muestreo y pruebas a realizar según enfermedad, inicia a partir del segundo año**

<b>Enfermedad</b>	<b>Prueba</b>	<b>Frecuencia de muestreo</b>
<b>Tristeza de los cítricos (CTV)</b>	ELISA. Indexación biológica por medio de injertos	1 vez cada año.
<b>Psorosis (CPsV)</b>	PCR. Primers especiales. Indexación biológica por medio de injertos	Cada 3 años.
<b>Leprosis (CLV)</b>	PCR. Primers especiales	Cada 3 años
<b>Vein enation Woody Gall</b>	Indexación biológica por medio de injertos. Prueba rápida con kits ELISA para detectar Lutipovirus.	1 vez cada año.
<b>Exocortis (CEVd)</b>	RT-PCR. Electroforesis. Indexación biológica por medio de injertos.	Cada 6 años.
<b>Cachexia (CcaVd)</b>	RT-PCR. Electroforesis. Indexación biológica por medio de injertos	Cada 6 años.
<b>Clorosis variegada de los cítricos (CVC)</b> <i>Xylella fastidios.</i>	ELISA	Cada 6 años.

Fuente: Lee, R.F. et.al 1998 & OIRSA 2000

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Elaboración del documento y metodología de certificación:

El proyecto se realizó con el objetivo de diseñar la metodología para desarrollar el invernadero multiplicador y comercial certificados en: La Agropecuaria Popayán S.A., Aldea El Jocotillo, Municipio Villa Canales del departamento de Guatemala. Es una institución que se dedica en la venta de pilones de alta calidad y sanidad, al igual que a la producción de hortalizas bajo invernadero como tomate manzano, tomate creí, chile pimiento, pepino, entre otros. Así mismo, se han dedicado al crecimiento de plantas cítricas bajo invernadero y en campo, desde el año 2001. Disponen de invernadero multiplicadores, clónales y propagadores de cítricos; aunque no certificados libres de enfermedades. Por lo anterior, han tenido una serie de problemas y pérdidas económicas a causa del gran impacto de la enfermedad de woody-gall en plantas distribuidas por la empresa.

Según estudios realizados, se puede iniciar un invernadero certificado o programa de certificación a partir de un trabajo de selección de huertos existentes en el país o de material certificado introducido, siendo esta última la mas segura y menos costosa (OIRSA, 2000). Por ello, el material vegetal que dará origen al primer invernadero certificado en Guatemala, será importado de la colección de cítricos de la Universidad de Riverside, California. El material vegetal para reproducción asexual será importado en forma de baretas con yemas adecuadas para injertar al igual que se importarán semillas para sembrar patrones libres de enfermedades dentro del invernadero. Se importará de esa institución, ya que es un ente pionero en la rama, además de tener una destacada reputación internacional. Se recurre a importar el material vegetal, ya que según se ha visto y se menciona con anterioridad en el documento, en Guatemala hay presencia de todas las enfermedades definidas, y por ende sería sumamente riesgoso y costoso iniciar un invernadero partiendo de este material. Existen métodos de termoterapia y microinjertos para el saneamiento de material vegetal (Camacho 2002), el problema es que los mismos no se han desarrollado adecuadamente en Guatemala a la vez que son demasiado caros, lo cual elevaría significativamente la dificultad y el costo del invernadero certificado. Los mismos se describen en la sección de Anexos.

La estación experimental y colección de variedades de cítricos del estado de Riverside, California se estableció a inicios del Siglo XX. Al paso de los años la estación se convirtió en la fundación del campus de la Universidad de California, Riverside y se ha especializado en la investigación con especies de cítricos y sus afines. Hoy en día mantiene una colección pionera del germoplasma de los cítricos (más de 900 variedades), al igual que son los encargados del programa de certificación a nivel Estatal (Kahn 2004). El orden cronológico para el documento fue el siguiente:

- Recopilación de información sobre el tipo de invernaderos certificados en otros países. Con ello, se trato de adaptar la metodología y la estructura para la elaboración de un invernadero de este tipo según condiciones locales.

- Se recibió una capacitación para el manejo de invernaderos libre de enfermedades e invernaderos para detección de enfermedades en cítricos.
- Junto a la gerencia de Agropecuario Popayán, se definió el tipo de aislamiento, ubicación, estructura y diseño del invernadero. Esto es muy importante porque el invernadero donde se encuentra el invernadero certificado este cubierto y aislado en un 100% de otras plantaciones y del medio ambiente, para ello se debe utilizar una malla antiáfidos, con doble puerta, área donde se deben desinfectar las manos y los zapatos con compuestos de yodo o cloro (badenes de desinfección), herramientas propias, piletas de lavado, cuarto con cambio y ducha, y como mínimo tener piso de arena. Las plantas se dispondrán en hileras dobles formando bloques que agruparán las distintas variedades debidamente identificadas. Esto se hace para que las plantas se encuentren completamente protegidas de una posible contaminación de las enfermedades.
- Junto a la gerencia de Agropecuario Popayán, se definió que la semilla y el material vegetal para iniciar el invernadero certificado, va a provenir de la colección de germoplasma de cítricos de la Universidad de Riverside, California. Así mismo, se estableció que el invernadero de fundación o multiplicador va a contener aproximadamente 10 variedades dentro del mismo, con cuatro repeticiones (40 plantas). Estas variedades darán origen al material que se crecerá dentro del invernadero comercial o propagador. Las variedades se definirán posteriormente según lo deseado por la finca.

## **B. Metodología de muestreo, metodología de certificación, características locales del invernadero certificado:**

Se estableció la metodología y el porcentaje de muestreo de plantas, para la detección de las enfermedades. Como se observa, en la sección de antecedentes, el porcentaje de muestra varía entre el invernadero de fundación o multiplicador y el invernadero comercial o propagador. La metodología de muestreo propuesta se deberá iniciarse a partir del tercer año, después de haber construido el invernadero o después de haber sembrado las plantas patrón.

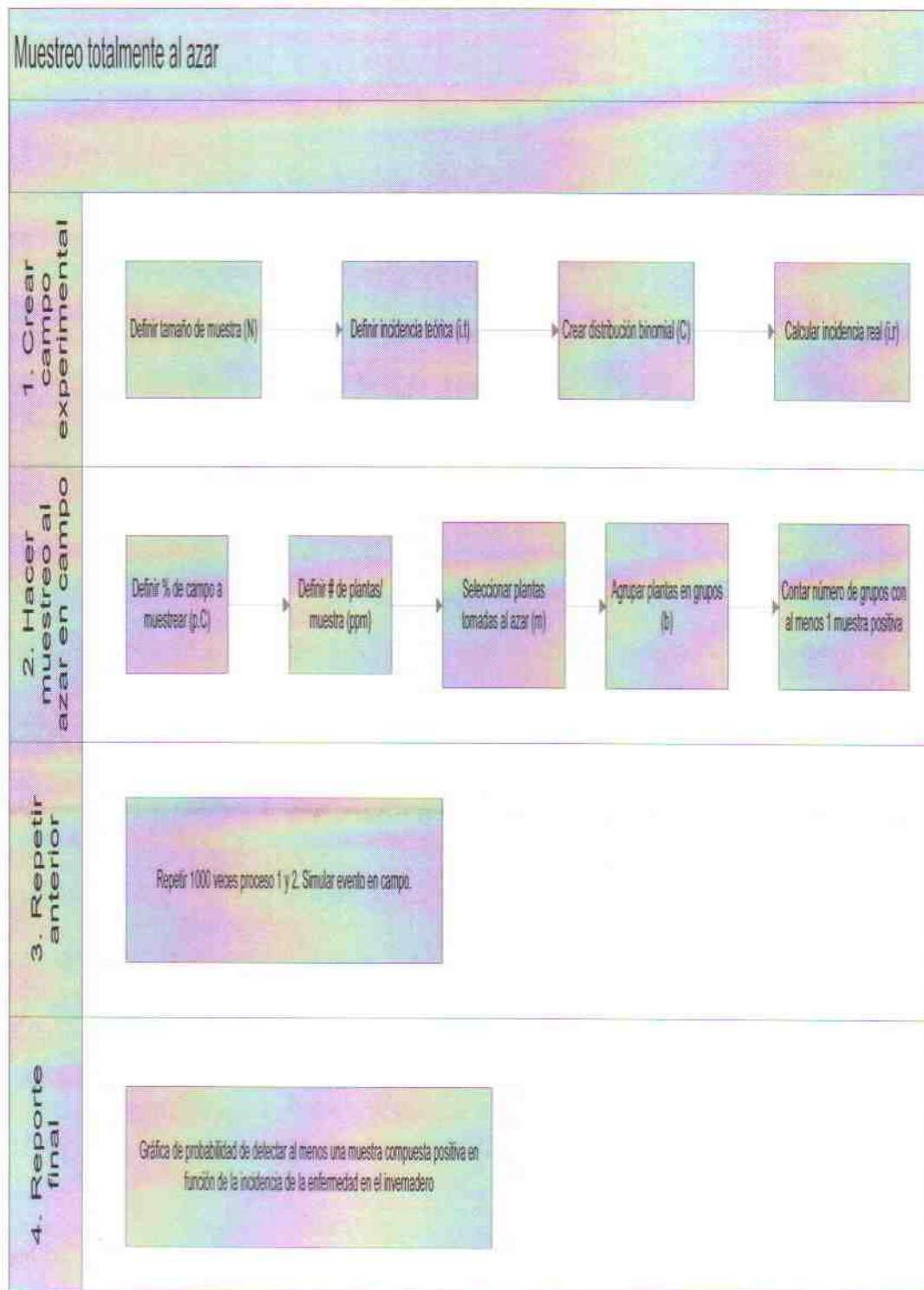
Al material vegetal importado inicial para iniciar el invernadero y a las semillas, no se le realizará ninguna prueba el primer año, ya que se tiene certeza y constancia de certificación de que es un material esta libre de las enfermedades de interés. El muestreo varía dependiendo del tipo de invernadero y la frecuencia varían según las características de cada enfermedad y cómo se transmite. Las pruebas que se deben realizar, su frecuencia y el porcentaje de plantas a muestrear, se adjuntan en el cuadro 7. El objetivo final de los anteriores es el controlar la presencia de enfermedades dentro del invernadero y, asegurar la sanidad de las plantas presentes en los invernaderos.

Para definir el método de muestreo que mejor se adapta, se consultó una publicación en donde se compararon diferentes métodos de muestreo en campo para la detección de la enfermedad viral en cítricos denominada Tristeza, en: T.R. Gottwald & G. Huges. 2000 «*A new method for Citrus Tristeza Virus Disease Assessment*» 77-87 pp. en: Proceeding of the 14th. Conference on International

organization of citrus virologist. 2000. J.V. Graca, R.F. Lee, R.K. Yokomi, Editors. IOCV. U.S.A. 435 pp. En este artículo, se plantea que en la mayoría de los casos; para detectar enfermedades dentro de un campo o invernadero, se recomienda hacer un muestreo al azar del 10% de la población de plantas presentes. Cabe mencionar que al igual que lo anterior, se plantean nuevas metodologías de muestreo,

justificando que podría existir un mejor método, para determinar la presencia y ausencia de un determinado patógeno en una plantación. En respuesta a ello, se compararon dos métodos de muestreo simulados para detectar la presencia de enfermedades únicamente dentro del invernadero propagador o comercial. Para lo anterior, con la colaboración del Licenciado Fredy Mejía se elaboró un algoritmo en el programa estadístico gratuito R (Copyright 2004, The R Foundation for Statistical Computing Version 2.0.1 (2004-11-15)) (Ver anexos: Funciones de algoritmo en programa R). Los dos métodos comparados por simulación, fueron el método de muestreo al azar y el método de muestreo sistemático. La metodología para crear los algoritmos utilizados en cada caso, se resume a continuación:

**Ilustración 12. Descripción del algoritmo de simulación de muestreo al azar**



**Ilustración 13. Ejemplo gráfico del algoritmo realizado. Simulación del muestreo al azar (Muestra del 20 %)**

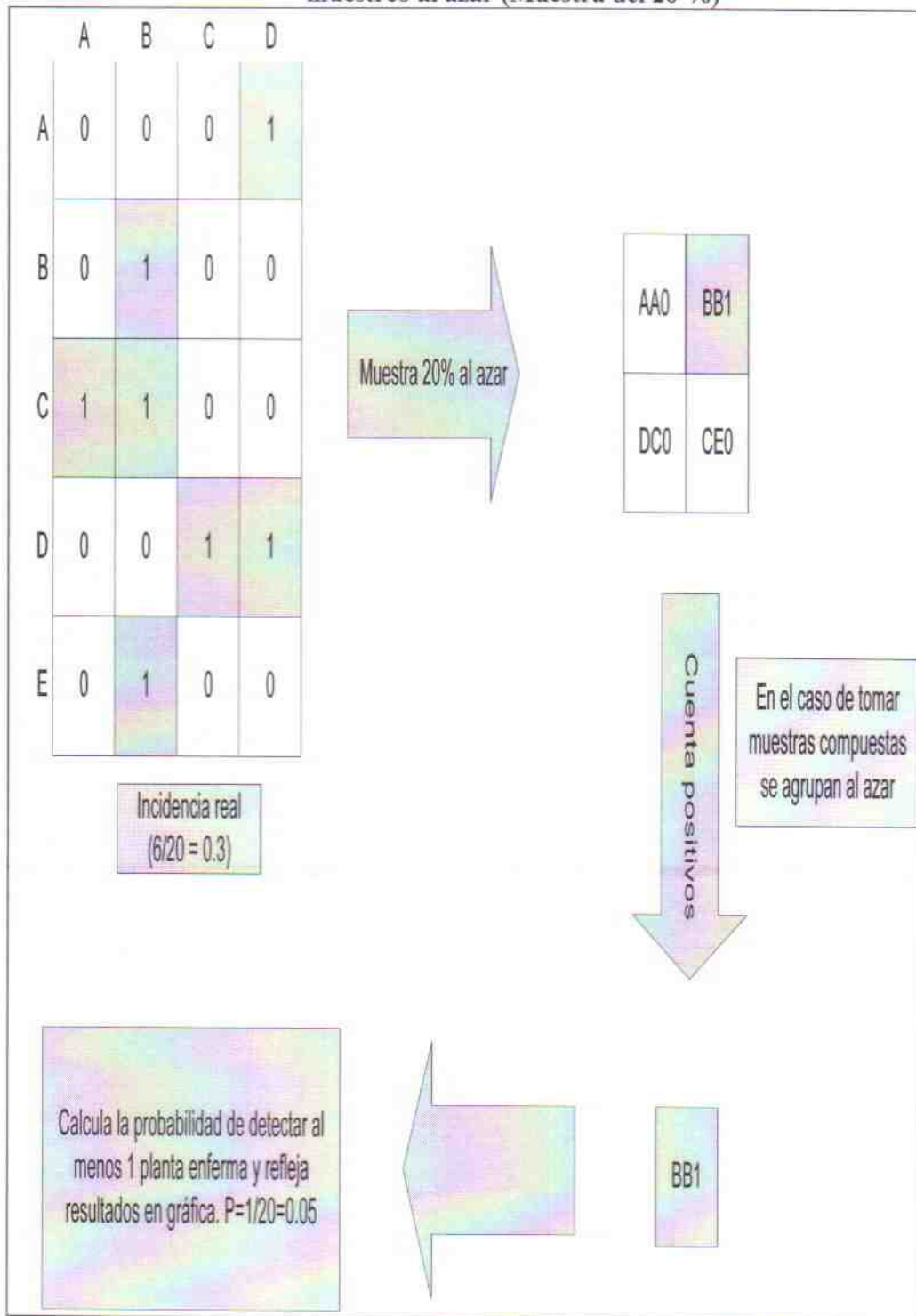
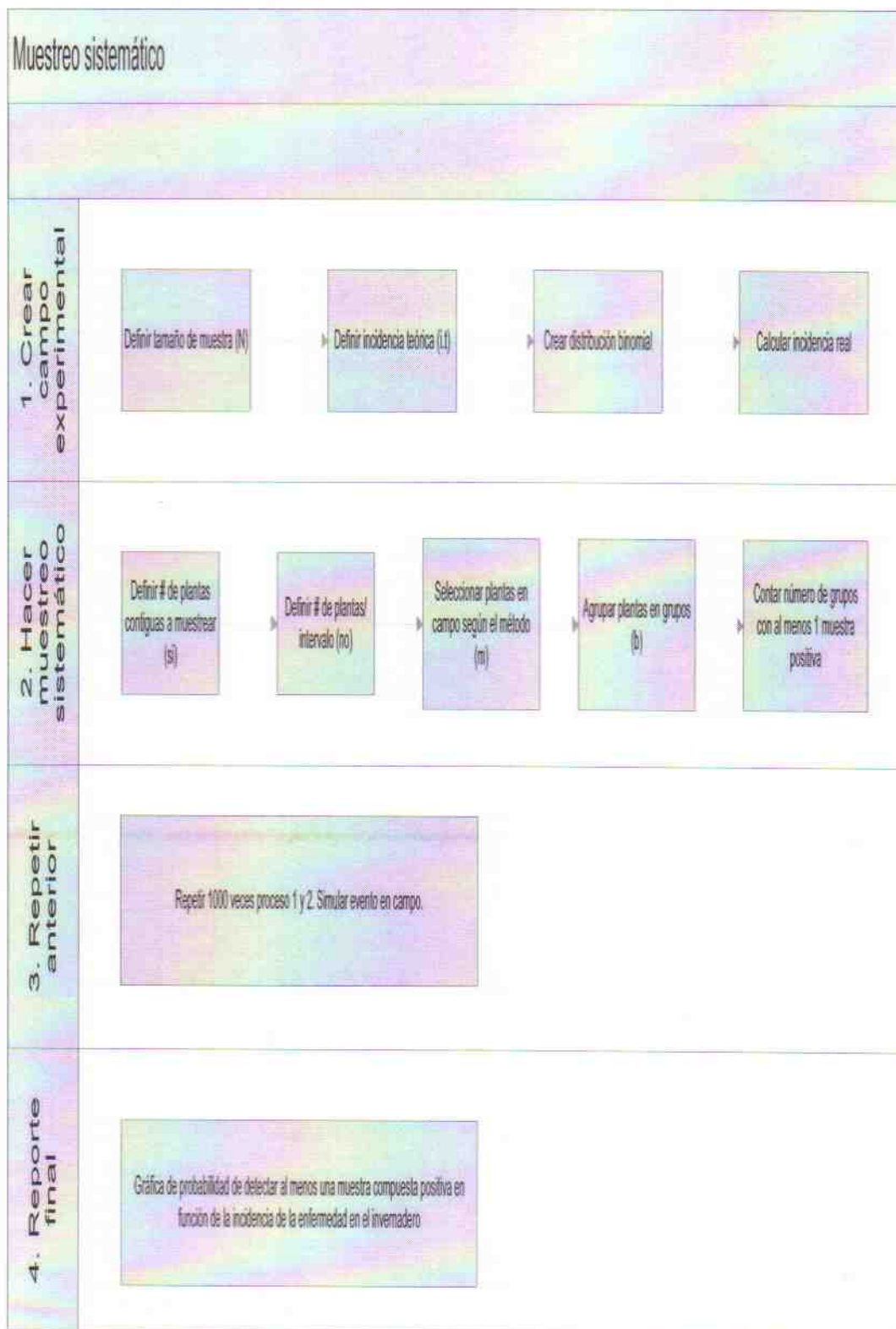
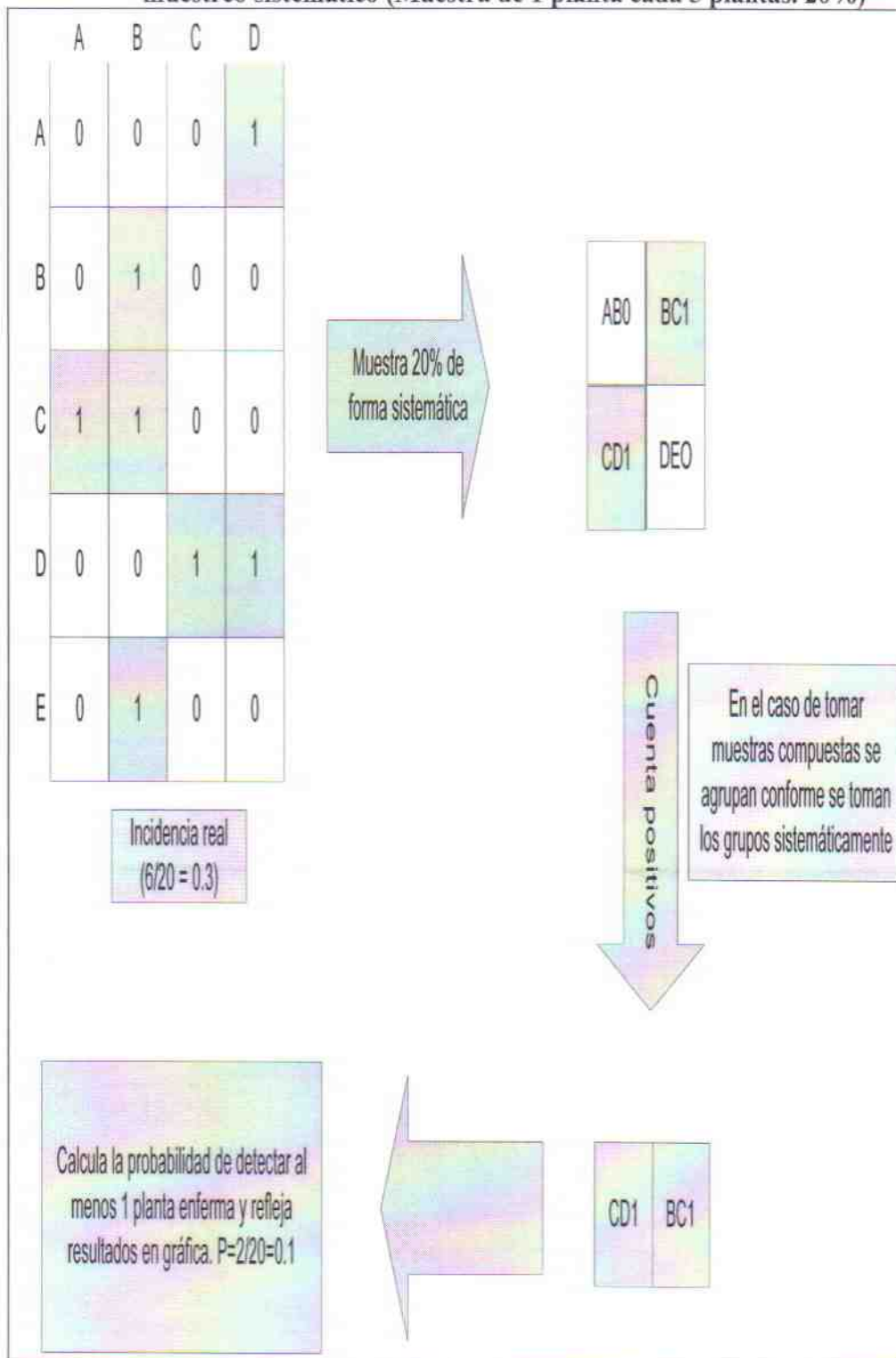


Ilustración 14. Descripción del algoritmo del muestreo sistemático



**Ilustración 15. Ejemplo gráfico del algoritmo realizado. Simulación del muestreo sistemático (Muestra de 1 planta cada 5 plantas. 20%)**



- Descripción de la metodología de las pruebas a utilizar en laboratorio e invernadero de indexación biológica en plantas indicadoras para la detección de la presencia de los virus y viroides. Se hizo de acuerdo a revisiones bibliográficas y conocimiento obtenido en capacitaciones personal en el "National Clonal Germoplasm Repository for citrus and dates", en la Universidad de Riverside California, U.S.A. durante el año 2004.
- Descripción de las características, manejo, actividades y cuidados del invernadero certificado y certificador de indexación en Guatemala. En ello se describen los pasos que se llevan a cabo para la certificación de un invernadero multiplicado y comercial. Se hizo en base a revisiones bibliográficas y conocimiento obtenido en capacitaciones.

### **C. Descripción de la empresa, FODA, análisis de factibilidad y costo del proyecto a mediano plazo (7 años):**

- Descripción de la empresa donde se realizará el proyecto, el cual contiene los siguiente:
  - a. Análisis FODA (Fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas) de la empresa Agropecuaria Popayán S.A., para el desarrollo de un proyecto de este tipo. Para ello, se realizó un estudio a nivel exploratorio y descriptivo. Esto se hizo haciendo una observación directa de las condiciones de la empresa y según reuniones entabladas con la gerencia de la misma.
  - Análisis de factibilidad y costos a mediano plazo (siete años) del proyecto. En el mismo, se determinó la potencialidad del proyecto y si la inversión es viable. Con ello también se determina el posible impacto financiero. Este análisis es de suma importancia y de especial interés para la empresa donde se pretende realizar el proyecto, ya que determina lineamientos para determinar si existe la posibilidad de invertir en un proyecto de este tipo. Los índices y factores calculados fueron los siguientes:
    - a. Cálculo de ingresos y egresos: Los ingresos se calcularon, según la venta de plantas certificadas, a partir del invernadero propagador certificado. Para lo anterior, se asumió que se venderán el 100% de las plantas producidas. Para su determinación se utilizaron datos proporcionados por la Agropecuaria Popayán S.A., sobre la producción de plantas (rendimiento de yemas) por árbol, calculando así el ingreso neto por la venta de plantas certificadas. Los egresos de mantenimiento, manejo y depreciación (Costos directos e indirectos) se calcularon según datos proporcionados por la misma empresa y, el costo de las pruebas de laboratorio por planta y para certificar los invernaderos (Costo directo) se calculó en base a precios especificados por el Departamento de protección vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala. Todo lo anterior se presentó para un plazo de siete años, en quetzales y dólares:
    - b. Análisis de flujo de efectivo: Se presenta una gráfica y un cuadro en los cuales se especifican los costos e ingresos del establecimiento y mantenimiento del proyecto a un plazo de siete años, en quetzales y dólares.
    - c. Valor actual neto (VAN): Representa el valor presente (VP) de los flujos salientes de caja menos la cantidad de la inversión inicial (I). El valor presente de flujo de caja futuro es calculado utilizando el costo de capital como un factor de descuento. El propósito de este factor de descuento es convertir el

valor futuro del dinero en valor presente y se expresa como  $1 +$  la tasa de interés ( $i$ ). En este caso se expreso el factor de descuento como 1.1, tomando una tasa de interés del 10%.

$$VAN = \sum_{\tau=1}^{\tau=n} \frac{B_{\tau} - C_{\tau}}{(1+i)^{\tau}}$$

a. Periodo de devolución (P.D.): El tiempo requerido para recuperar el monto inicial de una inversión de capital. Este método calcula la cantidad de tiempo que se tomaría para lograr un flujo de caja positivo igual a la inversión total.

$$P.D. = [(\text{Costo} - \text{Ganancias}) / \text{Total de ingresos}] * \text{Tiempo}$$

b. Beneficio/Costo (B/C): Se comparan los costos y beneficios de las diferentes decisiones a tomar. Esto puede ser una guía necesaria para tomar una buena decisión. Nos indica el retorno de capital por cada unidad invertida.

$$B/C = \text{Sumatoria de beneficios} / \text{sumatoria de costos}$$

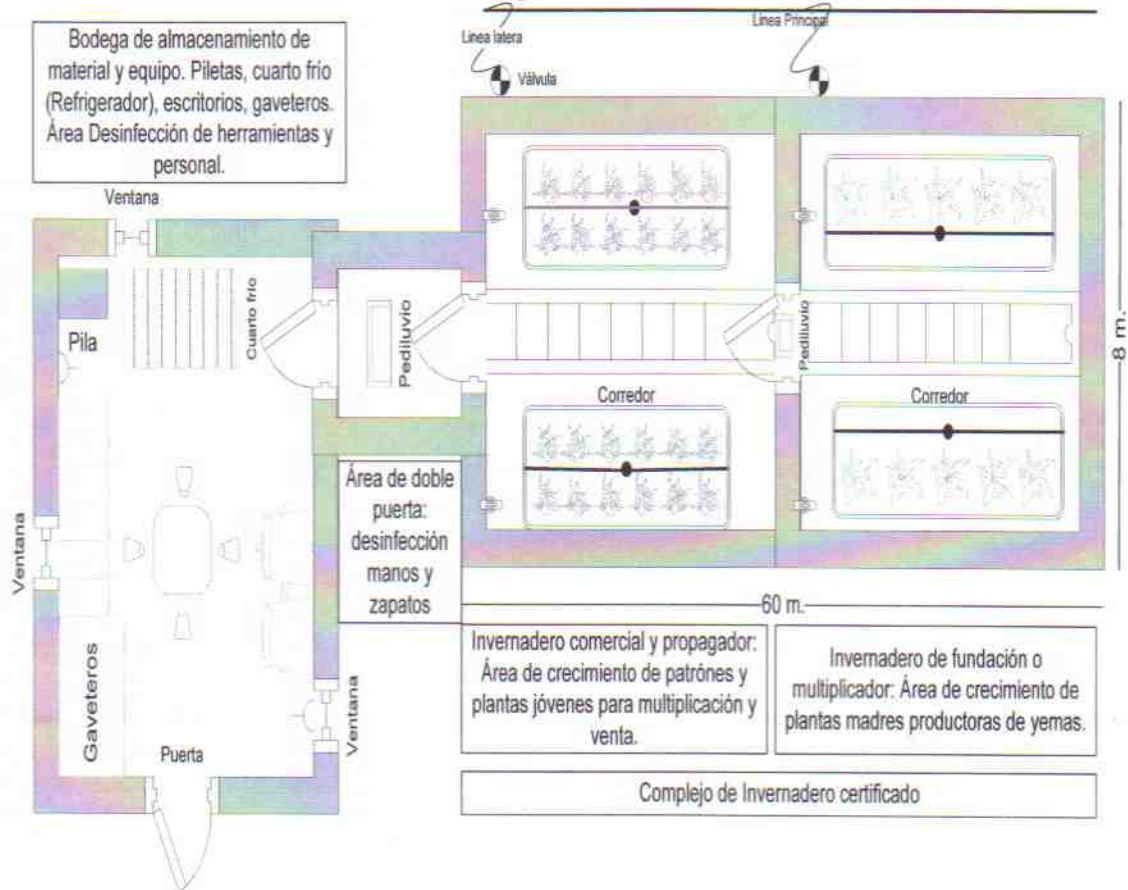
f. Tasa interna de retorno (TIR): Nos indica el porcentaje de interés que nos devengará la inversión.

$$TIR = \sum_{\tau=1}^{\tau=n} \frac{B_{\tau} - C_{\tau}}{(1+i)^{\tau}} = 0$$

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Descripción de las características locales del invernadero multiplicador certificado e invernadero comercial certificado, ubicado en la Agropecuaria POPOYÁN:

Ilustración 16. Esquema del invernadero certificado



#### 1. Bodega de almacenamiento:

Es un área que se debe construir cerca del invernadero o de preferencia frente a él, como se especifica en la Ilustración 17. Dentro de la misma se almacena todo el equipo (fumigadoras, mangueras, tijeras, machetes, cuchillos, afiladoras, regadores, etc.), materiales (rafia, bolsas, macetas, cubetas, etc.) y suministros (fertilizantes, fungicidas, herbicidas, desinfectantes, jabón etc.) que se utilizarán para el manejo y crecimiento de plantas dentro del invernadero.

Debe ser un área con iluminación y aireación (ventanas alrededor) el cual contenga contenedores y gaveteros adecuados para almacenar lo especificado con anterioridad. Aunque no es indispensable, de

preferencia debe tener un espacio con un escritorio, mesa o sillas donde se puedan realizar reuniones pequeñas, cálculos y planificación.

Dentro de la bodega debe existir un área de desinfección en la cual se disponga de un lavadero, lavamanos o pila. Esto sirve para limpiar herramientas y equipo que se utilizará dentro del invernadero. Cada vez que se utilizan las herramientas se deben limpiar completamente y desinfectar con una solución de hipoclorito de sodio al 5% o una solución de vanodine (yodo) al 2%. Así mismo, se debe disponer de un área de duchas y sanitarios, donde las personas que trabajarán dentro de las instalaciones se puedan desinfectar y bañar, cada vez que se salgan y tengan que ingresar dentro del invernadero.

#### 2. Área de doble puerta:

Ésta es un área muy importante, se utiliza para la desinfección de zapatos y manos. Esto se hace cada vez que cualquier individuo (empleado o visitante) ingrese al invernadero. Para la desinfección de los zapatos, se puede utilizar una solución de hipoclorito de sodio al 5% colocada dentro de un pediluvio (cubeta o cualquier depósito con la solución) al igual que para las manos, únicamente que en éste caso la solución se coloca dentro de aspersores de mano o dentro botellas plásticas. Para la desinfección de las manos se puede utilizar una solución de Vanodine al 2%-5% (yodo).

#### 3. Invernadero certificado:

Área dividida en dos por una puerta corrediza intermedia. Lugar donde se crecen patrones y variedades de interés para multiplicación de yemas y venta de plantas certificadas libres de enfermedades.

#### 4. Invernadero comercial y propagador:

Área donde se siembran y se crecen patrones y plantas jóvenes para la venta. Además, se reproducen una gran cantidad de baretas con yemas para injerto a partir de estos árboles. Los semilleros se pueden realizar en bandejas o areneros. En este caso la siembra de plantas de cítricos, se puede realizar en bolsas negras de polietileno de 12 de ancho X 48 de largo X 2 mm. De grosor (3840 ml. = 3 litros con 840 ml). Se coloca en la primera parte, ya que será el área de mayor movimiento de personal y, donde se deben realizar mayores cuidados de poda, manejo, siembra, trasplante y demás. En el mismo se tienen variedades de exclusivas de interés comercial actual y se pueden tener varios árboles por variedad, según sea necesario. El número de plantas presente en el invernadero y el total de plantas certificadas para la venta que se pueden producir anualmente, la ganancia neta por planta y el ingreso por la venta del total de las plantas, se describe en el cuadro 8, el cual sirvió como guía para desarrollar el flujo de caja del proyecto.

**Cuadro 8. Estimado del número de plantas producidas para la venta al año por el invernadero propagador certificado, ganancia neta por planta e ingresos totales por venta**

Especificación	Año													
	1		2		3		4		5		6		7	
Total de plantas en invernadero propagador	0	0	0	0	350	800	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Número de plantas producidas*	0	0	0	0	5950	13600	17000	17000	17000	17000	17000	17000	17000	17000
Moneda	Q.	\$.	Q.	S.	Q.	Q.	\$.	Q.	S.	Q.	Q.	\$.	Q.	\$.
Ganancia neta por planta	12.0	1.5	12.2	1.5	12.5	12.7	1.6	13.0	1.6	13.2	1.7	13.5	1.7	1.7
Ingresos	0	0	0	0	74285	173189	21649	220816	27602	225232	28154	229737	28717	28717

Nota: Se asumió un tipo de cambio de 8Q-1\$.  
 \*Total de plantas a la venta/año.

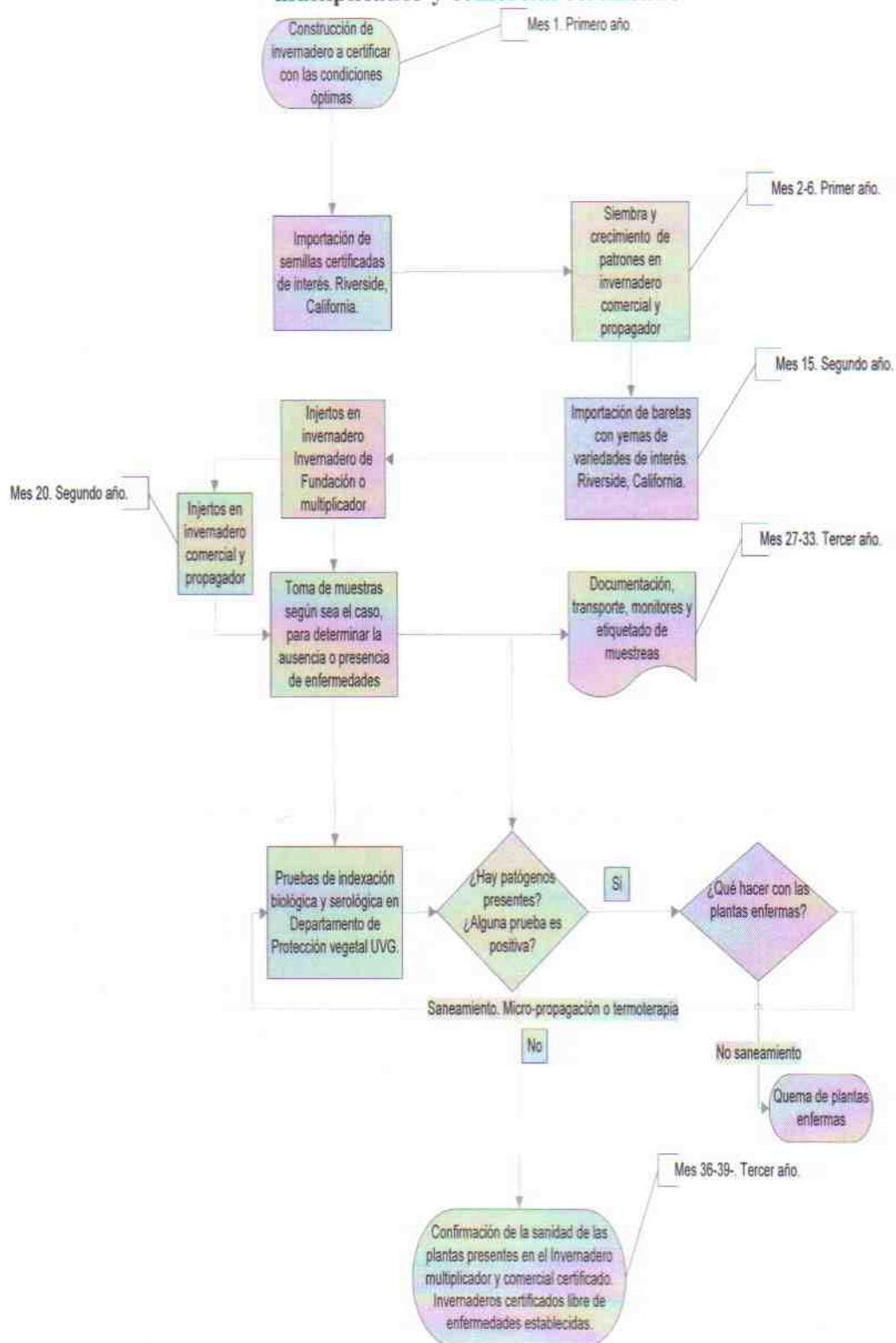
5. Invernadero de fundación o multiplicador:

Área donde se crecen las plantas madre donde se obtienen yemas para injerto. Esto puede dar origen a un jardín clonal. Las plantas se pueden sembrar en las bolsas antes mencionadas o, si se desean mantener árboles de mayor edad, se pueden transplantar en macetas de 20 litros. En el mismo se tienen 10 variedades de diferente tipo y se deben sembrar únicamente de dos a cuatro repeticiones por variedad de interés. En total el invernadero tendrá un número de 40 plantas, las cuales darán origen a todas las plantas presentes en el invernadero comercial propagador.

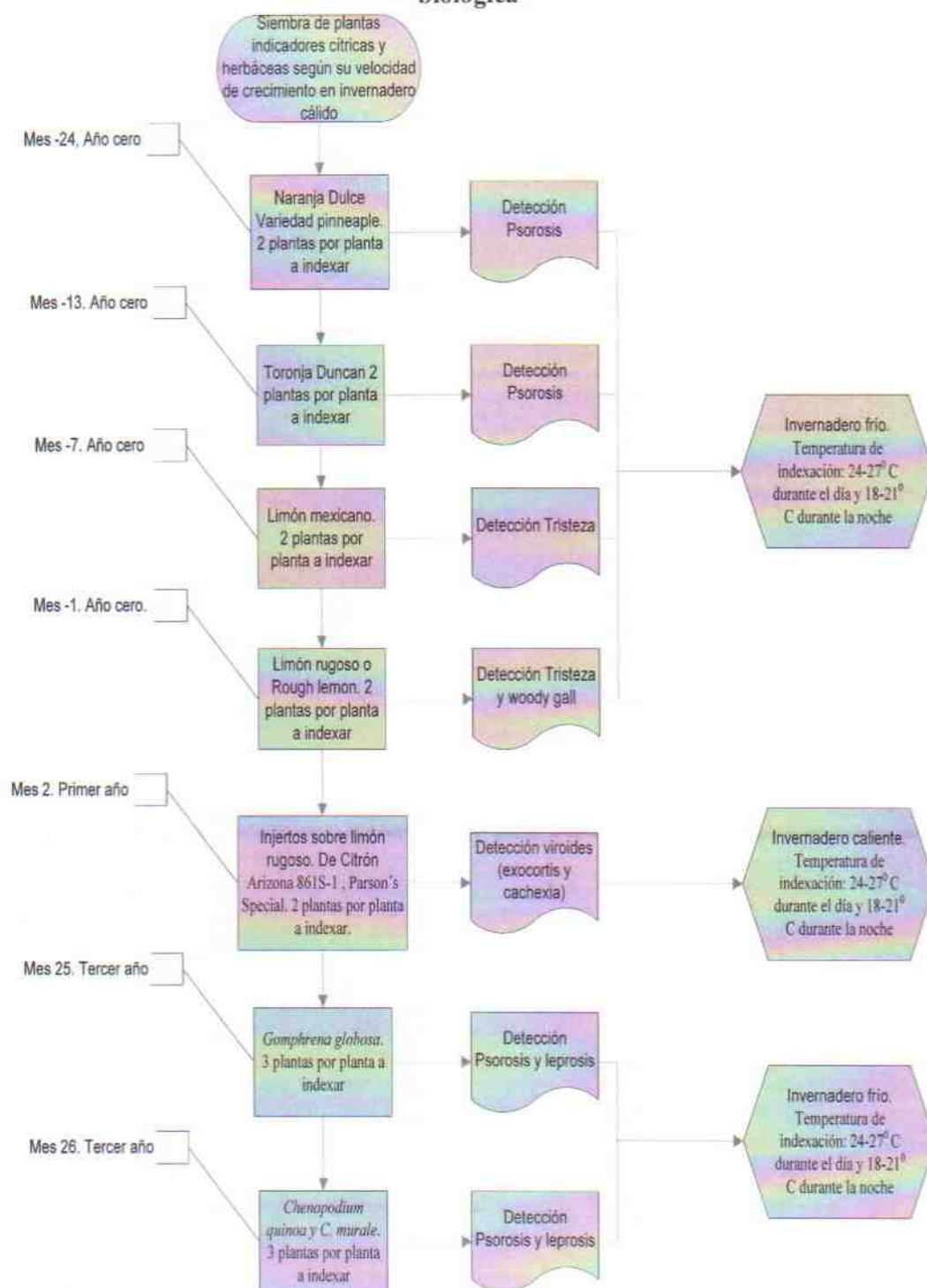
### **A. Metodología para la certificación del invernadero multiplicador y comercial libre de enfermedades propuestas:**

En la siguiente sección se adjuntan dos ilustraciones, en ellas se describen las actividades que se deberán realizar para la certificación final del invernadero comercial y multiplicador. Con ello se podrá confirmar y asegurar que las plantas ahí presentes, estén libres de las enfermedades estipuladas. Así mismo, se adjunta la lista y el número de plantas cítricas y herbáceas que se deberán sembrar dentro del invernadero de indexación, por muestra a inocular, en orden cronológico, según su velocidad de crecimiento. Esto se hace para que las plantas presenten la edad óptima de indexación y se puedan inocular al mismo tiempo, cuando se tengan que muestrear los invernaderos a certificar. A la vez, sirve como una guía para la calendarización de actividades dentro del invernadero de indexación certificador (Departamento de protección vegetal, Universidad del Valle de Guatemala). La época de siembra de las plantas indicadoras, en la ilustración 19 se fijaron en base a la fecha de inoculación, determinada en la ilustración 18 (Mes 27 después de la construcción del invernadero). Cabe mencionar que este procedimiento y las actividades mencionadas a continuación, se deberán repetir cada vez que se tengan que hacer las pruebas para confirmar la sanidad de las plantas ahí presentes (Vid. Cuadros 7 y 9).

**Ilustración 17. Diagrama de flujo de actividades a ejecutar para el desarrollo y confirmación de la sanidad de plantas en invernadero multiplicador y comercial certificado**



**Ilustración 18. Cronograma de siembra y número de plantas cítricas y herbáceas a inocular por muestra. Guía para invernadero de indexación biológica**



Nota: Las fechas de siembra se fijaron en base a la fecha de inoculación. Mes 27 después de la construcción del invernadero. Vid. Ilustración 13. Números negativos indican meses previos a la construcción final del invernadero certificado.

**Cuadro 9. Pruebas que se deben realizar para confirmar la sanidad de plantas presentes en invernadero multiplicador y comercial certificados. El primer año indica la construcción del invernadero o siembra de plantas. Año 2005**

Enfermedad	Año						
	1	2	3	4	5	6	7
Tristeza	0	0	1	1	1	1	1
Vein ination	0	0	1	1	1	1	1
Leprosis	0	0	1	1	1	1	1
Psorosis	0	0	1	0	0	0	1
Exocortis	0	0	1	0	0	0	1
Cachexia	0	0	1	0	0	0	1
Xilella fastidiosa	0	0	1	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>

1: Si se realiza la prueba.

0: No se realiza la prueba.

1. Porcentaje de muestras a tomar según el invernadero:

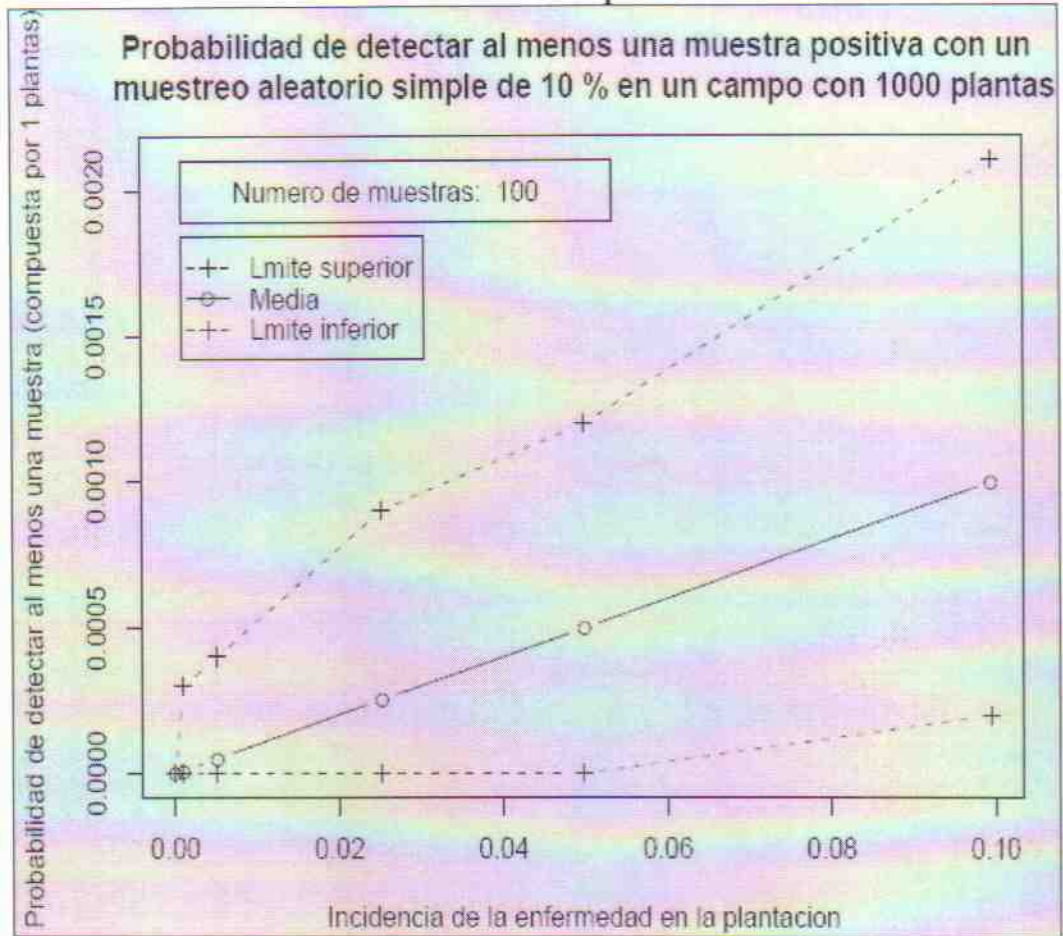
a. Invernadero de fundación o multiplicador:

Por ser el invernadero de fundación, donde se origina el material para propagación y venta de yemas certificadas libres de enfermedades; se debe asegurar en un 100% que estén libres de los patógenos mencionados. Por ello, para confirmar la sanidad de este invernadero se debe muestrear el 100% de las plantas presentes en el mismo. Hay que tomar en cuenta que se debe Repetir el mismo procedimiento cada vez que sea requerido (Vid. Cuadro 8).

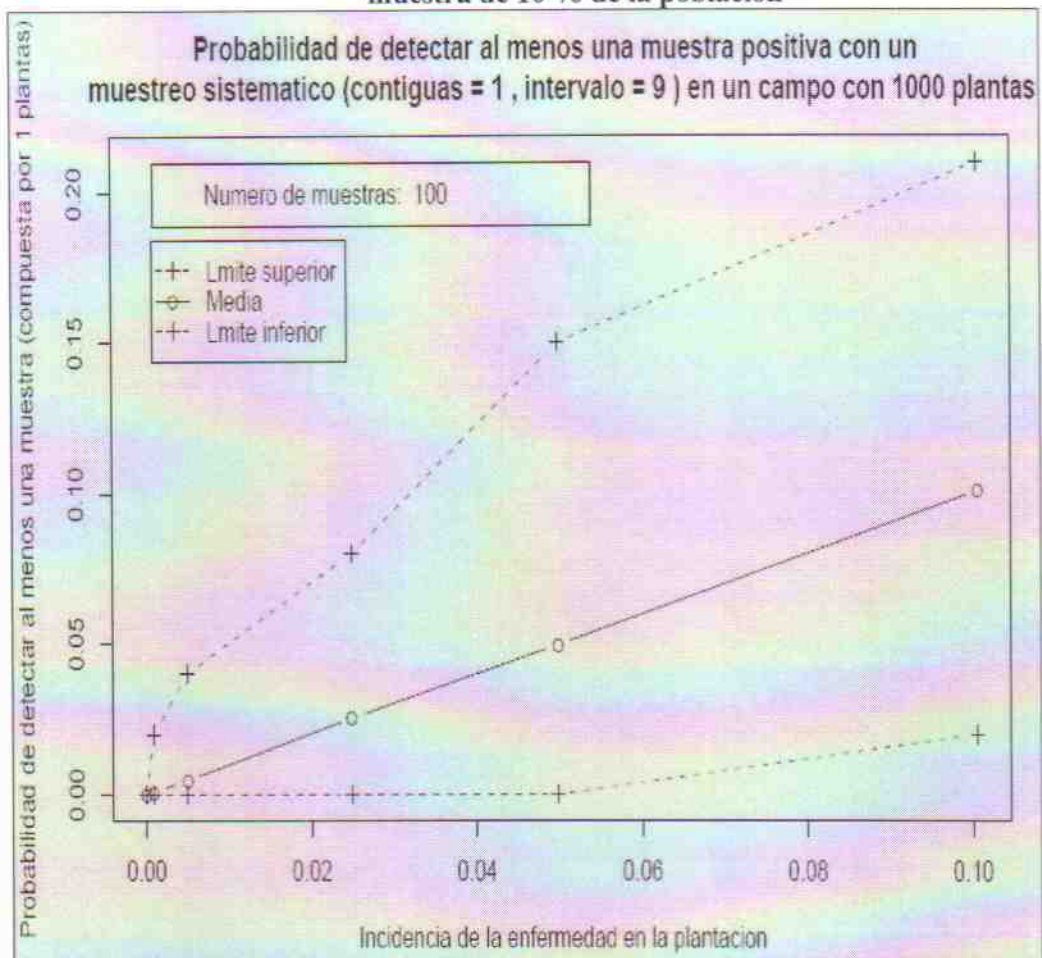
b. Invernadero comercial o propagador:

Para confirmar la sanidad de este invernadero no se debe muestrear el 100% de las plantas presentes en el mismo. Esto elevaría ilógicamente los costos, a la vez que no es necesario, ya que las yemas para reproducción dentro de este invernadero, provienen del invernadero multiplicador certificado. Para ello se tomó como referencia los siguientes métodos de muestreo analizados a continuación (Vid. Gráficas 1 a 4), determinando así el método de muestreo más factible en este caso. Lo que sí se debe realizar de la misma manera que el invernadero de fundación o multiplicador, es la repetición del mismo procedimiento cada vez que sea requerido (especificado posteriormente en el Cuadro 8).

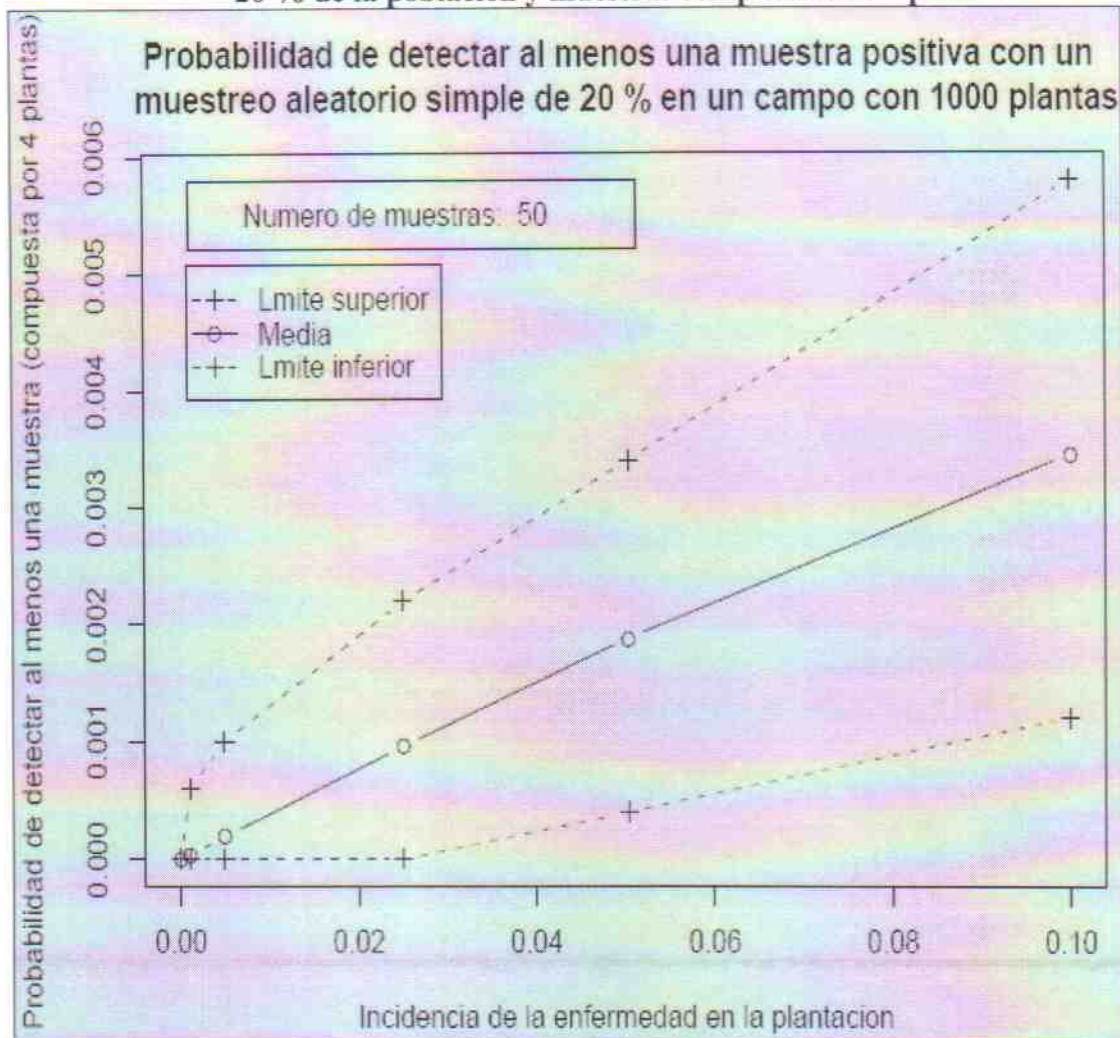
Gráfica 1. Método simulado de muestreo al azar, tomando una muestra de 10 % de la población



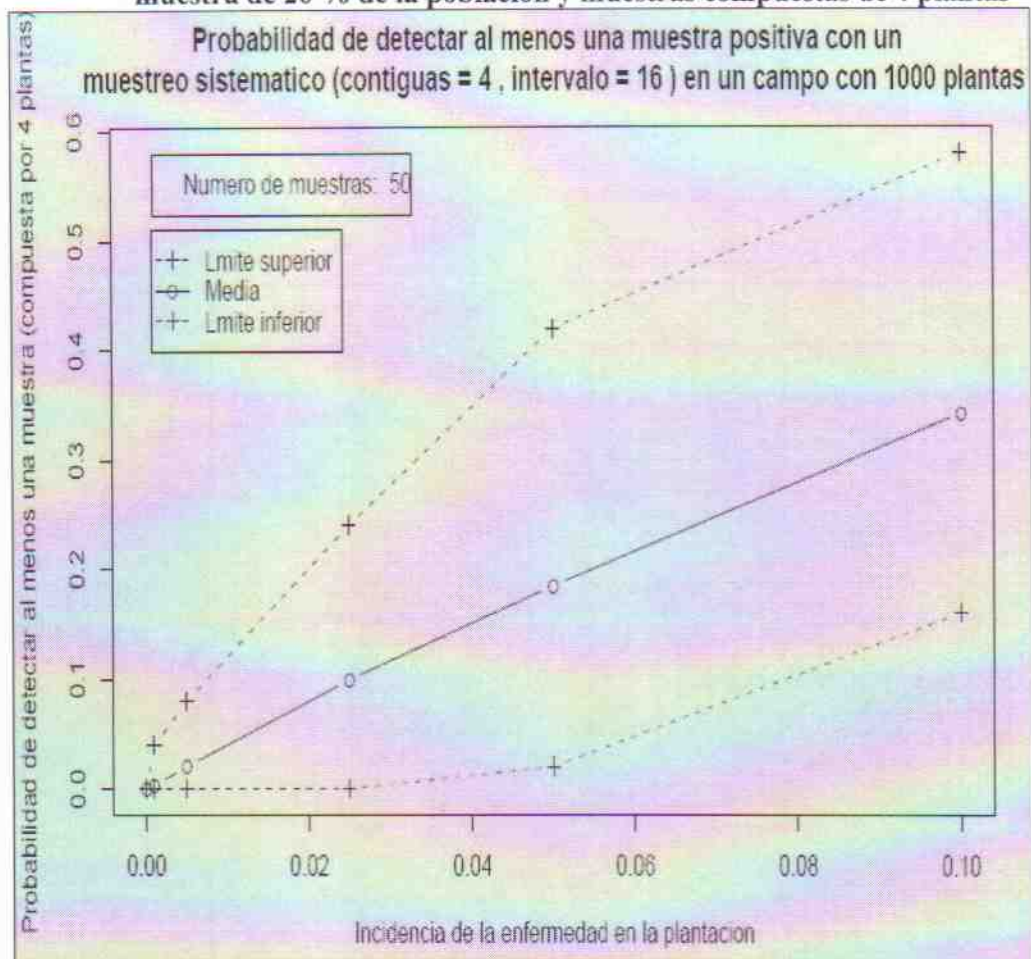
**Gráfica 2. Método simulado de muestreo sistemático, tomando una muestra de 10 % de la población**



Gráfica 3. Método simulado de muestreo al azar, tomando una muestra de 20 % de la población y muestras compuestas de 4 plantas



**Gráfica 4. Método simulado de muestreo sistemático, tomando una muestra de 20 % de la población y muestras compuestas de 4 plantas**



Las gráficas anteriores son el resultado de simulaciones de dos métodos distintos de muestreo, para detectar la presencia de una enfermedad dentro del invernadero comercial o propagador en función de la incidencia de dicha enfermedad. Para desarrollar las gráficas se utilizó el algoritmo, descrito en la sección de metodología. Con el objetivo de obtener datos más confiables estimar un intervalo de confianza, el proceso especificado se repitió mil veces. Esto es como repetir un experimento controlado en campo mil veces. Por ello, a pesar de ser simulacros de procesos realizados en un software estadístico, y no de datos tomados de la realidad, tienen un valor interpretativo. Cabe mencionar que se consideraron todas las variables posibles (campo con distribución binomial, número de plantas, incidencias esperadas muy bajas, ausencia de factores que alteren la distribución totalmente al azar de las plantas infectadas en el campo), para reflejar el comportamiento de un muestreo natural.

La abscisa (Eje X), es la incidencia real de una enfermedad en la plantación simulada; la ordenada (Eje Y), la probabilidad de detectar al menos una muestra positiva con un determinado muestreo (Especificado en el título). Entonces, con ello se puede representar y determinar la probabilidad de detectar al menos una muestra positiva en función con su incidencia en campo. Las gráficas están compuestas por tres líneas. La línea media continua separada por un círculo (°), refleja el valor promedio (media) de los valores obtenidos con mil simulaciones; la línea superior y la línea inferior ambas punteadas y separadas por un signo positivo (+), indican los intervalos máximo y

mínimo absolutos, respectivamente. Estos límites no se definieron como intervalos de confianza, ya que lo que se desea identificar es el riesgo real de que pueda haber presencia de la enfermedad o no.

Estas gráficas permiten determinar qué método de muestreo es el más adecuado para determinar la presencia de un patógeno dentro de un invernadero certificado, tomando en cuenta que en teoría la incidencia de cualquier enfermedad debería ser 0% a 1% entre la población (Por ello se definió el rango de 0% a 10% de incidencia). Lo anterior se puede asumir porque se sabe con anticipación de dónde provienen las plantas, las yemas de injerto y el tipo de manejo y cuidados altamente estrictos, los cuales evitan la entrada de cualquier enfermedad al invernadero.

Es importante mencionar que los métodos de muestreo planteados anteriormente, presentan dos limitaciones principales. La primera es que únicamente se pueden aplicar en lugares donde no hay factores directos que afecten la distribución natural del patógeno en la plantación. Entre estos factores se pueden mencionar las malezas, viento, presencia de vectores, cambios de pendiente extremos, entre otros; los anteriores se compensan y se mantienen en forma controlada, ya que las plantas se encontrarán dentro de un invernadero. El segundo factor es que la creación del campo experimental, para simular la presencia de una enfermedad, se desarrolló a partir de una distribución binomial (aplicable a experimentos en los que puede haber éxito o fracaso), entonces solo hay dos posibles respuestas, la enfermedad está presente o ausente. El modelo indica si las plantas individuales dentro del invernadero están infectadas o no. Así mismo, no se puede aplicar para determinar la presencia de más de dos enfermedades a la vez en una misma muestra, únicamente se puede analizar caso por caso. Debido a que la incidencia de todas las enfermedades debería ser baja, la probabilidad de una planta tenga dos enfermedades por factores al azar es baja.

Al observar la Gráfica 1 y compararla con la Gráfica 2, son bastante similares. Cabe mencionar, que al analizar la escala de la ordenada, los valores varían significativamente, por lo que únicamente son similares en forma. A simple vista, los valores promedio obtenidos por el muestreo sistemático (Gráfica 2) son cien veces más sensitivo que en el caso del muestreo al azar (Gráfica 1). Esto se puede ver con un simple ejemplo:

Método de muestreo	Incidencia de la enfermedad	Probabilidad de detección
Muestreo al azar (Gráfica 1)	0.05	0.0005
Muestro sistemático (Gráfica 2)	0.05	0.05

Diferencia de sensibilidad = P.d. m. sistemático/P.d. m. al azar

Diferencia de sensibilidad =  $0.05/0.0005 = 100$  veces  
( $1 \times 10^2$ ).

Esto sugiere que la probabilidad de detectar al menos una muestra positiva con el método de muestreo sistemático, es cien veces mayor en comparación con el muestreo simple al azar. Por ello, en este caso se puede inferir, que el mejor método para detectar la presencia de una enfermedad dentro del invernadero certificado, sería el método de muestro sistemático.

Tomando en cuenta lo anterior y con el objetivo de reducir costos y hacer más eficiente la detección de la presencia de una enfermedad a bajas incidencias en el invernadero (determinar qué método de muestreo es el más adecuado), se recurrió a hacer una serie de pruebas, tomando muestras compuestas o variando el porcentaje de muestras a tomar. Como se puede observar, la Gráfica 3 y 4

reflejan dos métodos, en los cuales su límite de detección es dos veces mayor en ambos casos, en comparación con los métodos mencionados anteriormente. Además, se redujo el número de muestras y los costos en un 50%, pero se aumentó en un 10% el porcentaje de plantas muestreadas. Tomando muestras compuestas, con un mayor número de plantas, en teoría aumenta la probabilidad de detectar una enfermedad en el invernadero. Sin embargo se debe considerar que las pruebas de laboratorio pierden confiabilidad si las muestras tienen títulos muy bajos del patógeno. Por tanto, mientras que con una muestra compuesta más grande aumenta la probabilidad de colectar una planta infectada, se reduce la probabilidad de detectarla en el laboratorio.

Después de analizar las gráficas anteriores, se puede concluir que el mejor método para detectar la presencia de al menos una muestra positiva en el invernadero de multiplicación certificado; es el método sistemático simulado en la Gráfica 4. En este caso, es el método de muestreo sistemático tomando un 20% de la población con muestras compuestas de 4 plantas e intervalos de toma de muestras de 16 plantas. Esto significa que para certificar el invernadero comercial o propagador y determinar la presencia de alguna enfermedad, se deberán tomar 50 muestras compuestas por cuatro plantas, por cada mil plantas presentes en el mismo.

### **C. Descripción y análisis FODA de la Empresa «Agropecuaria Popayán»:**

- Nombre de la Empresa: Agropecuaria Popayán S.A.
- Ubicación: Aldea El Jocotillo, municipio de Villa Canales, Departamento de Guatemala.
- Características de la empresa: Empresa pionera con especialidad en la venta de pilones para hortalizas en Guatemala. Es la única empresa con experiencia en la siembra de plantas cítricas en invernadero, empezando a producir bajo estas condiciones a partir del año 2001. En este momento, están anuentes a desarrollar un invernadero certificado libre de las enfermedades antes mencionadas. La razón porque se desea hacer el invernadero es por que se tuvo una serie de pérdidas altas aun no cuantificable, a causa de un problema reciente donde vendieron plantas no certificadas enfermas con el virus denominado Woody-gall, teniendo que resembrar plantaciones propias con plantas sanas libres de enfermedades.

**Ilustración 19. Análisis FODA (Fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas) de la “Empresa Popayán”, respecto al desarrollo del invernadero certificado**

Fortalezas	Debilidades
<p>Se dispone de infraestructura, condiciones y área óptima para el desarrollo del proyecto.</p> <p>Se tiene conocimiento de manejo del cultivo de plantas cítricas en condiciones forzadas de invernadero.</p> <p>Área donde se ubicará el invernadero es una zona libre de siembra de plantaciones comerciales de cítricos.</p> <p>Se ha iniciado la capacitación del personal, para el manejo adecuado del invernadero certificado.</p> <p>Empresa reconocida por la venta de pilones de alta calidad en Guatemala.</p> <p>Primera empresa que desarrolla un proyecto de este tipo en el país.</p>	<p>Aun no se ha trabajado con el riguroso control y manejo de invernaderos para el desarrollo de plantas cítricas libres de enfermedades.</p> <p>Anteriormente se tuvieron problemas con la incidencia del virus Woody-gall de cítricos en campo. Esto le repercutió gravemente en pérdidas económicas, debido a que se tuvieron que resembrar plantaciones propias de nuevo.</p>
Oportunidades	Amenazas
<p>A partir de septiembre 2004, la Unidad de Normas y regulaciones del MAGA, dan a conocer los Acuerdos Ministeriales No. 712-2002 y 713-2002. Acuerdos que rigen y prohíben la venta de material vegetal no certificado.</p> <p>Tendencia a la diversificación agrícola Nacional, donde se ha incentivado la siembra de plantas cítricas.</p> <p>PINFRUTA: Incentivo fiscal para la siembra de árboles frutales, el cual inicia en el año 2005.</p> <p>Crisis actual en agricultura a obligado a buscar nuevos productos para la siembra, entre ellos los cítricos.</p> <p>Altas pérdidas económicas para los agricultores a causa del ataque de enfermedades virales y viroidales, incentivan a los mismos a buscar material certificado.</p>	<p>No se sabe con certeza la aceptación de este tipo de producto de parte de los agricultores, a causa de una posible alza en el precio de las plantas en comparación con plantas no certificadas.</p> <p>No hay conocimiento Nacional de la potencialidad de siembra de plantas certificadas.</p> <p>La crisis económica nacional no asegura que los agricultores estén anuentes a invertir en nuevos proyectos.</p> <p>No hay un medio de comunicación fluido, en el cual se puedan informar y ofrecer a los agricultores el material certificado.</p>

### D. Análisis de factibilidad para la implementación del proyecto:

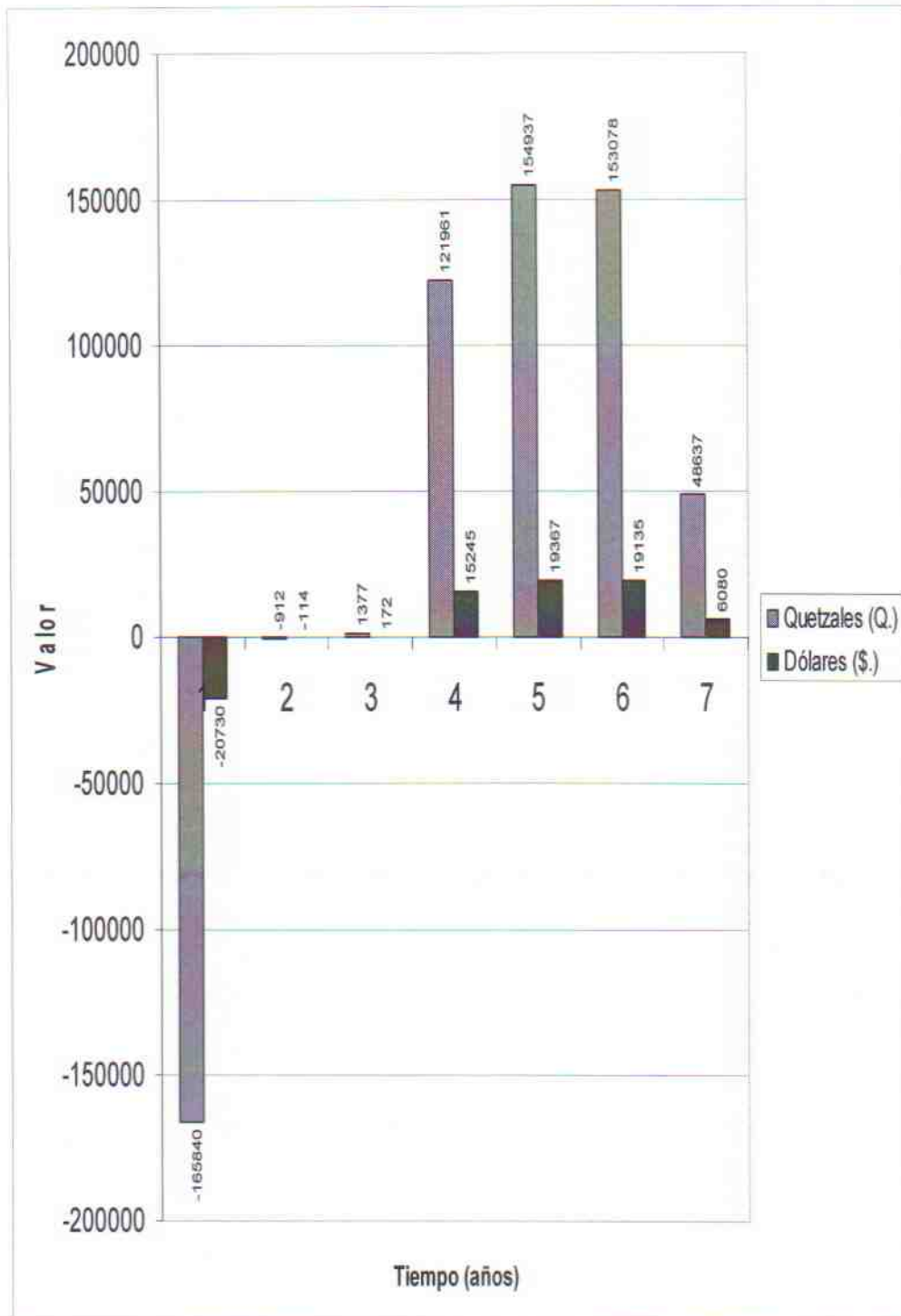
Cuadro 10. Flujo de caja del establecimiento y mantenimiento de invernadero certificado. Cifras en quetzales (Q.) y en dólares hasta al año 7. Inflación anual del 10%. Iniciando año 2005.

Concepto	Años													
	1		2		3		4		5		6		7	
	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.
<b>INGRESOS</b>														
Venta de plantas certificadas	0	0	0	0	74285	9285.57	173189	21648.64	220816	27602.02	225232	225232	229737	28717.14
<b>TOTAL DE INGRESOS*</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>74285</b>	<b>9285.57</b>	<b>173189</b>	<b>21648.64</b>	<b>220816</b>	<b>27602.02</b>	<b>225232</b>	<b>225232</b>	<b>229737</b>	<b>28717.14</b>
<b>EGRESOS</b>														
<b>I. INVERSIONES</b>	<b>165000</b>	<b>20625</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>II. COSTOS DIRECTOS</b>	<b>720</b>	<b>90</b>	<b>792</b>	<b>99</b>	<b>84261</b>	<b>10532.59</b>	<b>72134</b>	<b>9016.7</b>	<b>91748</b>	<b>11468.53</b>	<b>100923</b>	<b>100923</b>	<b>206680</b>	<b>25834.96</b>
Mano de obra	173	21.6	190	23.76	2022	252.72	4790	598.752	6524	815.4432	7176	7176	7893	986.6863
Insumos	547	68.4	602	75.24	6402	800.28	15168	1896.048	20658	2582.237	22724	22724	24996	3124.507
Pruebas para certificación	0	0	0	0	75837	9479.594	52175	6521.9	64567	8070.851	71023	71023	173790	21723.77
<b>III. COSTOS INDIRECTOS</b>	<b>120</b>	<b>15</b>	<b>120</b>	<b>15</b>	<b>1170</b>	<b>146.25</b>	<b>2520</b>	<b>315</b>	<b>3120</b>	<b>390</b>	<b>3120</b>	<b>3120</b>	<b>3120</b>	<b>390</b>
Depreciaciones invernadero	54	6.75	54	6.75	527	65.8125	1134	141.75	1404	175.5	1404	1404	1404	175.5
Depreciaciones equipo	66	8.25	66	8.25	644	80.4375	1386	173.25	1716	214.5	1716	1716	1716	214.5
<b>TOTAL DE EGRESOS</b>	<b>165840</b>	<b>20730</b>	<b>912</b>	<b>114</b>	<b>85431</b>	<b>10678.84</b>	<b>74654</b>	<b>9331.7</b>	<b>94868</b>	<b>11858.53</b>	<b>104043</b>	<b>104043</b>	<b>209800</b>	<b>26224.96</b>
<b>FLUJO NETO DE FONDOS**</b>	<b>-165840</b>	<b>-20730</b>	<b>-912</b>	<b>-114</b>	<b>-1377</b>	<b>-172</b>	<b>121961</b>	<b>15245</b>	<b>154937</b>	<b>19367</b>	<b>153078</b>	<b>19135</b>	<b>48637</b>	<b>60802</b>

\*Según venta del cien % de las plantas producidas en invernadero propagador certificado (Cuadro 8)  
 \*\*Sin descontar ISR

En el cuadro anterior, se especifican los costos e ingresos del establecimiento y mantenimiento del proyecto a un plazo de 7 años, en quetzales y dólares. Los números con signo negativo indican el tiempo transcurrido, antes de empezar a tener ganancia en el proyecto. A continuación, en la gráfica 5 se puede observar un resumen del flujo de capital en forma gráfica.

**Gráfica 5. Flujo de capital al desarrollar el invernadero certificado.  
Plazo de siete años.**



**Cuadro 11. Resultado de índice para el análisis de factibilidad del proyecto**

Índice	Valor	Explicación
VAN	Q. 319,270.76 (\$. 39,908.85)	Valor presente neto
P.D.	4.6 años (55 meses)	Periodo de devolución
B/C	1.53	Beneficio/costo
TIR	29 %	Tasa interna de retorno

Según lo observado en el cuadro de resultados del análisis de factibilidad del proyecto (Cuadro 11), se puede inferir lo siguiente:

El Valor Actual Neto (VAN), indica que el valor presente neto de los flujos salientes de caja descontando la inversión inicial es de Q. 319,270.76 (\$. 39,908.85) Esto nos da una idea del impacto financiero que se podrá acumular en el proyecto. Como se puede ver, es un impacto positivo y con ello se puede tener una idea de las posibles ganancias que podría ofrecer el proyecto a la empresa. Con ello, se puede concluir que es un proyecto viable, ya que el VAN es mayor que 0.

El periodo de devolución, dice que el tiempo requerido para recuperar el monto inicial de la inversión de capital es 4.6 años (55 meses), esto nos indica que el proyecto tardará éste tiempo estipulado en empezar a producir ganancia financieras para la empresa. Según criterios propuestos, se ha dicho que un proyecto es viable cuando se tiene un periodo de devolución menor de cinco años, por lo que esta inversión se encuentra en el rango recomendado, siendo entonces un proyecto viable.

El análisis de beneficio y costo (B/C), confirma que por cada unidad invertida retornará a la empresa 1.53. Es un proyecto viable, ya que el valor es mayor que 1. Nos indica que por cada quetzal invertido el proyecto va a generar Q.1.53.

La tasa interna de retorno (TIR) la cual es igual a 29%, indica que el proyecto nos generará este porcentaje de intereses en el lapso del tiempo establecido (siete años). Para que un proyecto se viable tiene que ser mayor a la tasa crediticia que ofrecen los bancos, la cual en estos momentos oscila entre el 16% y 18%.

Con el análisis de los índices anteriores, se puede concluir que en efecto el proyecto para el establecimiento de invernaderos certificados y venta de plantas certificadas para siembra en campo, es viable y el retorno de capital será positivo después de cinco años. Así mismo, se puede ver que la empresa tiene una serie de características mencionadas en el análisis FODA, que fortalecen en forma positiva el proyecto. Únicamente tendrían que invertir, en capacitar a sus trabajadores, para que tengan pleno conocimiento del manejo adecuado del invernadero certificado. Con ello, podrán asegurar con certeza que distribuirán plantas de alta calidad, libres de las enfermedades propuestas.

Ahora queda para la empresa el decidir si en realidad vale la pena el esfuerzo y el riesgo que este cambio implica. Cabe mencionar que para determinar si se efectúa el proyecto y, asegurar las ganancias especificadas en el análisis de factibilidad, se tiene que poner especial importancia a la meta del número de plantas vendidas al año de acuerdo a los análisis del cuadro 8. Debido a lo anterior es necesario poner especial atención a la posible demanda de plantas cítricas certificadas al año, por los

agricultores nacionales. Esto es así, ya que, como se especifico, los ingresos se calcularon tomando en cuenta que se venden el 100% de plantas certificadas obtenidas para la venta del invernadero certificado.

Según lo analizado y al observar el posible tamaño del segmento de mercado que podría estar interesado en la compra de plantas cítricas certificadas (demanda), se puede concluir que hay una alta oportunidad de vender este tipo de material. Este dato se puede ver en la sección de antecedentes, donde se hace una aproximación del tamaño aproximado del segmento interesado en adquirir plantas cítricas certificadas. Esto nos indica que el potencial de crecimiento esta latente pero aún no ha sido aprovechado del todo. Como se mencionó posteriormente, en general ha habido una tendencia creciente de siembra de aproximadamente 450 a 500 ha/año. Esto implica, asumiendo plantaciones de 400 plantas por ha, teóricamente se debería de demandar alrededor de 180,000-200,000 plantas al año. A pesar de lo anterior, no se puede asegurar con certeza y datos exactos la demanda real de este producto, ya que es un proyecto nuevo en el país. Lo que sí se puede ver es que hay una tendencia en aumentar las plantaciones de cítricos en el país y a causa de ello la demanda de plantas podría aumentar significativamente. Esto se podría confirmar, en especial por la serie de factores mencionados al describir la situación actual de la industria citrícola en Guatemala, los cuales se resumen a continuación:

- El cultivo de los cítricos servirá como alternativa para contrarrestar la crisis del café y de la agricultura.
- Incentivo a la fruticultura (PINFRUTA): Programa que inicia en el año 2005 y beneficiará con incentivos fiscales, asistencia técnica y capacitación a los productores que siembren árboles frutales, entre los cuales se encuentran los cítricos como el limón persa, limón criollo y mandarinas.
- El presente el gobierno y la situación agraria, continúa incentivando a los agricultores para que ellos siembren diferentes variedades de cítricos en el país. Cabe mencionar que tanto los agricultores y el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA); están buscando en forma insistente el mejorar la calidad y el rendimiento nacional.
- A partir de septiembre del año 2004, según la Unidad de Normas y regulaciones del MAGA, entra en vigencia los Acuerdos Ministeriales No. 712-2002 y 713-2002. En ellos se recalca sobre la importancia de un programa de certificación de plantas frutales y se establecen los requisitos aplicables a la producción, certificación, importación, exportación y comercio de semillas, partes de plantas y plantas de frutales certificadas y cítricos en específico. Este factor ayuda significativamente, ya que reduce la venta de plantas de pequeños viveristas y empresas no certificadas.

Otro problema a solucionar es el proceso de divulgación del tipo de planta que se esta distribuyendo, haciendo énfasis en la importancia de comprar plantas de este tipo y cómo esta información llegará a los agricultores-productores. Definitivamente se hace necesario trabajar en este tema ya que, si no se recurre a una adecuada fuente de información, la demanda de plantas certificadas de parte de los agricultores será muy baja. En el nivel nacional existe la disposición de los agricultores a sanear, resembrar y sembrar sus fincas con plantas sanas, ya que han sufrido pérdidas

extremadamente fuertes a causa del efecto de enfermedades, en especial de aquellas que no se pueden controlar como las enfermedades virales, viroidales y bacterias fastidiosas.

A continuación se encuentran una serie de estrategias, las cuales podrían dar inicio a un plan adecuado de mercadeo y promoción, cabe mencionar que hay que estudiar cada una de ellas junto con los dueños de la empresa Agropecuaria Popayán S.A., estudiando el posible efecto que estas tengan en la demanda del producto.

- Lo más importante es que deben dar a conocer a los agricultores el tipo de producto que distribuyen, su importancia recalcando en la diferencia del producto distribuido por la empresa en comparación con las demás empresas. Esto se puede realizar de varias maneras:

- a. Propaganda directa en fincas productoras.
- b. Talleres de capacitación y pláticas.
- c. Divulgación nacional de la información a través de entidades gubernamentales como PROFRUTA, medios de comunicación, etc. donde se recalque la importancia de la siembra de plantas certificadas y, dónde las pueden adquirir.

- Mantener la diversificación de variedades producidas dentro del invernadero, según tendencias de mercado.

- La demanda de plantas cítrica depende de la demanda del producto final, por lo que además de asegurar la venta directa de plantas, se debe velar por el buen desarrollo de la agroindustria cítrica nacional. Esto se puede hacer haciendo compendios, pláticas con posibles compradores del producto final e inversión para el desarrollo de la industria citrícola, entre otras.

## VII. CONCLUSIONES

- Con este documento, se elaboró la metodología para la implementación del primer invernadero multiplicador de cítricos libre de los virus: tristeza, psorosis, leprosis y woody gall; viroides: exocortis y cachexia; bacteria fastidiosa *Xylella fastidiosa*, de importancia económica en Guatemala.
- El invernadero certificado estará dividido en dos secciones. El invernadero comercial propagador y el invernadero de fundación multiplicador.
- El invernadero se iniciará con material vegetal certificado, proveniente de la Universidad de Riverside California, U.S.A.
- Se establecieron las bases metodológicas y técnicas de muestreo para asegurar la ausencia de los virus, viroides y bacterias fastidiosas en las plantas presentes dentro del invernadero certificado. En el invernadero de fundación multiplicador se debe muestrear el 100% de las plantas, mientras que en el invernadero comercial propagador se utiliza un método sistemático, muestreando el 20 % de la población con muestras compuestas de 4 plantas e intervalos de toma de muestras de 16 plantas.
- El análisis de factibilidad indica que el VAN es de Q. 319,270.76 (\$. 39,908.85) lo cual afirma el impacto financiero positivo del proyecto. El período requerido para recuperar el monto de la inversión es de 4.6 años (55 meses). El análisis beneficio/costo asegura que es un proyecto viable, ya que el valor obtenido es mayor que 1, siendo éste de 1.53. El TIR es igual al 29 %, esto demuestra que la implementación del proyecto es factible, ya que el valor obtenido es mayor a la tasa crediticia local.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Se debe verificar la implementación y supervisar la sanidad del invernadero certificado de cítricos, siguiendo la metodología establecida en el documento.
- Capacitar al personal, para el adecuado manejo y supervisión del invernadero certificado de cítricos.
- Llevar un registro por escrito de todo procedimiento realizado dentro del invernadero certificado.
- Desarrollar e implementar alternativas de saneamiento, para la eliminación de patógenos en plantas cítricas y otras especies de interés en Guatemala.
- Utilizar la metodología establecida como modelo para la certificación de otros invernaderos y otras especies de plantas, en especial para frutales de interés nacional.
- Establecer un programa nacional de certificación para asegurar la sanidad de las plantaciones de cítricos y otros cultivos de importancia en el país.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. 2002. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa, México. 838 pp.
- Alioto D. et al. 2001. «Occurrence of Citrus psorosis virus in Campania, Southern Italy». *Plant Phytopatology Department, University of Potrci, Italy*.
- Brlansky R.H. et al. 1990. «Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *Citrumelo* and *X. citri* from citrus using membrane entrapment immunofluorescence». *Plant Dis.* 74:863-868.
- Buchen-Osmond. 1987. *Citrus enation – Woody Gall (?) (Luteovirus)*. [en línea]. Plant virus database VIDEdb. <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr217.htm>. [consulta: 3 de diciembre del 2003]
- Camacho. 2002. «Saneamiento de cítricos: Micro injertos de ápices culinarios in Vitro». *Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba*. 2-7.
- Curso-Taller producción de material de propagación certificado de cítricos. 2001. Programa de certificación de cítricos en América central y el caribe: Fondo Fiduciario Pérez Guerrero. La Habana, Cuba.
- Dardón, B. 2003. «Las tareas para la agricultura». [en línea] 21 enero 2004, revista Red económica, Prensa Libre. <http://www.prensalibre.com/pl/redeco/archivo/2004/210104/07.html>. [consulta: 20 de febrero del 2004].
- Davis C.L., Brlansky R.H. 1991. «Use of immunogold labeling with scanning electron microscopy to identify phytopatogenic bacteria on leaf surfaces». *Food and agricultural sciences*. 58: 3052-3055.
- Dawn et.al. 1994. «Phylogeny of mycoplasmalike organisms (Phytoplasmas): a Basis for Their Classification». *Journal of bacteriology*. Vol. 176, No. 17: 5244-5254.
- Dean G. s.f. *Citrus Canker diseases*. [en línea] Plant Phytopatology Department, University of Florida Gainsville, U.S.A. 1-10. <http://www.biotech.ufl.edu/PlantContainment/canker.htm>. [consulta 25 de febrero del 2004.].
- D.E. Robertis, E.M.F. 1986. Biología Celular y Molecular. Editorial El Ateneo, 11ª. Edición.
- Frison, E.A & Taher, M.M (Eds.) 1991. FAO/IBPG. *Technical Guidelines for the Safe movement of citrus Germoplasm*. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome/Internacional Board for Plant Genetic Resources, Rome.

- Infoagro. 2003. El cultivo del limonero. [en línea]. Infoagro. <http://www.infoagro.com/citricos/limon.htm>. [consulta 20 de marzo 2004].
- Graca & Clark. 2000. «Detection of Citrus vein enation virus using cereal yellow dwarf virus ELISA kits». IOCV 14<sup>th</sup> Conference: 357-359.
- Gutiérrez, O. 2003. *La crisis del café y el desarrollo sostenible*. [en línea]. Publicación del 20 febrero del 2003 Eco2site News. <http://www.eco2site.com/news/febrero/cafe.asp>. [consulta 5 de agosto del 2003].
- Kahn, T. 2004. «Boletín informativo: Colección de variedades de cítricos, Universidad de California, Riverside». Fundación de Riverside UC.
- Karla & Palmieri. 1997. *El virus de tristeza de los cítricos (CTV) en Guatemala*. [en línea]. Instituto de investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala. [http://www.uvg.edu.gt/backup-files/facs/boletines\\_ii/cienac2.html](http://www.uvg.edu.gt/backup-files/facs/boletines_ii/cienac2.html). [consulta 14 de agosto del 2004].
- Karp, G. 1987. *Biología celular*. Editorial McGraw-Hill. México, D.F. 950 pp.
- Lee. R.F. et.al. 1998. «Citrus Health Management: Nursery Practices, Bud wood and Rootstock Certification Programs». *U.S.A. Chapter 3*, 1-14.
- Lee. R.F. et.al. 1991. «Citrus variegated chlorosis: A new destructive disease of citrus in Brazil». *Florida Agricultural experiment station, Journal and science project with Brazil*. 12-15.
- Lee, R.F. 2003. *Various Citrus viruses and viroids reports*. EcoPort. [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$PassCheckStart?ID=S47](http://www.ecoport.org/EP.exe$PassCheckStart?ID=S47). [consulta 28 septiembre del 2003]
- MAGA. 2002. «Acuerdo Ministerial No. 713-2002». Diario de Centro América [Guatemala]. 10 de Mayo, Pág. 27-30, Número 12.
- Martin S., Alioto D., Milne R.G., Guerra J. & Moreno P. 2002. Detection of Citrus Psorosis Virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection test. *Planta Pathology 51*: 134-141. BSPP, U.S.A.
- Metzker M. & Caskey T. 2001. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. [en línea]. Life sciences, Stockholm University. 9 pp. En base al lenguaje: [www.els.net](http://www.els.net). [consulta 28 de septiembre del 2003]
- Minister of agriculture of Belize & Citrus research and education institute (CREI). «The Belize citrus certification program (BCCP) guidelines». Belize.
- Navarro, L. C. N. Roistacher and T. Murashige. 1975. Improvement of Shoot-tip Grafting *in vitro* for Virus-free Citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(5): 471-479.

- Obiols, I. 2004. «Manual de las enfermedades virales y viroidales más importantes en el cultivo de cítricos para Guatemala». Tesis, Universidad del Valle de Guatemala, Facultad de ciencias y humanidades. 145 pp.
- Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria-OIRSA. 2000. *Proyecto Regional de Fortalecimiento de la Vigilancia Fitosanitaria en Cultivos de Exportación no Tradicional*. [en línea]. VIFINEX El Salvador con financiamiento de la República de China <http://nsl.oirsa.org.sv/Publicaciones/VIFINEX/Di051016/indice.htm>. [consulta 29 de septiembre del 2003]
- Pountou. 2003. *Biología molecular*. [en línea]. Practicas de genética UIB. <http://www.uib.es/depart/dba/genetics/practicas> [consulta 29 de septiembre del 2003]
- Peralta E. y Alonso M. 2000. «Principales técnicas de diagnóstico para la detección de fitopatógenos». *CENSA e Instituto de Investigaciones en Fruticultura Nacional, La Habana, Cuba*. 1-13.
- Perlman, P. & Perlman H. 2001. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. [en línea] Life sciences, Stockholm University. 3 pp. [www.els.net](http://www.els.net). [consulta 28 de septiembre del 2003]
- Peña et al. 2002. «Principales enfermedades virales y afines de los cítricos». *Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba*. 2-12.
- PROFRUTA & ICDF TAIWAN, 2003. Manual del cultivo de cítricos. Editorial Profruta, Guatemala. 39 pp.
- PROFRUTA, MAGA. 2000. Manual de cultivo de cítricos. Guatemala. 29 Págs.
- Reyes y Palmieri. 1994. Detección del virus de la tristeza de los cítricos en Guatemala. Trabajo de graduación. Universidad del Valle de Guatemala. 120 pp.
- Roistacher 2004. *Various Citrus viruses and viroids reports*. EcoPort. [en línea] [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$SSShow?ID=97](http://www.ecoport.org/EP.exe$SSShow?ID=97). [consulta: 11 de octubre del 2003].
- Roistacher 2004. *Various Citrus viruses and viroids reports*. EcoPort. [en línea] [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$SSShow?ID=65](http://www.ecoport.org/EP.exe$SSShow?ID=65). [consulta: 11 de septiembre del 2003].
- Roistacher 2004. *Various Citrus viruses and viroids reports*. EcoPort. [en línea] [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$SSShow?ID=75](http://www.ecoport.org/EP.exe$SSShow?ID=75). [consulta: 11 de septiembre del 2003].
- Roistacher 2004. *Various Citrus viruses and viroids reports*. EcoPort. [en línea] [http://www.ecoport.org/EP.exe\\$SSShow?ID=76](http://www.ecoport.org/EP.exe$SSShow?ID=76). [consulta: 11 de septiembre del 2003].

- Roistacher y Calavan. 1974. «Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm glasshouse temperatures». *Plant Dis. Rep.*, 58:850-853.
- Roistacher, C.N. «Indexing for viruses in citrus». Chapter 24. In: Hadidi, A; Khetarpal, R.K.; Koganezawa, H. (Eds.). 1998. *The Americana Phytopathological Society (APS), U.S.A.*
- Schubert T.S. & Sun X. 2001. «Bacterial citrus canker». *Plant phytpatology circular No. 377: 1-6.*
- Suárez Z., et al. 1999. «Nematodos asociados a los frutales y su control. I: frutales perennes». *CENIAP. IIA. DPV. Maracay.*
- Unidad de Normas y Regulaciones –UNE-, Proyecto de Desarrollo de la Fruticultura y Agroindustria –PROFRUTA-, Ministerio de Agricultura y Ganadería y Alimentación –MAGA-, Instituto de investigación de cítricos de Cuba. 1999.*
- Weathers y Harjung. 1964. «Transmission of citrus viruses by dodder, *Cuscuta sulinclusa*». *Plant Dis. Rep.*, 48:102-103.

## X. ANEXO

### A. Precio de pruebas, costos e ingresos del proyecto, número de plantas presentes en invernadero certificado:

**Cuadro 12. Precio por prueba en quetzales (Q.) y dólares (S.). Año 2005.**

Prueba	Enfermedad a detectar	Precio	
		Quetzales (Q.)	Dólares (S.)
PCR. Primers	Psorosis y leprosis	40.00	5.00
ELISA	Tristeza, Vein enation (Woody Gall) y <i>Xylella fastidiosa</i> .	40.00	5.00
PCR. Electroforesis	Exocortis y cachexia.	180.00	22.50
Indexación biológica	La mayoría de las enfermedades virales (en especial Wody gall, la cual no se tiene una prueba rápida bien estandarizada y confiable) y viroidales.	30.00	3.75

Nota: Se asumió un tipo de cambio de 8Q-1S.  
\*Detección de sub-especies

**Cuadro 13. Costo de pruebas por planta en invernadero de fundación multiplicador (Muestreo del 100% del total de la población). Cifras en quetzales (Q.) y en dólares hasta al año 7. Inflación anual del 10%. Iniciando año 2005.**

Enfermedad	Año													
	1		2		3		4		5		6		7	
	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.	Q.	S.
Tristeza	0	0	0	0	48	6	53	7	59	7	64	24	8	9
Vein enation (Woody gall)	0	0	0	0	48	6	53	7	59	7	64	24	8	9
Psorosis	0	0	0	0	48	6	0	0	0	0	0	0	0	9
Leprosis	0	0	0	0	48	6	53	7	59	7	64	20	8	9
Exocortis	0	0	0	0	218	27	0	0	0	0	0	0	0	40
Cachexia	0	0	0	0	218	27	0	0	0	0	0	0	0	40
<i>Xylella fastidiosa</i> *	0	0	0	0	48	6	0	0	0	0	0	0	0	9
Indexación biológica.	0	0	0	0	424	53	200	25	220	27	242	30	30	78
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1101</b>	<b>138</b>	<b>359</b>	<b>45</b>	<b>395</b>	<b>49</b>	<b>435</b>	<b>99</b>	<b>1931</b>	<b>161</b>

\* Se asume que se están realizando pruebas para detectar sub-especies  
Nota: Se asumió un tipo de cambio de 8Q-1S.

Cuadro 14. Costo de pruebas por planta en invernadero comercial propagador (Muestreo del 20% del total de la población, muestras compuestas por 4 plantas, tomadas en forma sistemática). Cifras en quetzales (Q.) y en dólares hasta al año 7. Inflación anual del 10%. Iniciando año 2005.

Enfermedad	Año													
	1		2		3		4		5		6		7	
	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.
Tristeza	0	0	0	0	2.4	0.3	2.7	0.3	2.9	0.4	3.2	0.4	3.5	0.4
Vein enation (Woody gall)	0	0	0	0	2.4	0.3	2.7	0.3	2.9	0.4	3.2	0.4	3.5	0.4
Psorosis	0	0	0	0	2.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	0.4
Leprosis	0	0	0	0	2.4	0.3	2.7	0.3	2.9	0.4	3.2	0.4	3.5	0.4
Exocortis	0	0	0	0	10.9	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.9	2.0
Cachexia	0	0	0	0	10.9	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.9	2.0
<i>Xylella fastidiosa</i> *	0	0	0	0	2.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	0.4
Indexación biológica.	0	0	0	0	21.2	2.6	10.0	1.2	11.0	1.4	12.1	1.5	31.0	3.9
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>55.1</b>	<b>6.9</b>	<b>18.0</b>	<b>2.2</b>	<b>19.8</b>	<b>2.5</b>	<b>21.7</b>	<b>2.7</b>	<b>80.6</b>	<b>10.1</b>

\* Se asume que se están realizando pruebas para detectar sub-especies  
Nota: Se asumió un tipo de cambio de 8Q-1\$.

**Cuadro 15. Costo total de pruebas en invernadero de fundación multiplicador e invernadero propagador comercial (Invernadero certificado), en base a un número estimado de plantas presentes en el mismo (Vid. Cuadro 16). Cifras en quetzales (Q.) y en dólares hasta al año 7. Inflación anual del 10%, iniciando año 2005.**

Costo total pruebas	Año													
	1		2		3		4		5		6		7	
	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.	Q.	\$.
Enfermedades	0	0	0	0	63313	7914	28750	3594	35578	4447	39135	4892	145091	18136

Nota: Se asumió un tipo de cambio de 8Q-1\$.

**Cuadro 16. Número estimado de plantas presentes en los invernaderos certificados y muestras a tomar para su certificación**

Especificación	Año						
	1	2	3	4	5	6	7
Invernadero de fundación o multiplicador	40	40	40	40	40	40	40
Invernadero comercial o propagador	0	0	350	800	1000	1000	1000
<b>Total de plantas en invernadero certificado</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>390</b>	<b>840</b>	<b>1040</b>	<b>1040</b>	<b>1040</b>
<b>Total de muestras a tomar</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>58</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>90</b>	<b>90</b>

## **B. Metodologías y protocolos para detección de enfermedades en laboratorio (pruebas serológicas):**

### 1. Generalidades de las metodologías serológicas para la detección de enfermedades:

#### a. ELISA:

El ELISA (por sus siglas en inglés, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", es una técnica que emplea enzimas como marcadores. La técnica es muy versátil y sensitiva y consiste en la inmovilización del antígeno o el anticuerpo sobre una fase sólida (placas de polietileno o cloruro de polivinilo). Sobre ésta se adicionan, de forma secuencial los demás componentes de la reacción después de lavados sucesivos para eliminar los elementos deficientemente fijados o no fijados (Perlman 2001). El ELISA es la técnica más comúnmente utilizada en la actualidad para la detección de fitopatógenos, especialmente virus. Su uso diverso, ha permitido un avance significativo en el conocimiento general de muchos agentes causantes de enfermedades, su epidemiología y control (Peralta y Alonzo 2001).

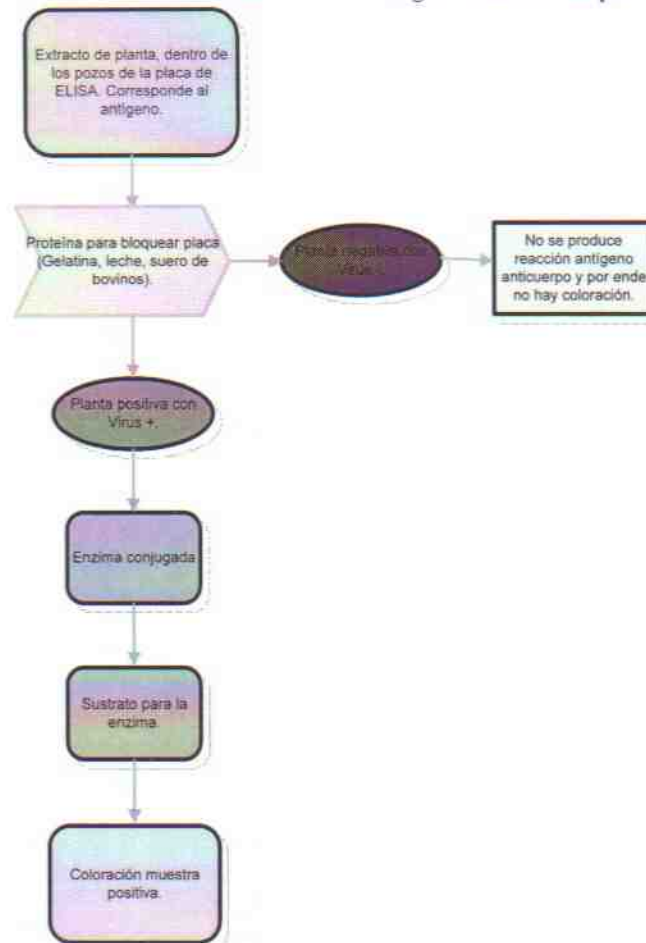
Esta metodología ha facilitado notablemente la velocidad de diagnóstico alrededor del mundo con diversos fines. Esto ha influido positivamente en el desarrollo de los programas de producción y certificación de semillas, mejoramiento genético y manejo de las enfermedades. (Peralta y Alonzo 2001)

La reacción antígeno-anticuerpo se observa mediante la adición del sustrato específico de la enzima y la consiguiente formación de hidrolizados coloreados generalmente que permiten, en muchas ocasiones, la evaluación de los resultados de forma visual (cualitativamente). Como la retención de la enzima es proporcional a la cantidad de antígeno o anticuerpo inmovilizado, es posible realizar la evaluación semi cuantitativa por colorimetría usando espectrofotómetros. Otras metodologías de detección incluyen la fluorimetría si los sustratos utilizados fueron fluorogénicos, (Peralta y Alonzo 2001).

Existen muchos tipos de ELISA, pero en general se pueden agrupar en dos grandes grupos: directos, e indirectos. En los métodos directos se utilizan como conjugados los anticuerpos específicos marcados con la enzima. En los indirectos se emplean como conjugados moléculas anti-inmunoglobulinas, sean segundos anticuerpos o proteína A. (Peralta y Alonzo 2001)

Tanto los ensayos directos como los indirectos pueden utilizarse para la detección de antígenos, mientras que los últimos también se emplean para detectar anticuerpos. Los protocolos o esquemas de incubación en ambos casos pueden ser muy variados e incluyen procedimientos cortos, con preincubación y otras leves modificaciones (Peralta y Alonzo 2001).

Ilustración 20: Metodología de ELISA simple



## b. PCR:

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Por sus siglas en inglés, “Polymerase Chain Reaction”), es una tecnología que se utiliza para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de una cadena de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o gen de interés en el genoma de un individuo. Es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular y su uso ha aumentado exponencialmente en la actualidad, en especial en aplicaciones de fitopatología para la detección de agentes patógenos (Metzker & Caskey 2001). Esta metodología tiene la limitación de que es más costosa y difícil de implementar, en comparación con ELISA, pero en cambio tiene la ventaja de ser altamente específica y sensible (Peralta y Alonzo 2001).

El proceso de amplificación del ADN por PCR requiere de dos pequeños fragmentos de ADN iniciadores, denominados cebadores («Primers» en inglés), que son oligonucleótidos de 18 a 25 nucleótidos de largo y tienen una composición G+C de aproximadamente un 50% a 60%. Los cebadores son de hebra simple y secuencia complementaria a la de los extremos del fragmento que se desea amplificar (región blanco). En sí, la PCR se realiza mediante ciclos sucesivos de desnaturalización térmica del ADN (95°C), anillado de los cebadores (50°C a 60°C) a las secuencias

complementarias y extensión de los cebadores anillados (72°C) mediante una ADN polimerasa termoestable (Obtenido a partir de la arcaebacteria *Thermus aquaticus* (Taq)) (Perlman 2001). Dado que los productos de extensión son a su vez complementarios a los cebadores, en cada ciclo se duplica la cantidad de ADN sintetizada en el ciclo anterior, de forma que hay una amplificación exponencial del fragmento (Peralta y Alonzo 2001). A continuación se describen los pasos básicos de una PCR:

a. Desnaturalización: Se realiza a temperaturas elevadas (usualmente mayor que 94°C) con el objetivo de separar las dos bandas del ADN. El primer ciclo de desnaturalización toma aproximadamente cinco minutos o más, dependiendo de la complejidad del ADN que se use como muestra. Los ciclos siguientes, para la desnaturalización del ADN sintetizado *de novo* se requiere alrededor de 1 minuto para completar el proceso.

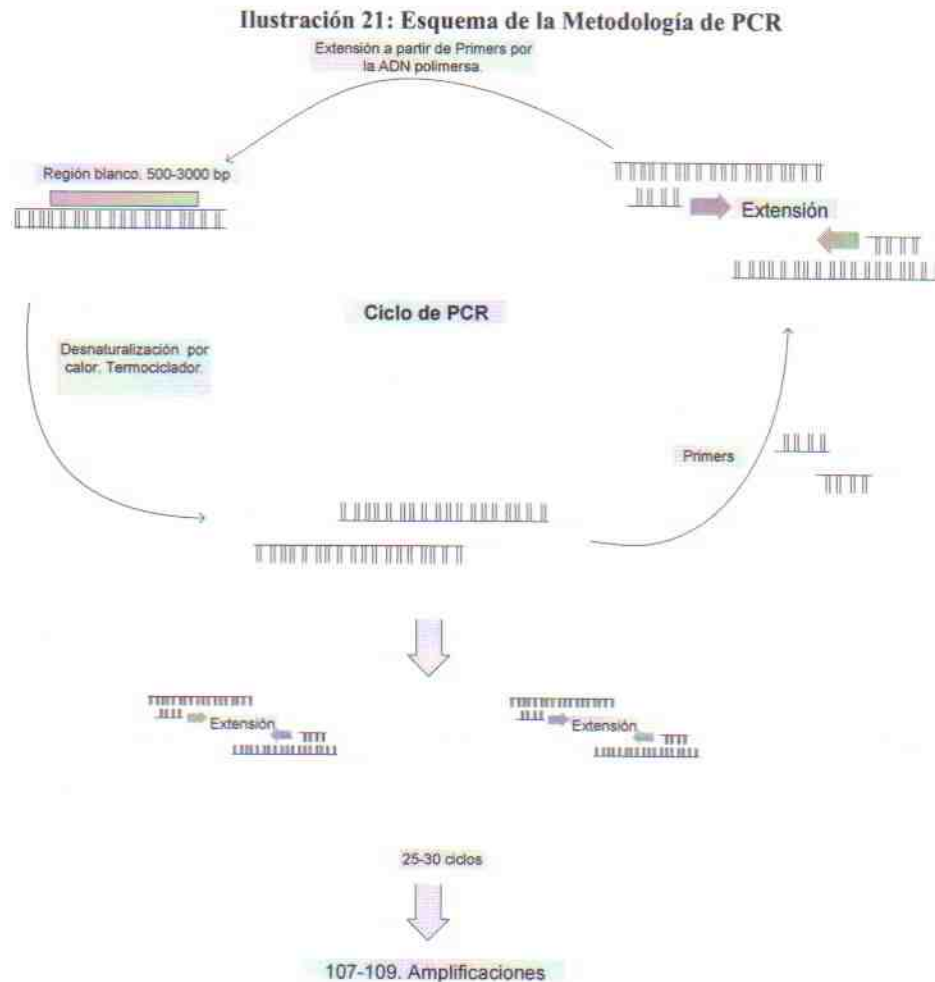
b. Hibridación o alineamiento ("En inglés: annealing"): Su objetivo es garantizar el alineamiento de los cebadores con las cadenas de ADN que se desean amplificar. Es una etapa crítica, donde las temperaturas deben ser determinadas de acuerdo al tamaño y la composición de bases de los cebadores; el criterio más usado para determinar esta temperatura es el Tm promedio de los cebadores. A temperaturas más bajas se compromete la especificidad del alineamiento y a temperaturas más elevadas su eficiencia. Usualmente las temperaturas que se emplean están entre 37 y 55°C durante 30 segundos-2 minutos aproximadamente.

Polimerización, síntesis o extensión: Se realiza por la acción de la Taq polimerasa a 72°C aproximadamente durante 1-3 minutos y 5-10 minutos durante el último ciclo. El tiempo que requiere este proceso depende del tamaño de la región blanco que se desea amplificar. A 72°C la Taq tiene una velocidad de reacción óptima que es de 1 kb. por minuto. La cantidad de ciclos que se realiza es variable, encontrándose generalmente entre 25 y 40, siendo más común un total de 30 ciclos (Peralta y Alonzo 2001).

En el procedimiento anterior se deben agregar ciertos compuestos, adicionales a la Taq ADN polimerasa y los cebadores. La mezcla de PCR contiene un cofactor de magnesio (Mg<sup>2+</sup>) que estabiliza la unión entre la Taq y el ADN y por lo tanto ayuda al buen funcionamiento de la enzima. También se adicionan desoxinucleótidos (dNTPs), que son necesarios para formar las nuevas hebras de ADN. Así mismo, es necesario la adición del amortiguador el cual estabiliza la reacción, controla el pH, concentración de sales y demás (Metzker & Caskey 2001).

La mayoría de los virus de las plantas y todos los viroides tienen un genoma ARN, lo que imposibilita utilizar la metodología original de la PCR para su detección. La variante RT-PCR (Transcriptasa Inversa – PC) ha resuelto esta limitación mediante la introducción de una primera fase para la síntesis *in vitro* del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN a detectar. Para ello se requiere de la acción de una transcriptasa inversa. Luego de sintetizado el ADNc, se procede a realizar la metodología clásica de PCR (Peralta y Alonzo 2001).

Para la realización del PCR y minimizar al mínimo los falsos positivos y posibles contaminantes, es necesario tener en cuenta las buenas prácticas de laboratorio y mantener un riguroso control de la calidad de los ensayos. Es de particular interés en este sentido garantizar la calidad del agua que se emplee y evitar contaminaciones por problemas de manipulación (pipeteo, uso de guantes, uso de puntas, tubos y soluciones estériles por autoclave, etc.) (Metzker & Caskey 2001).



La metodología que se utiliza para visualizar los resultados de PCR, se define como electroforesis. La electroforesis es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa, generalmente compuesta por poliacrilamida o agarosa. Como resultado neto, la electroforesis separa los fragmentos de ácido nucleico según su tamaño o longitud, expresado en nucleótidos (si son de hebra sencilla) o en pares de bases (si son de doble hebra, caso común del ADN) (Robertis & E.M.F. 1981).

Ilustración 22. Esquema de electroforesis



(Fuente: Pountou 2003)

2. Protocolos específicos para la detección serológica de enfermedades según datos recopilados en laboratorio de virología, Universidad del Valle de Guatemala:

- Complejo Psorosis (DAS – ELISA):

Para la detección de Psorosis se usan los anticuerpos monoclonales Mab P29. Casa comercial Agritest, Italia.

1. Se debe realizar un mapa de la placa de ELISA, donde se incluye:

- 2 pozos para el blanco
- 2 pozos para control positivo
- 2 pozos para control negativo
- Todas las muestras se colocan en duplicado

2. Cobertura de placa de ELISA: El anticuerpo cobertura se utiliza a una dilución a 1:1000, con amortiguador de cobertura. Colocar 100µl a cada pozo. Incubación: 2 horas a 37°C, en cámara húmeda.

3. Lavado: La placa se lava 3 veces por 3 minutos con PBS –Tween

4. Preparación de las muestras: Macerar muestras antes de acabar el periodo de incubación. Se maceran las hojas con amortiguador de extracción a una dilución 1:9. Agregar 100µl a cada pozo, y 100µl del control positivo y negativo. Incubación: Toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

5. Lavado: La placa se lava 3 veces por 3 minutos con PBS –Tween

6. Deposito de anticuerpo conjugado: El anticuerpo conjugado se utiliza a una dilución a 1:250, con amortiguador de conjugado. Colocar 100µl a cada pozo. Incubación: 2 horas a 37°C, en cámara húmeda.

7. Lavado: La placa se lava 3 veces por 3 minutos con PBS –Tween

8. Deposito del sustrato: El sustrato utilizado es el fosfato p-nitrofenil (sigma), se disuelve una tableta en el amortiguador del sustrato (dietanolamina 1:10 ). Se colocan 100µl. Incubación: 2 horas a temperatura ambiente en cámara oscura.

9. Lectura de placa: La lectura se realizó a las dos horas, a una longitud de onda de 405 nm.

10. Interpretación de datos: Los controles positivos y negativos deben de estar correctos para poder inferir en los resultados de El punto de corte se determinó para cada placa, siendo este el OD del control negativo más tres desviaciones estándares las muestras.

- Complejo Psoriasis (TAS – ELISA):

Para Psoriasis se usa el anticuerpo policlonal A322VI, para cubrir las placas de ELISA. Se utilizan dos anticuerpos monoclonales 13C5 (IgG) y 2A3 (IgM). El procedimiento del paso 1 al 5 es el mismo para ambos anticuerpos monoclonales.

1. Se debe realizar un mapa de la placa de ELISA, donde se incluye:

- 2 pozos para el blanco
- 2 pozos para control positivo
- 2 pozos para control negativo
- Todas las muestras se colocan en duplicado

2. Cobertura de placa de ELISA: El anticuerpo cobertura se utiliza a una dilución a 1:9000 con amortiguador de cobertura. Colocar 100µl a cada pozo. Incubación: 4 horas a 37°C, en cámara húmeda.

3. Lavado: La placa se lava 5 veces con PBS –Tween

4. Preparación de las muestras: Macerar muestras antes de acabar el periodo de incubación. Se maceran las hojas con amortiguador de extracción a una dilución 1:10. Agregar 100µl a cada pozo, y 100µl del control positivo y negativo. Incubación: Toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

5. Lavado: La placa se lava 5 veces con PBS –Tween

6. Deposito de segundo anticuerpo: El anticuerpo 13C5 (IgG) se utiliza a una dilución 1:32000 en amortiguador de extracción.

El anticuerpo 2A3 (IgM) se utiliza a una dilución 1:32000 en amortiguador de extracción. Colocar 100µl a cada pozo. Incubación: 90 minutos a 37°C.

7. Lavado: La placa se lava 5 veces con PBS –Tween

8. Deposito de anticuerpo conjugado: Es importante no utilizar el anticuerpo conjugado correspondiente para cada inmunoglobulina. El anti-raton IgG conjugado a la fosfatasa alcalina se

utiliza a una dilución 1:20000 en amortiguador de extracción. De la misma manera el anti-raton IgM conjugado a la fosfatasa alcalina se utiliza a una dilución 1:20000 en amortiguador de extracción. Colocar 100µl a cada pozo. Incubación: 90 minutos a 37°C, en cámara húmeda.

9. Deposito del sustrato: El sustrato utilizado es el fosfato p-nitrofenil (sigma), se disuelve una tableta en el amortiguador del sustrato (dietanolamina 1:10 ). Se colocan 100µl. Incubación: 2 horas a temperatura ambiente en cámara oscura.

10. Lectura de placa: La lectura se realizó a las dos horas, a una longitud de onda de 405 nm.

11. Interpretación de datos: Los controles positivos y negativos deben de estar correctos para poder inferir en los resultados de El punto de corte se determinó para cada placa, siendo este el OD del control negativo más tres desviaciones estándares. Las muestras.

- RT – PCR:

1. Extracción de ácidos nucleicos (ARN):

- a. Colocar aprox. 100 mg de tejido de hojas jóvenes en un eppendorf de 1.5 ml.
- b. Sumergir el tubo en nitrógeno líquido, macerar con un aplicador de madera, y colocar en hielo.
- c. Agregar 600µl de amortiguador de extracción, 200µl fenol, 200µl cloroformo.
- d. Vortex e incubar por 15 min. a temperatura ambiente.

Aquí en adelante usar todos los búffers y materiales deben estar libres de RNAsa. Es importante que la extracción se mantenga en hielo.

- e. Centrifugar por 3 min. a 4°C, remover 450µl a un tubo nuevo de 2 ml.
- f. Agregar 150 µl de 100% etanol y un pequeño pedazo de la placa de celulosa TLC (dipstick). El dipstick debe llegar al fondo del tubo y no ser más grande del tubo.
- g. Colocar los tubos en un lado en hielo, asegurarse que el extracto esté en contacto con el dipstick. Agitar en hielo por 30 min.
- h. Aspirar el amortiguador, agregar 500 µl de 25% amortiguador de lavado, invertir para mezclar. Repetir dos veces más.
- i. Remover todo el líquido por aspirando. Colocar el dipstick en un tubo nuevo y secar en un recipiente al vacío.
- j. Colocar el tubo horizontalmente y agregar 50 µl agua con DEPC encima del dipstick. Incubar por 5 min. Asegurar que el agua esté en contacto con el dipstick.
- k. Centrifugar 30 seg., remover y tirar el dipstick, el extracto contiene el ARN purificado con un pequeño pellet de celulosa en el fondo del tubo. Es preferible que se utilice el ARN inmediatamente para hacer la cADN. Si no se hace esto se puede guardar a -80°C por un par de días, de lo contrario se agrega un Acetato de sodio 3M en una dilución 1:10 y 25 volúmenes de etanol frío y se guarda a -20°C.

2. RT-PCR

- Cebadores:

- a. Cons1: 5' AGGTTTCTATCATTCTGAAACCC 3'

b. Cons2: 5' ACAAAGAAATTCCTGCAAGGG 3'

3. Transcriptasa reversa:

En un tubo nuevo agregar:

a. 1  $\mu$ l de cebador RT 10mM

b. 7  $\mu$ l de agua

c. 8  $\mu$ l ARN.

d. Calentar a 65°C por 5 min., inmediatamente enfriar en hielo.

e. Disolver el RT-PCR bead (Amersham) en 18  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O, y transferir 9  $\mu$ l al tubo de la reacción.

f. Centrifugar por corto tiempo e invertir para mezclar, incubar por 1 hr a 42°C.

- PCR:

Correr una reacción de 25  $\mu$ l usando 2  $\mu$ l de cDNA. Todo el material para el PCR es Promega.

Condiciones de la reacción:

a. 2.5  $\mu$ l Amortiguador 10X

b. 2.5  $\mu$ l MgCl 15mM

c. 2.5  $\mu$ l dNTP's 2.5 mM

d. 2.5  $\mu$ l primers Cons1+Cons2 10mM

e. 0.20  $\mu$ l Taq pol

f. 2.0  $\mu$ l cDNA

g. 12.8  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

- Programa:

94° C por 1 min.

94° C por 15 sec

56° C por 25 seg.

72° C por 60 sec

72° C por 5 min.



40 ciclos

Detección en gel de azarosa 1%: Utilizar 5  $\mu$ l del producto del PCR y 2  $\mu$ l del amortiguador de carga para el gel. El producto de PCR es de 411 PB

- Citrus Tristeza Virus (CTV) (ELISA DIRECTO FOSFATASA ALCALINA)

Kit AGDIA SRA 78900/1000

1. Cobertura con el anticuerpo (Para 96 pozos):

En un beaker colocar:

- 10 ml. de PBST + 0.4 g leche descremada

- 50  $\mu$ l de anticuerpo (Agdia)

- Agitar por aproximadamente 10 minutos

Nota: Si no se desea preparar la placa completa se prepara una relación proporcional a:

- (Número de pozos) x (100µl) (1ml/1000µl)= ml. de amortiguador
- (ml. de amortiguador) x (1/200<sup>\*</sup>) ml. x (1000µl/1ml)= µl de anticuerpo

<sup>\*</sup> Se refiere a la dilución del anticuerpo según casa comercial.

Luego cubrir la placa agregando 100 µl con pipeta multicanal a cada pozo, tapar con tape. Tiempo: guardar en cámara húmeda por 4 horas o toda la noche a 4° C.

2. Preparación de muestras: Todas las muestras se trabajan en duplicado. Se puede trabajar 46 muestras máximo, más los controles positivo y negativo. (Puede dejarse extrayendo toda la noche para una mejor extracción)

En un tubo:

Pesar 0.1 g de cada muestra se trabaja preferiblemente con nervadura central o corteza joven

10 ml. de PBST + 0.4 g leche descremada

Macerar. Entre cada muestra lavar el macerador con cloro al 10% y luego con agua destilada o con solución de jabón y agua destilada.

3. Lavado de la placa:

- Remover el tape con cuidado
- Vaciar la placa (sacudiéndola fuerte pero no bruscamente sobre el lavadero)
- Agregar PBST (amortiguador de lavado)
- Se deja 3 minutos entre cada lavado, esto se hace 2 veces
- Se sacude y se seca somatando sobre servilletas hasta que quede bien seca.

4. Colocación de muestras:

- Colocar en dos pozos amortiguador de extracción directo lo cual servirá de blanco.
- Realizar el mapa en duplicado.
- Colocar control positivo de Agdia (si no hay control positivo de Agdia puede colocar muestra de una hoja infectada)
- Colocar control negativo de Agdia (si no hay control negativo de Agdia puede colocar muestra de una hoja no infectada)
- Colocar 100µl de cada muestra en el pozo respectivo y en duplicado.
- Tapar con tape
- Incubar 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente o toda la noche a 40C

5. Lavado de placa: Lavar la placa con PBST, hasta quitar bien las muestras como en el paso 3, pero de 3 a 5 veces

6. Conjugado:

En un beaker colocar (para los 96 pozos, sino ver cálculos en el paso 1):

- 10 ml. de PBST + 0.4 g leche descremada

- 50  $\mu$ l de conjugado A + 50  $\mu$ l de conjugado B (Agdia) mezclar

Esto se debe preparar 10 minutos antes de agregar a la placa.

- Agregar 100 $\mu$ l con pipeta multicanal a cada pozo, tapar con tape,

- Incubar 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.

7. Lavado de placa: Paso 3

8. Sustrato:

En un beaker colocar:

- 9 ml. de agua destilada

- 1 ml. de dietanolamina

- Ajustar pH a 9.8 (con aproximadamente 2 gotas de HCL).

- Tapar el beaker con papel de aluminio puesto que el p-nitrofenilfosfato reacciona con la luz.

- Agregar 2 pastillas de sustrato, p-nitrofenilfosfato.

Nota: si tiene la mitad de la placa o menos prepare la mitad del sustrato

- Agregar con pipeta multicanal 100 $\mu$ l a cada pozo.

- Colocar en cámara oscura por 1 hora y media

9. Lectura de placa: Se hacen tres lecturas media hora, una hora y hora y media, después de haber agregado el sustrato. Utilice el lector de ELISA a 405 nm. También puede hacer lecturas visuales y anotar.

10. Fin de la reacción: Agregue 50 $\mu$ l de NaOH 3M (opcional)

- Soluciones:

**PBS (amortiguador de fosfatos salino)**

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	1000 ml.
Cloruro de sodio(NaCl)	8.0 g
Fosfato de potasio anhidro(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico anhidro (NaHPO <sub>4</sub> )	1.15 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Ácida sódica (NaN <sub>3</sub> )	0.2g

Ajustar pH 7.2 – 7.4

**PBST (amortiguador de lavado)**

Reactivo	Cantidad
PBS	1000 ml.
Tween 20	0.5 ml.

- Viroides

1. Extracción de Ácidos Nucleicos totales:

- Material:

a. Tejido infectado y sano para controles, si se tiene tallos jóvenes es mejor

b. 2X GPS amortiguador (1 litro)

c. 0.2 M glicina            15.0 g

d. 0.1 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            14.15 g

e. 0.6 M NaCl            30.05 g

Llevar a pH 9.6 usando NaOH, autoclave y almacene a temperatura ambiente

- Solución stock 3.5 acetato de sodio: Autoclave y almacene a temperatura ambiente.

- Solución stock SDS 10%: Autoclave y almacene a temperatura ambiente.

- Fenol líquido: A partir de cristales de fenol a 500 g de cristales de fenol agregue 200 ml. de tris HCl 0.2 M, autoclaveado y frío, y 0.1% de 8-hidroxiquinolina (w/v), cúbralo con papel de aluminio y deje que se mezcle toda la noche. Mida el pH de la capa inferior (2ml de la capa inferior + 8.0 ml. de metanol y 10 ml. de agua y mida en pHmetro) si tiene pH 8.0 entonces almacene en un bote oscuro a 4o C si no, ajuste el pH sustituyendo la capa de tris hasta que llegue al pH deseado.

Solución fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (96:96:8)

Almacene a 4oC

- 2-mercaptoetanol:

a. Polvo de bentonita

b. Etanol 95%

c. Agua autoclaveada almacenada a 4oC

d. Cristalería limpia y autoclaveada

e. Tubos de centrifuga de 50 ml. estériles

- Procedimiento:

Para cada muestra a extraerse prepare un tubo de 50 ml. con los siguientes reactivos:

a. 18.0 ml. 2X GPS

b. 2.0 ml. 10% solución stock SDS

c. 200 ul 2-mercaptoetanol

d. 5.0 mg. polvo de bentonita

e. 5.0 ml. Fenol: cloroformo: pentanol (96:96:8)

Usar 4.0 g de tejido para extraer (el tejido de corteza funciona mejor, la siguiente opción son hojas jóvenes, por último hojas viejas). Si utiliza tejido seco use únicamente 2.0 g. Pulverizar el tejido en nitrógeno líquido (o hielo seco) usando un mortero y un pistilo. Transferir el polvo congelado al tubo con los reactivos anteriores, tapar con un tapón de hule forrado con para film, mezclar y colocar en hielo por 15-20 minutos. Mezclar ocasionalmente. Si no se tiene disponibilidad de nitrógeno líquido o hielo seco, moler el tejido con cerca de 5 ml. de 2X GPS y transferir al tubo con el resto de los reactivos, usar el restante GPS para lavar el mortero. Centrifugar a 8,000 rpm. Por 15 minutos, cuidadosamente transferir la fase acuosa (capa superior) a un tubo de 50 ml. para centrifugar y ajustar el volumen a 20 ml. con amortiguador 2X GPS. Nota: la velocidad de centrifugación no es crítica solo se necesita romper la emulsión para formar una fase superior acuosa y una fase inferior fenólica con una interfase verde con cuidado de no transferir la fase fenólica. Dividir en dos partes iguales los 20 ml. en 2 tubos de centrifuga. A cada tubo agregue 2.5 volúmenes de etanol (25 ml.) y 2.5 ml. de Acetato de Sodio 3.5 M tape y mezcle bien. Almacene en el freezer.

- Extracción en mini preparados a partir de la extracción de Ácidos Nucleicos totales para viroides para uso como plantilla para RT-PCR:

Mezclar el tubo conteniendo el precipitado etanolico de ácidos nucleicos totales y remueva 2 ml. de la suspensión y transfiera a un mini tubo de centrifuga estéril de 2ml. Centrifugue por 10 minutos para crear un pelet con el ácido nucleico. Tirar el sobrenadante. Resuspenda en 333 ul de 1X STE amortiguador. Mezclar por 10 minutos y mantener en un baño de hielo. Agregar 0.02 gramos de polvo de CF-11 celulosa (20 mg.) y agregue 145 ul de etanol al 95% (Etanol) para una concentración final de 35% y mezcle en hielo por 30 minutos. Centrifugar por 1 minuto y descarte el sobrenadante. Agregue 400 ul de amortiguador de lavado (1x STE + 35% de etanol, llamado 35% STE) y vortexee brevemente y continúe mezclando por 3 minutos. Repite el paso 5, 3 veces. Centrifugar por 1 minuto, descartar el sobrenadante tratando de sacar la mayor cantidad de líquido posible. Agregar 400 ul de 1X STE (sin etanol), mezclar por 5 minutos y centrifugar por 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf marcado (paso 7) y precipitar el ARN de doble banda agregando 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol al 95% y almacene toda la noche a  $-20^{\circ}$  C. Las plantillas de RT-PCR son estables al ser almacenadas como indica este paso. Proceder al paso 9 cuando estén listas para usarse.

- Soluciones:

**10X STE**

1M Tris HCl pH 8.0	10 ml.
5M NaCl	20 ml. (o 25 ml. de NaCl 4M)
0.5M EDTA	2 ml.
Agua	68 ml. (o a un volumen final de 100 ml.)

**Amortiguador de lavado**

10X STE	10 ml.
95% etanol	37 ml.
Agua	53 ml.
	100 ml.

- *Xyllella fastidiosa* (ELISA DIRECTO PEROXIDASA)

Kit AGDIA SRP 34501/1000

1. Cobertura con el anticuerpo (Para 96 pozos):

En un beaker colocar:

- 10 ml. de amortiguador de cobertura
- 50  $\mu$ l de anticuerpo (Agdia)
- Agitar por aproximadamente 10 minutos.

Nota: si no se desea preparar la placa completa se prepara una relación proporcional a:

- (Número de pozos) x (100 $\mu$ l) (1ml/1000 $\mu$ l)= ml. de amortiguador

- (ml. de amortiguador) x (1/200\*) ml. x (1000 $\mu$ l/1ml)=  $\mu$ l de anticuerpo

\* Se refiere a la dilución del anticuerpo según casa comercial.

Luego cubrir la placa agregando 100  $\mu$ l con pipeta multicanal a cada pozo, tapar con tape.

Tiempo: guardar en cámara húmeda por 4 horas o toda la noche a 4° C.

2. Preparación de muestras: Todas las muestras se trabajan en duplicado. Se puede trabajar 46 muestras máximo, más los controles positivo y negativo. En un tubo:

- Pesar 0.1 g de cada muestra
- Agregar 1.0 ml. de amortiguador de extracción directo
- Macerar. Entre cada muestra lavar el macerador con cloro al 10% y luego con agua destilada o con solución de jabón y agua destilada.

3. Lavado de la placa:

- Remover el tape con cuidado
- Vaciar la placa (sacudiéndola fuerte pero no bruscamente sobre el lavadero)
- Agregar PBST (amortiguador de lavado)
- Se deja 3 minutos entre cada lavado, esto se hace 2 veces
- Se sacude y se seca somatando sobre servilletas hasta que quede bien seca.

4. Colocación de muestras:

- Colocar en dos pozos amortiguador de extracción directo lo cual servirá de blanco.

- b. Realizar el mapa en duplicado.
  - c. Colocar control positivo de Agdia (si no hay control positivo de Agdia puede colocar muestra de una hoja infectada)
  - d. Colocar control negativo de Agdia (si no hay control negativo de Agdia puede colocar muestra de una hoja no infectada)
  - e. Colocar 100µl de cada muestra en el pozo respectivo y en duplicado.
  - f. Tapar con tape
  - g. Incubar 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C
5. Lavado de placa: Lavar la placa con PBST, hasta quitar bien las muestras como en el paso 3, pero de 3 a 5 veces.
  6. Conjugado: En un beaker colocar (para los 96 pozos, sino ver cálculos en el paso 1):
    - a. 10 ml. de amortiguador de conjugado (8 ml. de PBST 1X + 2 ml. de MRS).
    - b. 50 µl de conjugado (Agdia) mezclar.

Esto se debe preparar 10 minutos antes de agregar a la placa. Agregar 100µl con pipeta multicanal a cada pozo, tapar con tape, Incubar 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.

7. Lavado de placa: Paso 3

8. Sustrato:

Medir 10 ml. de amortiguador OPD 1X y coloque una tira de OPD en el amortiguador por 2 minutos. Cuidado con el OPD puesto que es carcinógeno

9. Lectura de placa:

Se hacen tres lecturas media hora, una hora y hora y media, después de haber agregado el sustrato. Utilice el lector de ELISA a 405nm. También puede hacer lecturas visuales y anotar.

Fin de la reacción: Agregue 50µl de NaOH 3M (opcional)

- Soluciones :

#### **PBS (Amortiguador de fosfatos salino)**

Reactivo	Cantidad
Agua destilada	1000 ml.
Cloruro de sodio(NaCl)	8.0 g
Fosfato de potasio anhidro(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g
Fosfato de sodio dibásico anhidro (NaHPO <sub>4</sub> )	1.15 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Ácida sódica (NaN <sub>3</sub> )	0.2g

Ajustar pH 7.2 – 7.4

#### **PBST (amortiguador de lavado)**

Reactivo	Cantidad
PBS	1000 ml.
Tween 20	0.5 ml.

#### Amortiguador de extracción ELISA DIRECTO

Reactivo	Cantidad
PBST	1000 ml.
Polivinilpirrolidona (PVP-40)	20.0 g

#### Amortiguador de OPD

Reactivo	Cantidad
Peroxido de hidrogeno (30 por ciento)	0.4 ml.
Acido cítrico (anhídrido)	5.1 g
Fosfato de sodio dibasico (anhídrido)	7.33 g

Ajuste pH a 5.0. Ajuste el volumen final a 1000 ml. con agua destilada. Almacene a 4°C

### 3. Alternativas para la eliminación de patógenos en plantas cítricas:

#### a. Plantas de origen nuclear (Germinación convencional de semillas de variedades poliembriónicas):

Hasta el momento los patógenos, en su mayoría no se transmiten a las semillas de los frutos de un árbol enfermo, por lo que las plantas que se logran al sembrar dichas semillas estarán libres de patógenos. Lo inconveniente de esta vía es el largo período que transcurre hasta que los caracteres juveniles (abundantes espinas, excesivo vigor de las plantas, fruta de baja calidad y tardía entrada en producción) disminuyan y sean aceptables para la propagación comercial.

Con el propósito de acelerar y lograr descendientes nucleares, se han desarrollado estos cultivos in vitro a partir de los cuales se obtienen plantas libres de patógenos, en especial aquellas semillas poliembriónicas (Camacho 2002).

#### b. Micro injerto:

Es una forma muy eficaz de obtener plantas libres de patógenos en numerosas especies vegetales. En la actualidad constituye la vía por excelencia para disponer del material de propagación certificado que se lleva a las plantaciones comerciales, así como la forma de garantizar el estado sanitario de las plantas dentro de un banco de germoplasma de cítricos para su utilización en los programas de mejoramiento genético y para la conservación adecuada de estos valiosos recursos filogenéticos. Esta técnica ha sido una de las más eficaces en la eliminación de todos los patógenos, incluyendo los que no pueden ser eliminados por termoterapia, además que las plantas obtenidas por esta vía, presentan características idénticas a la planta madre y, a la vez se evitan los caracteres juveniles que presentan las plantas nucleares (obtenidas de semillas). Se recomienda el empleo de esta técnica como base de los programas de saneamiento dentro de los sistemas de producción de material de propagación certificado de cítricos que urge desarrollar en todos aquellos países donde la propagación aún no se realiza sobre la base de una garantía sanitaria. (Camacho 2002).

- 1) Procedimiento: El procedimiento descrito por Navarro y col. (1975) para el micro injerto de ápices caulinares in vitro consta de las siguientes etapas:

2) Preparación y siembra in vitro del patrón: Es necesario obtener de patrones logrados por germinación de semillas in vitro, aunque también se pueden emplear como patrones plantas micro propagado. Cualquier patrón que sea compatible con la variedad a injertar se puede utilizar. A pesar de que el patrón más utilizado han sido el citrange 'Troyer' (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. X *Citrus sinensis* (L.) Osb.) se han empleado también *Poncirus trifoliata*, limón 'Rugoso' (*Citrus jambhiri* Lush.), cidro 'Etrog' (*Citrus medica* L.) y *Citrus macrophylla* Wester, entre otros. Como primer paso, se eliminan manualmente los tegumentos de las semillas, tratando las mismas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,7 % durante diez minutos para la esterilización de su superficie y se enjuagan varias veces con agua destilada estéril. Las semillas se siembran en tubos de ensayo con medio de germinación compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog (MS) solidificado con agar, donde permanecen en oscuridad constante a 27-30 °C durante alrededor de dos semanas hasta que las plántulas alcanzan su desarrollo óptimo para su uso en el micro injerto (Navarro et. al. 1975).



**Ilustración 23. Patrón germinado en tubo de ensayo. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.**

3) Preparación del ápice: Los ápices caulinares para el micro injerto pueden obtenerse de diversas fuentes de brotes de los árboles enfermos seleccionados: directamente en árboles que se encuentren en activa brotación vegetativa; plantas injertadas de las selecciones de interés que se mantienen en bolsas o macetas y en las que puede inducirse la brotación de sus yemas defoliándolas totalmente dos semanas antes de la fecha del micro injerto; y vástagos cultivados in Vitro. Se utilizan brotes no mayores de 5 cm. (preferentemente entre 2-3 cm.) para evitar ápices degenerados o en estado de abscisión. A cada brote se le eliminan las hojas mayores y se separa la parte terminal con una longitud de 1 cm., se realiza la esterilización de superficie por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 0,25 % más 0,1 % de Tween 20 durante cinco minutos y se enjuaga repetidas veces con agua destilada estéril. En condiciones asépticas y con la ayuda del estereoscópico, se eliminan las hojas restantes con excepción de los tres primordios foliares más jóvenes (Navarro et. al. 1975).



**Ilustración 24. Plantas podadas a las que se le desea sanar por micro injertación. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.**



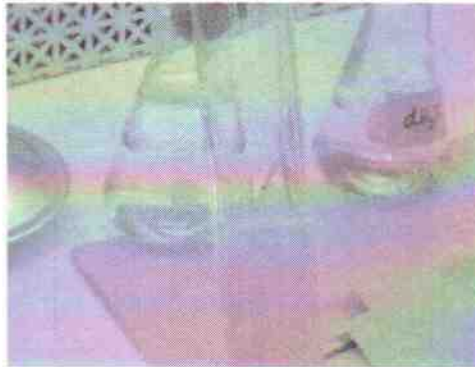
**Ilustración 25. Colección de brotes para micro injertación (Ápices). Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.**

4) Micro injerto: Trabajando en condiciones de esterilidad, la plántula patrón se extrae del tubo de ensayo, se decapita dejando aproximadamente 1,5 cm. Del epicotilo, se acorta la raíz hasta 4-6 cm. Y se eliminan los cotiledones junto con sus yemas axilares. El tipo de injerto que más se utiliza es la incisión de T invertida con dimensiones de 1 mm. En el extremo del epicotilo decapitado, a través de la corteza hasta el cambium, con cuidado de no dañar la médula. También se pueden hacer cortes triangulares de la corteza para deposita el injerto. Con el empleo de instrumentos de micro disección, se aísla el ápice caulinar menor de 0,2 mm. Compuesto solo por el meristemo apical más los dos o tres subyacentes primordios foliares y se coloca con la superficie de corte basal en contacto con la superficie cortical horizontal de la incisión practicada en el patrón. Los cortes para la preparación del patrón y el aislamiento del ápice deben ser tan perfectos como sea factible y las operaciones del micro injerto deben efectuarse con la máxima rapidez posible para evitar la desecación de los tejidos. Otros factores que influyen decisivamente en el prendimiento del micro injerto son el patrón escogido, la variedad del ápice micro injertado, la utilización de patrones etiolados, la edad de las plántulas patrón y la destreza manual del operador (Navarro et. Al. 1975).



**Ilustración 26. Micro injerto con corte triangular en patrón. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.**

- 5) **Mantenimiento de las plantas micro injertadas:** Las plantas micro injertadas se colocan en medio líquido compuesto por las sales minerales MS, las vitaminas de White, 100 mg/L de meso-inositol y 75 g/L de sacarosa, en tubos de ensayo con soporte de papel absorbente y se mantienen a 27 °C de preferencia con iluminación de 16 horas luz (Navarro et. al. 1975).



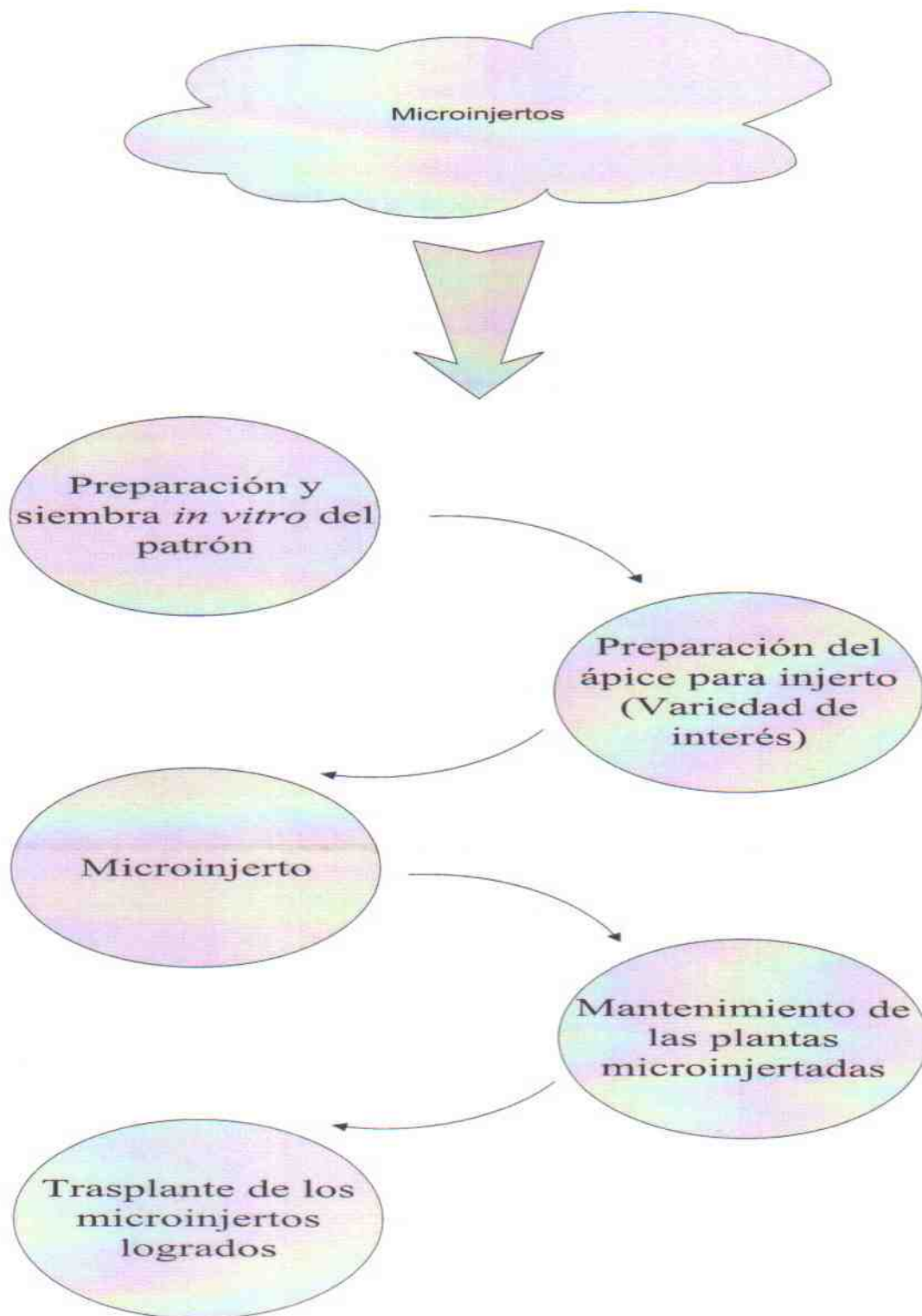
**Ilustración 27. Crecimiento de injerto en medio líquido. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.**

- 6) **Trasplante de los micro injertos logrados:** A las 5-8 semanas, con al menos dos hojas expandidas, las plantas micro injertadas pueden ser llevadas a condiciones ambientales externas, mediante su trasplante directamente a macetas con un sustrato apropiado y en condiciones de humedad y sombreado que favorezcan su desarrollo, o injertándolas sobre patrones vigorosos, variante que se utiliza en diversos laboratorios con el objetivo de minimizar pérdidas en este importante paso y acelerar el desarrollo de los micro injertos (Navarro et. al. 1975).



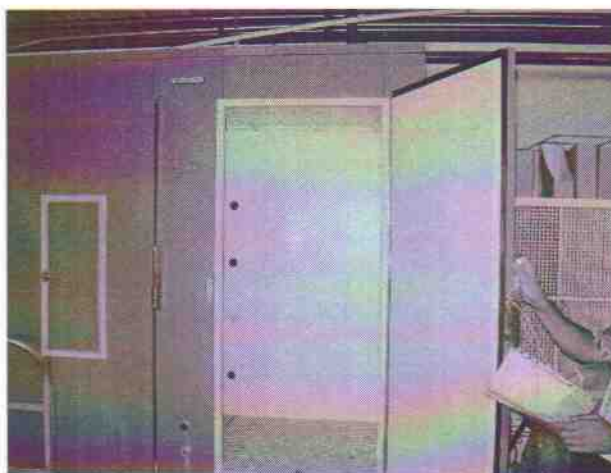
**Ilustración 28. Plantas saneadas en invernadero de banco de germoplasma. Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.**

Ilustración 29. Esquema de microinjertación



#### c. Termoterapia:

Es un método clásico curativo para la obtención de plantas libres de patógenos. Consiste en someter plantas infectadas, durante semanas o meses, a temperaturas elevadas (38–40 °C) inactivando así los patógenos termo sensibles. Entre estos se encuentran la mayoría de los virus de importancia (Tristeza y woody gall entre otros). Aunque la metodología resulta exitosa para eliminar un número considerable de patógenos en material de cítricos infectado, presenta como inconvenientes que algunas especies o variedades son sensibles a las altas temperaturas, a la vez que es ineficaz en la eliminación de ciertos patógenos como viroides, entre estos exocortis y cachexia (Camacho 2002).



**Ilustración 30. Cámara de termoterapia con iluminación artificial. Fuente: Fotografía tomada por Irwin Donis, Riverside California.**

#### 4. Programas de certificación Nacionales:

Se define como la unión entre tres programas separados, pero altamente relacionados: Los tres programas que lo componen son: Programa de cuarentena, programa de saneamiento (Termoterapia y micro injertos) y mantenimiento de bancos de germoplasma sanos y por último el programa de certificación de material vegetal. Un programa de certificación es de suma importancia para la sostenibilidad a largo plazo de cultivos cítricos y de otros que se propagan en forma vegetativa. Con ello se asegura el crecimiento de plantas sanas y el saneamientos de variedades locales de interés y provee la protección necesaria para evitar el ingreso de patógenos exóticos al país. En aquellas enfermedades que no tienen insectos vectores se pueden controlar con facilidad implementando programas de certificación. En el caso de las enfermedades que tienen insectos vectores, se presentan mayores riesgos y retos, pero hay datos que afirman que una de las mejores maneras de evitar la dispersión incontrolada de cualquier patógeno es el sembrar árboles sanos libres de él, eliminando así el inóculo inicial. Se ha demostrado en varias ocasiones, como por ejemplo en Florida que en áreas donde hay presencia de enfermedades transmitidas por vectores, en especial virales, viroidales y aquellas causadas por bacterias fastidiosas, los programas de certificación deben ser mandatorios para que sean efectivos y, se lleven a cabo correctamente. No sirve de nada que un agricultor siembre plantas sanas, libres de enfermedades, si los vecinos siembran plantas enfermas (Lee 2004).

a. Programa de cuarentena:

En todo el mundo se están buscando constantemente la introducción de nuevas variedades, para mejorar la producción local. Con un programa de certificación, se puede asegurar que el material que se introduce esta libre de cualquier patógeno. Los programas de cuarentena operan bajo la jurisdicción del ministerio de agricultura del país. Hay dos maneras para hacer cuarentenas en cítricos, la primera es la colocación de invernaderos alejados de áreas productoras de cítricos. El material importando es examinado para detectar la presencia de cualquier patógeno, a continuación se pueden implementar estrategias de saneamiento, como lo es la termoterapia y la micro injertación o bien se puede eliminar el material contaminado. El método anterior puede ser caro y se necesita de mucha infraestructura para su adecuada implementación. El segundo método se denomina cuarentena *in vitro*. Consiste en colocar las yemas para injerto importadas en medios de micro propagación adecuada, dentro de tubos de ensayo (Metodología desarrollada en España), a continuación se procede según se requiera. El método anterior requiere de menos espacio y tiempo, pero requiere de un alto grado de conocimiento y experiencia. Cabe mencionar que se debe evitar el importar material de áreas de riesgo, donde hayan enfermedades comúnmente o de donde no se disponga de un adecuado programa de certificación (Lee 2004).

b. Programa de saneamiento:

Incluye el saneamiento, crecimiento, reproducción y mantenimiento de variedades locales nativas, adicionales a aquellas importadas. Para ello se tienen que seguir los siguientes pasos: Selección de plantas madre de cultivares locales, saneamiento de material por micro propagación o termoterapia, indexación biológica y detección serológica de enfermedades, evaluación agronómica de variedades, mantenimiento de plantas adultas sanas en invernaderos (Lee 2004).

c. Programa de certificación de material vegetal:

El propósito es garantizar la sanidad de material vegetal, el cual se comercializará a través de crecimiento de variedades de interés comercial obtenidos a partir de material sano previamente cuarentenado, libre de enfermedades. Estos se mantienen en invernaderos certificados libres de enfermedades. Estos programas son inspeccionados por una institución gubernamental, la cual confirma la sanidad del material distribuido. Generalmente hay cinco tipos de bloques de árboles los cuales forman un programa de certificación: Bancos de germoplasma (Producción de semillas y baretas para injertos), bloques de fundación, vivero propagador o multiplicador y vivero comercial (Lee 2004).

d. Bancos de germoplasma:

Compuesto por plantas obtenidas del programa de cuarentena y saneamiento. Se ha verificado que son variedades de alto valor agronómico y, se le realizan pruebas continuas para determinar su sanidad. Las plantas se crecen bajo invernaderos, en macetas o en el suelo si hay ausencia de nemátodos, protegiendo las mismas de la entrada de vectores. Estos árboles son la fuente de material para el bloque

de fundación. Estos árboles se deben permitir fructificar, para observar cualquier cambio o anomalía. Generalmente se mantienen por agencias gubernamentales (Lee 2004).

e. Bloques de fundación:

Generalmente pertenecen a empresas privadas. Se pueden sembrar a campo abierto, pero si hay presencia de vectores es preferente que se mantengan dentro de invernaderos. Se le realizan pruebas continuas para determinar su sanidad y se les debe permitir fructificar, para observar cualquier cambio o anomalía (Lee 2004).

f. Vivero multiplicador o propagador:

Área donde se multiplican materiales o variedades de interés y patrones en mayor volumen, con el objetivo de contar con suficiente material de propagación para el abastecimiento de yemas certificadas a lo invernadero comerciales. Por ley se deben realizar pruebas continuas para determinar su sanidad (Lee 2004.)

g. Vivero comercial:

Generalmente pertenece a instituciones privadas. Es un área que establecen las empresas encargadas de suministrar plantas, para la venta al público interesadas en el establecimiento de plantaciones. Los materiales a comercializar deben partir de los viveros multiplicadores o propagadores certificados. Por ley se deben realizar pruebas continuas para determinar su sanidad (Lee 2004).

## 5. Funciones de algoritmo en programa R:

```

muestreo.azar = function(N, i.t, p.C, ppm, ints){
i.r = 1:ints
b.p = i.r
for(i in 1:ints){
C = rbinom(N, 1, i.t)
i.r[i] <- sum(C)/N
m = sort( sample( 1:N, N * p.C ) )
b = tapply( C[m], gl( N * p.C / ppm, ppm), sum)
b.p[i] <- length( b[b >= 1])}

p.e = b.p / N * p.C
list( minimo = min(p.e), maximo = max(p.e), promedio = mean(p.e), real = mean(i.r))}

plot.azar = function (N = 1000, probs=c(0.000, 0.001, 0.005, 0.025, 0.050, 0.100), muestreo = 0.1, comp = 3, ints = 100){
mi = 1:length(probs)
ma = mi
pr = ma
re = pr
for (i in 1:length(probs)) {
tmp = muestreo.azar(N, probs[i], muestreo, comp, ints)
mi[i] = tmp$minimo; ma[i] = tmp$maximo; pr[i] = tmp$promedio; re[i] = tmp$real }
plot(re, ma, type = "b", lty = 2, pch = 3, col = "blue", xlab = "Incidencia de la enfermedad en la
plantacion", ylab = paste("Probabilidad de detectar al menos una muestra (compuesta por", comp, "plantas)", main =
paste("Probabilidad de detectar al menos una muestra positiva con un \n muestreo aleatorio simple de", muestreo*100,
"% en un campo con", N, "plantas"))
points(re, mi, type = "b", lty = 2, pch = 3, col = "red")
points(re, pr, type = "b", lty = 1)
legend(x = probs[2], y = max(ma), legend = paste("Numero de muestras: ", round(N * muestreo /
comp, 0)))}

muestreo.sist = function(N, i.t, s, n, ints){i.r = 1:ints
b.p = i.r
for(i in 1:ints){ C = rbinom(N, 1, i.t)
i.r[i] <- sum(C)/N
m = rep(rep(1:0, c(s, n)), len = N)
g = gl(length(C[m==1]) / s, s)
b = tapply(C[m==1], g, sum)
b.p[i] <- length( b[b >= 1])}

p.e = b.p / (length(g)/s)
list( minimo = min(p.e), maximo = max(p.e), promedio = mean(p.e), real = mean(i.r), muestras = length(g)/s)
plot.sist = function (N = 1000, probs=c(0.000, 0.001, 0.005, 0.025, 0.050, 0.100), si = 3, no = 10, ints = 100){
mi = 1:length(probs)
ma = mi
pr = ma
re = pr
for (i in 1:length(probs)) {
tmp = muestreo.sist(N, probs[i], si, no, ints)
mi[i] = tmp$minimo; ma[i] = tmp$maximo; pr[i] = tmp$promedio; re[i] = tmp$real }
plot(re, ma, type = "b", lty = 2, pch = 3, col = "blue", xlab = "Incidencia de la enfermedad en la
plantacion", ylab = paste("Probabilidad de detectar al menos una muestra (compuesta por", si, "plantas)", main =
paste("Probabilidad de detectar al menos una muestra positiva con un \n muestreo sistematico (contiguas =", si,
intervalo =", no, ") en un campo con", N, "plantas"))
points(re, mi, type = "b", lty = 2, pch = 3, col = "red")
points(re, pr, type = "b", lty = 1)
legend(x = probs[2], y = max(ma), legend = paste("Numero de muestras: ", tmp$muestras))}

plot.azar(muestreo=0.10,comp=1,int=1000) Muestreo al azar 10% 1000 repeticiones
plot.sist(si=1,no=9,int=1000) Muestreo sistemático tomando una planta cada 9 plantas
plot.azar(muestreo=0.20,comp=4,int=1000) Muestreo al azar 20% muestras compuestas de 4
plot.sist(si=4,no=16,int=1000) Muestreo sistematico tomando 4 muestras cada 16 plantas
legend(locutor(1),c("Limite superior","Media","Limite inferior"),pch=c(3,1,3),lty=c(2,1,2),col=c("blue","black","red"))
Leyenda de gráficas.

```