UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Eficiencia de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) por ácaros vectores *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) en Colombia

Guillermo Adolfo León Martínez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía
Escuela de Posgrados
Bogotá, Colombia
2013

Eficiencia de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) por ácaros vectores *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) en Colombia

Guillermo Adolfo León Martínez
Código: 797064

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias Agropecuarias con énfasis en Entomología

Director:
Ph.D. Fitopatología. Oscar Oliveros G.
Codirectores:
Ph.D. Entomología. Andreas Gaigl.
Ph.D. Plant Pathology. Ronald H. Brlansky

Línea de Investigación:
Entomología - Fitopatología
Grupo de Investigación:
Cítricos y frutales tropicales en la Orinoquia

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía
Escuela de Posgrados
Bogotá, Colombia
2013

A mi Madre.

A mi Padre, a mi hermana Alicia y a mi tío Hernando (q.e.p.d.), quienes siempre enfatizaron que el estudio y la perseverancia son los pilares fundamentales de la superación.

Al sector Agroalimentario de Colombia, en especial a fruticultores y citricultores.

Agradecimientos

A CORPOICA por facilitar el tiempo para el estudio y la investigación, así como por permitir el uso de sus instalaciones y laboratorios en los C.I. La Libertad y Tibaitatá.

A University of Florida por el apoyo brindado durante el desarrollo de la tesis como administrador de los fondos de financiación y al Citrus Research and Development Foundation (CRDF) por la financiación del trabajo de investigación.

Al profesor Ronald H. Brlansky PhD. Plant Pathology, de University of Florida, a Avijit Roy, PhD. y Nandlal Choudhary PhD., investigadores de University of Florida, por su apoyo incondicional, sus orientaciones y el entrenamiento suministrado en el laboratorio de Fitopatología del Citrus Research and Education Center (CREC) en Lake Alfred, Florida.

A Juan Carlos Campos, auxiliar de investigación CORPOICA, C.I. La Libertad, por todo su invaluable apoyo como auxiliar de investigación durante el proceso de montaje de experimentos, registro y recopilación de datos.

A Jorge Arguelles investigador de CORPOICA Tibaitatá, por su orientación y apoyo en el diseño de experimentos y análisis estadístico de los resultados.

A los profesores evaluadores de los seminarios doctorales y del examen de calificación, por sus aportes para la estructuración de la presente tesis de grado. A los profesores Oscar Oliveros y Andreas Gaigl de la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía por su orientación y observaciones al trabajo.

A todas las personas que directa o indirectamente aportaron al presente trabajo en el área académica o de investigación.

Resumen

Esta tesis se presenta en tres capítulos listos para su presentación a revistas científicas. Cada capítulo aborda diferentes aspectos relacionados con la transmisión del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) por el ácaro vector *Brevipalpus phoenicis*. El capítulo 1, incluye información sobre las interacciones del virus con su vector *B.phoenicis,* y la planta receptora naranja (*Citrus sinensis* L.); se profundiza en los tiempos de adquisición y transmisión del virus, el porcentaje de ácaros infectados y los tiempos de aparición de síntomas. El capítulo 2, trata sobre las interacciones del virus CiLV, con su vector y diferentes plantas no cítricas, hospederas del ácaro o del virus; se documenta la eficiencia de transmisión del virus hacia cítricos, después que el ácaro vector se ha hospedado en plantas no cítricas. El capítulo 3, trata sobre el diagnóstico del virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático tipo 2 (CiLV-C2) en los departamentos del Meta y Casanare, por medio de técnicas RT-PCR; se profundiza sobre la detección de un nuevo tipo de virus de la leprosis (CiLV-C2) en Colombia. Como resultado de esta investigación, se anexa a la presente tesis el artículo publicado en la revista Phytophatology.

Palabras clave: Cítricos, leprosis, transmisión, vector, CiLV-C

Abstract

This thesis is presented in three chapters, ready for submission to scientific journals. Each chapter addresses various aspects of citrus leprosis virus (CiLV) transmission by its vector mite *Brevipalpus phoenicis*. Chapter 1, includes information on virus interactions with the vector *B.phoenicis*, and receptor orange plants (*Citrus sinensis* L.); working on times of acquisition and transmission of the virus, percentage of infected mites and time to appearance of symptoms. Chapter 2 is about the CiLV virus interactions with its vector *B.phoenicis*, citrus plants and different mite or virus hosts; also study the virus transmission efficiency of the mite vector to citrus plants, after being hosted in different non-citrus plants. Chapter 3, focuses on the diagnosis of citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) through RT-PCR molecular technics in Meta and Casanare states, as well on the detection with this research of a new type of citrus leprosis virus (CiLV-C2) to Colombia. The published paper in the Phytopathology journal, is attached to this thesis.

Keywords: Citrus, leprosis, transmission, vector, CiLV-C.

Contenido

Pág.

Resumen.....IX

Lista de figuras..... XIV

Lista de tablas XVI

Introducción 1

1. Capítulo 1. Parámetros de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C por ácaros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)

1.1. Introducción…….. 8
1.2. Metodología…….....12
1.2.1. Establecimiento de colonias de ácaros *B. phoenicis* ……..13
1.2.2. Siembra y mantenimiento del material vegetal ……..……14
1.2.3. Pruebas de diagnóstico …….. ……..…… 14
1.3. Resultados y Discusión……..……..17
1.3.1. Período de adquisición…….....17
1.3.2. Período de transmisión …….....……19
1.3.3. Porcentaje de población infecciosa……..……..23
1.4. Conclusiones …..…… 25
Bibliografia……..……..……..……..27

2. Capítulo 2. Transmisión de CiLV-C por el acaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) desde plantas cítricas y otros hospederos no cítricos, hacia plantas cítricas

2.1. Introducción …… 32
2.2. Metodología……37
2.2.1. Selección y mantenimiento del material vegetal ……..……..37
2.2.2. Adquisición del virus por ácaros *B. phoenicis*……..……..*37*
2.2.3. Infestación de ácaros sobre hospederos no cítricos ……..……38
2.2.4. Retransmisión del virus CiLV-C hacia plantas cítricas……..……..38
2.3. Resultados y Discusión……38
2.3.1. Observación de síntomas de leprosis en hojas de naranja valencia……38
2.3.2. Detección del virus de la leprosis de los cítricos en naranja valencia luego de hospedar el vector en plantas no cítricas……..……..41
2.3.3. Expresión de lesiones iniciales de leprosis en hojas de naranja valencia...44

2.3.4. Modelos de regresión TAS, en función del tiempo de permanencia del ácaro *B. phoenicis* sobre plantas no cítricas ……..…...45
2.4. Conclusiones…….……48
Bibliografía ……49

3. Capítulo 3. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2) en los departamentos de Meta y Casanare, mediante RT-PCR
3.1. Introducción …….… 54
3.2. Metodología…….…….60
3.2.1 Obtención del material vegetal y ácaros *B. phoenicis* ……..……61
3.2.2 Procesamiento del material - Puebas RT-PCR ……61
3.3. Resultados y Discusión ……..…… 62
3.3.1. Prueba RT-PCR - Iniciadores MP ……62
3.3.2. Prueba RT-PCR - Departamentos Meta y Casanare …….. 63
3.3.3. Prueba RT-PCR - Tejido vegetal ……64
3.3.4. Prueba RT-PCR - Tamaño de lesiones cítricos y *Swinglea glutinosa*……66
3.3.5. Prueba RT-PCR - Ácaros *B. phoenicis* ……..……..68
3.4. Conclusiones **……** 68

Bibliografía ……70

Anexos

Anexo A: Artículo publicado Revista Phytophatology …… …… 75
Anexo B: Artículo publicado Revista Agronomía Colombiana ……. 89
Anexo C: Análisis de regresión logística para el efecto del período de adquisición sobre la probabilidad de aparición de síntomas de CiLV …… ……..99
Anexo D: Análisis de regresión logística para el efecto del período de transmisión sobre la probabilidad de aparición de síntomas de CiLV ……... …….. 100
Anexo F: Protocolos para procedimientos moleculares ……....102

4. Conclusiones y Recomendaciones ……73
4.1. Conclusiones **……**73
4.2. Recomendaciones**……**74

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Aspecto de las colonias del ácaro *Brevipalpus phoenicis* sobre frutos de naranja valencia ……14

Figura 1-2: Ubicación de ácaros *Brevipalpus phoenicis* sobre lesiones de leprosis en hojas de naranja valencia ……15

Figura 1-3: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en ácaros *B. phoenicis* expuestos a diferentes períodos de adquisición ……17

Figura 1-4: Probabilidad estimada de aparición de síntomas del virus de la leprosis de los cítricos en función del tiempo de transmisión……20

Figura 1-5: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en hojas de naranja valencia expuestas a diferentes períodos de transmisión ……22

Figura 1-6: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en ácaros *B. phoenicis* con período de adquisición de 48 h y diferentes tiempos de transmisión…….22

Figura 1.7. Detección del virus de la leprosis de los cítricos para diez grupos de ácaros *B. phoenicis* ……...24

Figura 2-1: Lesiones de leprosis desarrolladas en hojas de naranja valencia, después que el ácaro *B. phoenicis* se hospedó en las plantas no cítricas ……..…..39

Figura 2-2. Porcentajes de aparición de síntomas de leprosis en plantas de naranja valencia, luego que *B. phoenicis* fue hospedado en plantas no cítricas …….. 40

Figura 2-3: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en hojas de naranja valencia, luego que el ácaro *B. phoenicis* fue hospedado en plantas no cítricas……..… 41

Figura 2-4: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en ácaros *B. phoenicis* luego de ser hospedados en plantas no cítricas……..42

Figura 2-5: Tiempo de aparición de síntomas de leprosis en naranja valencia, en función del tiempo de permanencia de *B. phoenicis* sobre *Dieffenbachia* sp……..… 46

Figura 2-6: Tiempo de aparición de síntomas de leprosis en naranja valencia, en relación con el tiempo de permanencia de *B. phoenicis* sobre *S.cayennensis*……..47

Figura 2-7: Tiempo de aparición de síntomas de leprosis en naranja valencia, en relación con el tiempo de permanencia de *B. phoenicis* sobre *C. variegatum*……47

Figura 2-8: Tiempo de aparición de síntomas de leprosis en naranja valencia, en relación con el tiempo de permanencia de *B. phoenicis* sobre *S. acuta* ……..……48

Figura 3-1: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores MP, para muestras de naranja y *S. glutinosa* colectadas en diferentes localidades del Meta y Casanare……63

Figura 3-2: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores CPG y MP para muestras de naranja valencia colectadas en Meta y Casanare. ……..64

Figura 3-3: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores CPG…… 66

Figura 3-4: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores CPG para tejido vegetal con lesiones de diferente tamaño ……..……67

Figura 3-5: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores CPG y MP, para ácaros *B. phoenicis* infectados con virus CiLV-C2.. 68

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Concentración de RNA total presente en extracciones de ácaros *B. phoenicis*…….…….…….. 18

Tabla 1-2: Porcentaje de plantas de naranja valencia con síntomas de leprosis con relación a diferentes períodos de adquisición del virus por *B. phoenicis*…….19

Tabla 1-3: Probabilidad estimada de aparición de síntomas del virus de la leprosis de los cítricos en función del período de transmisión……. 20

Tabla 1-4: Concentración de RNA total de ácaros *B. phoenicis* y de tejido sintomático de hojas de naranja valencia expuestas a diferentes períodos de transmisión…….……..... 23

Tabla 1.5: Concentración de RNA total extraído de 10 poblaciones de ácaros *B. phoenicis* …….……..…….25

Tabla 2-1: Porcentaje de hojas de naranja valencia con lesiones de CiLV, en función del tiempo de estadía del ácaro B. phoenicis en diferentes hospederos no cítricos…… 40

Tabla 2-2: Concentración de RNA total en ácaros y hojas de naranja valencia cuando *B. phoenicis* fue hospedado previamente en plantas no cítricas ……43

Tabla 2-3: Tiempo requerido para la expresión de lesiones iniciales de leprosis en naranja valencia, luego de hospedar el vector sobre plantas no cítricas…… 45

Tabla 3-1: Concentracion de RNA total obtenida de extracciones de tejido vegetal con lesiones de leprosis en los departamentos del Meta y Casanare ……65

Tabla 3-2: Concentración de RNA total obtenida en extracciones de lesiones de leprosis grandes y pequeñas colectadas en los departamentos del Meta y Casanare ……...67

Introducción

La leprosis de los cítricos (CiLV) es reconocida como una enfermedad de importancia cuarentenaria y económica, producida por un virus tipo baciliforme, que afecta principalmente naranjos (*Citrus sinensis* L.) y mandarinos (*Citrus reticulata*). Se cataloga como una amenaza para la industria citrícola mundial, y por causa de esta enfermedad, se pueden cerrar los mercados internacionales de fruta fresca con países de Norte América, Europa y Asia que no la poseen (Rodrigues *et al.,* 2003).

La diseminación de la enfermedad es rápida y puede exterminar los cultivos infectados cuando no se controla. Durante los últimos años, la leprosis de los cítricos CiLV ha incrementado su importancia económica, al comprobarse su dispersión por varios países de Centro y Sur América. Ha afectado seriamente la producción de cítricos y causado pérdidas económicas en Brasil, Argentina, Uruguay, Panamá y Venezuela. Además ha sido registrada en países como Bolivia, Perú, Guatemala, Honduras, México, Costa Rica entre otros (Rodrigues *et al*., 2003; Freitas *et al.,* 2004; Araya, 2000; Mejía *et al*., 2005; NAPPO, 2005; Gómez *et al*., 2005), y fue recientemente reportada en Belice (Rodrigues & Childers, 2013)

Según Rodrigues *et al.*, (2003), Freitas *et al*., (2004), Bastianel *et al*., (2010) en Brasil, primer productor mundial de naranja, la leprosis es considerada la enfermedad viral más importante para los cítricos, porque los costos del control del ácaro transmisor suman cerca de 100 millones de dólares al año. Además de la relevancia de la enfermedad para la citricultura Brasilera, su importancia mundial se ha ampliado considerablemente en los últimos años, debido a la diseminación del virus hacia países de Centro y Sur América (Bastianel *et al*., 2004; Freitas *et al*., 2005; Kitajima *et al*., 2004).

Colombia posee unas 45.000 hectáreas cultivadas en cítricos y una producción anual de 750.000 toneladas que están amenazadas por la presencia de la enfermedad. El país tiene cuatro principales núcleos productivos que son: el núcleo central (Santander,

Boyacá, Cundinamarca y Tolima) con 21.000 hectáreas; el núcleo Occidente (Eje Cafetero, Antioquia y Valle del Cauca) con 13.000 hectáreas; el núcleo de la Costa Atlántica (Atlántico, Bolívar, Cesar y Magdalena) con 7000 hectáreas; y el núcleo de Orinoquía (Meta y Casanare) con cerca de 5.000 hectáreas (Espinal, Martínez y Peña 2005).

La leprosis de los cítricos se observó por primera vez en Colombia en el año 2004 y su diseminación fue rápida en la región de la Orinoquía. Durante los años 2004 a 2005 se reportó en varios municipios de los departamentos del Meta y Casanare (Becerra, *et al*. 2007; León *et al*, 2006). De acuerdo con la secretaría de Agricultura del Meta, en el departamento hay 4.300 hectáreas sembradas en cítricos, que representan el 10% del área nacional cultivada y se encuentran amenazadas por la presencia de la enfermedad. La producción calculada del Meta es de $180.000 millones de pesos anuales, razón para desarrollar programas de control (MADR, 2002). Casanare posee más de 500 ha sembradas en cítricos y en dicho departamento se observó por vez primera la presencia de la enfermedad.

En Colombia, se reveló por microscopía electrónica, que el virus de la leprosis de los cítricos es de tipo citoplasmático (CiLV-C). La detección molecular se efectuó con técnica RT-PCR (Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), sobre muestras colectadas en los departamentos del Meta y Casanare; para ello se utilizaron iniciadores específicos del genoma viral y se amplificaron fragmentos de ADN citoplasmático; la secuencia obtenida coincidió 98% con la secuencia de nucleótidos del CiLV-C aislado del Brasil, con lo cual se pudo detectar el virus en Colombia (León *et al*, 2006).

Durante el año 2005, en Colombia el CiLV-C estaba restringido a la Orinoquia Colombiana en los departamentos del Meta y Casanare. En el año 2010, se registra la presencia de la enfermedad en Ibagué, Tolima, lo cual significa que el virus ha logrado traspasar la barrera natural de la cordillera oriental, situándose en el centro del país (Bastianel *et al*., 2010). Este hecho extiende la amenaza fitosanitaria para la citricultura Colombiana de todas las regiones de producción, pues debido al sistema de mercadeo de cítricos en Colombia, así como a la falta de programas de cuarentena y prevención para esta enfermedad, se facilita la diseminación del virus en todo el país.

La presencia de la leprosis de los cítricos CiLV-C en Colombia, puede causar graves pérdidas económicas en caso de dispersarse hacia los diferentes núcleos productivos. El mercadeo internacional de cítricos, frutas frescas y de otros productos agrícolas u ornamentales hacia países que no tienen la enfermedad, puede afectarse debido a que el ácaro transmisor posee un gran número de plantas hospederas. El ácaro rojo plano *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae), es el principal vector de la leprosis de los cítricos CiLV-C en Colombia (León *et al*, 2006). Zuluaga (1971) reportó *B. phoenicis* en cítricos por vez primera en el Valle del Cauca. La especie se encuentra registrada en varias zonas del país desde hace más de tres décadas (Posada, 1989; León, 2001), incluyendo los Departamentos del Meta y Casanare (Becerra, *et al*. 2007; León *et al*., 2005).

Recientemnte Nunes *et al*., (2012) reportan en Brasil, varias plantas presentes en huertos de cítricos, como hospederas naturales del virus de la leprosis CiLV-C. En Colombia, *Swinglea glutinosa*, es utilizada comúnmente como cerca viva y también es hospedera natural tanto del virus CiLV-C, como del ácaro vector *B. phoenicis*, circunstancia que aumenta las posibilidades de diseminación de la enfermedad en el país (León *et al*., 2008).

Por las anteriores razones, este trabajo tiene como objetivos determinar la eficiencia de los ácaros *B. phoenicis* para transmitir el virus CiLV-C, mediante pruebas de transmisión sobre plantas de cítricos y sobre plantas no cítricas hospederas del ácaro vector; también busca precisar la viabilidad del virus mientras el ácaro vector está hospedado en cítricos u otras plantas y luego pasa de nuevo a plantas de cítricos. Se documentan además, los períodos de latencia y transmisión que ocurren desde el momento en que el vector adquiere el virus, hasta el momento en que los síntomas de la enfermedad se expresan.

En cuanto al diagnóstico del virus CiLV-C en Colombia, durante los años 2010 – 2011 las pruebas moleculares por RT-PCR, con los iniciadores previamente amplificados fallaron para detectar el virus y la técnica no fue reproducible, puesto que presentó inespecificidad en las amplificaciones (Lenis, B. y Angel, J.; 2010; Roy *et al*., 2013). Por lo tanto, se sugiere secuenciar nuevamente el virus CiLV-C en Colombia, para determinar si existe variabilidad con los aislamientos genómicos registrados previamente en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y estandarizar

posteriormente la prueba de detección molecular RT-PCR, con los nuevos aislamientos genómicos obtenidos.

Para cumplir con los objetivos mencionados, esta disertación se divide en tres capítulos:
Capítulo 1. Parámetros de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C por ácaros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes).
Capítulo 2. Transmisión del virus CiLV-C por el acaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) desde plantas cítricas y otros hospederos no cítricos, hacia plantas cítricas
Capítulo 3. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2) mediante diagnóstico RT-PCR en los departamentos de Meta y Casanare.

Con el fin de explicar las fallas en la detección molecular mencionadas, en el Capítulo 3 se adelantaron trabajos cooperativos con la Universidad de La Florida y USDA-APHIS, que permitieron realizar el análisis filogenético del virus y desarrollar nuevos iniciadores para su detección mediante pruebas RT-PCR. Dichos trabajos, reportan un nuevo virus de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2), en Colombia. El artículo científico “A Novel Virus of the Genus *Cilevirus* Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis” fue publicado en Mayo de 2013, en la revista Phytopathology, Volumen 103, Numero 5. Páginas 488-500. Autores: Avijit Roy; Nandlal Choudhary; Guillermo León M.; Jonathan Shao; Ananthakrishnan Govindarajulu; Diann Achor; Wei, G; Picton, D; Laurenne Levy; Mark Nakhla; Hartung, J. y Ronald H. Brlansky, y se anexa a la presente tesis (Anexo A).

Para la detección del virus en el presente trabajo, se utiliza la técnica RT-PCR con los iniciadores generados para la detección molecular del nuevo virus CiLV-C2 por Roy *et al*., (2013), y se provee vital información para el diagnóstico de la enfermedad en tejido vegetal y en ácaros vectores. La metodología puede ser aplicada para desarrollar pruebas que determinen si los ácaros son virulíferos y su potencial para transmitir el virus, aunque se encuentren en plantas diferentes a cítricos.

Los resultados obtenidos, son aplicables para la detección segura y oportuna del virus CiLV-C2 en Colombia, factor fundamental para desarrollar medidas de cuarentena contra la enfermedad en el país y para establecer programas de prevención o exclusión de la leprosis en diferentes regiones productoras de cítricos.

Bibliografía

Araya G. 2000. Informe sobre la prospección de la “leprosis de los cítricos” en la zona fronteriza (Costa Rica – Panamá). Ministerio de Agricultura y Ganadería, Panamá.

Bastianel, M., A. Freitas, V. Rodrigues, F. Arrivabem, L. Antonioli, M. Machado. 2004. Resposta do tangor ´Murcott´ à inoculação do vírus da leprose dos citros em campo e em casa de vegetação. Laranja 2, 337-348.

Bastianel, M., Bassanezi, R., Freitas, J., Kitajima, E., Kubo, K., M. Machado. 2010. Citrus Leprosis Centennial of an unusual mite – vírus pathosystem. Plant Disease 94 (3) 284-293.

Becerra, H., López, V, Matheus, H., Batidas, A., A. Esteban. 2007. Monitoreo de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) vector de La leprosis de los cítricos en el Meta y Casanare. En: Resumenes XXXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología Socolen. pp. 142.

Childers, Dominguez, F.; Bernal, A.; Childers, C.; Kitajima, E. 2001. First report of citrus leprosis on Panama. Plant Disease, St. Paul. (85) 228.

Espinal, C., Martínez, H., Peña, Y. 2005. La cadena de cítricos en Colombia. Ministerio de Agricultura. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Documento de trabajo No.107. 64p.

Freitas, A., Cavalcante, M., Locali, E., Antonioli, R., Domingues A. y Machado. M. 2004. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. Virus Reviews & Research 9 (1) 246-247.

Freitas, A., Kitajima, E., Locali, E., Antonioli, L., Bastianel M. y Machado, M. 2005. Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. En: Annals XLV Annual Meeting of the American Phytopathological Society (APS). Caribbean Division. San Jose. pp. 93.

Gómez, E., Rivadameira, V., Locali, E., Freitas, A., Astúa, G., Rodrigues, J., Mesa N. y Kitajima, E. 2005. First report of citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz, Bolivia. Plant Dis. 89 (6) 686.

Kitajima, E., Ferreira, Freitas A. J. y Machado, M. 2004. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. Summa Phytopathol. (30) 68.

Lenis, B.; Angel, J. (2010). Evaluación de iniciadores para la detección del vírus de la leprosis de los cítricos mediante la técnica Transmisión Reversa Reacción en Cadena de La Polimerasa. Universidad Francisco de Paula Santander. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. 134 p.

León, G. 2001. Insectos de los cítricos. Guía ilustrada de plagas y benéficos con técnicas para el manejo de los insectos dañinos. Ed. Produmedios. Bogotá.

León, G., O. Realpe, M. Carreño, B. Garzón y P. Campos. 2005. La Leprosis de los cítricos. Plegable divulgativo N°43. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Corpoica. Villavicencio, Colombia.

León, G., Kitajima E., A. Freitas, C. Childers, D. Achor, R. Salarolli y C. Mesa. 2006. Occurrence of Citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. American Phytopatological Society. Plant Dis. Note. 90 (5) 682.

León, G., Kitajima, E., Freitas, A., Machado, M., Meza, N. 2006. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia. Rev. Corpoica 7 (2) 67-72.

León, G., H. Becerra, R. Salarolli y E. Kitajima. 2008. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus Cytoplasmatic type (CiLV-C) in Colombia. APS. Plant Disease, Disease Note 92 (9) 1364.

León, G. 2012. Current status of the citrus leprosis virus (CiLV-C) and its vector *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). Agronomia Colombiana. 30 (2) 242-250.

MADR, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Asohofrucol 2002. Acuerdo de competitividad de la cadena productiva de los cítricos. Bogotá.

Mejia, L., A. Paniagua, N. Cruz, M. Porras y M. Palmieri. 2005. Citrus leprosis, disease that endangers plantations in Guatemala. En: Annals Annual Meeting of American Phytopathological Society, Caribbean Division. pp. 17-19.

NAPPO, 2005. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Sistema de Aletra Fitosanitaria. Detección de la Leprosis en el estado de Chiapas, México, http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=165; consulta: enero de 2010.

Nunes, A., de Oliveira, A., de Oliveira, M., Kitajima, E., Hilf, M., Gottwald, T., and Freitas-A., J. 2012. Transmission of Citrus leprosis virus C by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to alternative host plants found in citrus orchards. Plant Dis. (96) 968-972.

Posada, L. 1989. Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Boletín técnico No. 43. Cuarta edición 622 p.

Roy, A., Choudhary, N., Leon, G., Shao, J., Govindarajulu, A., Achor, D., Wei, G., Picton, D., Levy, L., Nakhla, M., Hartung, J. and Brlansky, R. 2013. A Novel Virus of the Genus Cilevirus Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis. Phytophatology. 103 (5) 488-500

Rodrigues, C., K. Derrick, D. Achor, J. French, W. Welbourn, R. Ochoa y E. Kitajima. 2003. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. Exp. Appl. Acarol. 30 (1-3) 181-202.

Rodrigues, J.C.; Childers, C. 2013. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. Experimental and Applied Acarology. 59: 165-175

Spegazzini, C. 1920. Sobre enfermedades y hongos que afectan las plantas de agrios en el Paraguay. Annales de la Sociedad Científica Argentina 90: 155-188.

Zuluaga, I. 1971. Lista preliminar de ácaros de importancia en Colombia. Acta Agronómica, Universidad Nacional de Colombia, Palmira. 21: 3 (119-132).

1. Parámetros de transmisión del virus de las leprosis de los cítricos por ácaros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)

Resumen

En este capítulo se profundiza en la cuantificación de parámetros de transmisión del CiLV, por medio de pruebas de transmisión con el ácaro *Brevipalpus phoenicis*. Al evaluar períodos de adquisición del virus entre 10 minutos y 72 horas, se encontró que los ácaros adquieren eficientemente el CiLV después de 30 minutos de alimentación sobre hojas de naranja valencia con síntomas de la leprosis. Sólo los tratamientos con tiempo de adquisición de 2 y 6 horas mostraron detección positiva por técnica RT-PCR en ácaros. El tiempo requerido por el ácaro para transmitir el virus hacia hojas de naranja valencia (*Citrus sinensis* L.), fue de 10 minutos. Para períodos de transmisión de 10 y 20 minutos, 25% de las hojas mostró síntomas de la enfermedad. Para 30 y 60 minutos, 50% de hojas presentó síntomas. Con 2 horas de transmisión, el 56,25% de las hojas mostraron síntomas de la infección y con 6 horas de transmisión, el 68,75% de las hojas presentó síntomas de leprosis. Después de cinco días de adquisición del virus sobre hojas de naranja valencia, el 40% de las poblaciones de ácaros *B. phoenicis* evaluadas resultaron infecciosas, mediante prueba molecular RT-PCR.

Palabras clave: Cítricos, adquisición, transmisión, población infecciosa, CiLV.

Abstract

This chapter explores the quantification of CiLV transmission parameters by *Brevipalpus phoenicis*, through transmission tests. Results of evaluation the virus acquisition periods between 10 minutes and 72 hours, shown that mite efficiently acquires CiLV after 30 minutes on valencia orange (*Citrus sinensis* L.) leaves with leprosis symptoms. Only

treatments of 2 and 6 hours of acquisition time showed positive detection by RT-PCR tests in mites. The virus transmission period required by the mite was 10 minutes. For periods of 10 and 20 minutes, 25% of valencia orange leaves showed symptoms of the disease. For 30 and 60 minutes, 50% of leaves showed symptoms. With 2 hours of transmission 56.25% had symptoms of infection and with 6 hours of transmission 68.75% of the leaves showed symptoms of leprosis. By RT-PCR test, after five days of acquisition time on valencia orange leaves, *B. phoenicis* mites showed 40% of virus populations infected.

Keywords: Citrus, acquisition, transmission, infect population, CiLV

1.1. Introducción

El virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C), es un problema fitosanitario de importancia económica y cuarentenaria, que representa millones de dólares en daños a los cultivos de cítricos en los países donde se ha logrado establecer; afecta principalmente naranjos y mandarinos y se encuentra reportada únicamente en Suramérica, Centro América (Rodrigues *et al*. 2001) y el sur de México (NAPPO, 2005). La relevancia del CiLV-C, radica en que además de afectar severamente la producción, por ser cuarentenaria genera restricciones para el mercadeo internacional de cítricos y algunos productos agropecuarios, especialmente en países de Norteamérica, Europa y Asia que no poseen la enfermedad.

El principal transmisor del virus de la leprosis de los cítricos, es el ácaro rojo plano *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae), el cual está ampliamente distribuido en el mundo. El ácaro *B. phoenicis* es reconocido como la especie más perjudicial en áreas productoras de cítricos donde el virus ha sido reportado; es una especie polífaga, dispersa en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo (Carvalho, 2008; Chagas , Rosseti, 1983; Childers, *et al*., 2003; Maia y Oliveira, 2002). Aun cuando el género *Brevipalpus* tiene más de 300 especies, únicamente las especies *B. phoenicis*, *B. obovatus* Donnadieu y *B. californicus* (Banks), están registradas como vectores del virus de la leprosis CiLV-C.

En Colombia, el ácaro rojo plano *B. phoenicis*, se reconoce como el principal vector del virus y se encuentra diseminado por todas las regiones geográficas del país. Aun cuando este ácaro se encuentra reportado desde hace más de tres décadas en varias zonas citrícolas, el virus no había sido registrado antes del año 2004 en Colombia (León *et al*., 2005).
Childers *et al.* (2003) y USDA, (2004) afirman que la enfermedad fue descrita por primera vez en Florida, Estados Unidos en 1901 y se denominaba “escama de la corteza”. La leprosis casi destruye la citricultura de la Florida antes de 1925, pero no se volvió a registrar desde 1968. En Sur América fue identificada por primera vez en Paraguay por Spegazzini, (1920), y se denominó “lepra explosiva”; en un corto período la enfermedad fue observada en Argentina, y en 1931 fue reportada en Sao Paulo, Brasil, en hojas de naranjo (*Citrus sinensis*) de la variedad “Bahía” (Bastianel *et al.* 2006).

Durante los últimos años la leprosis de los cítricos, ha causado pérdidas económicas en Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Venezuela, Costa Rica, Panamá y Honduras. La enfermedad fue recientemente reportada en Guatemala, Perú, Bolivia y Colombia. (Locali *et al.* 2003; Saavedra *et al.* 2001; Mejía *et al.,* 2005; Gómez *et al.* 2005; León *et al.,* 2006). La leprosis de los cítricos fue reportada en Costa Rica por Araya (2000), en Panamá por Saavedra *et al*., (2001), en Guatemala por Mejía *et al*., (2005), en Bolivia por Gómez *et al*., (2005) y en Honduras por Rodrigues *et al*., (2007). Según Rodrigues *et al.,* (2001) y Freitas *et al*., (2004), en Brasil es considerada la enfermedad viral más importante en cítricos porque los costos del control del ácaro transmisor suman cerca de 100 millones de dólares al año.

En Colombia la presencia de la leprosis de los cítricos fue confirmada oficialmente en el año 2004 y para el año 2005 ya se encontraba ampliamente distribuida en los Departamentos del Meta y Casanare (Becerra *et al*., 2007; León *et al*., 2006). El área sembrada en cítricos en el departamento del Meta es aproximadamente 4.300 ha, y la producción calculada de $180.000 millones de pesos anuales, por lo cual se deberían desarrollar programas de control, MADR (2002). Posteriormente, el Instituto Colombiano Agropecuario ICA ha encontrado leprosis en Ibagué Tolima (Bastianel *et al*., 2010).

Existen múltiples interacciones que ocurren entre las plantas hospederas, los ácaros vectores y el virus transmitido por ellos. Por tanto, es necesario entender la biología del ácaro *B. phoenicis*, sus hábitos de alimentación, la supervivencia del virus y las formas

de difusión y transmisión (Rodrigues, 2000). El estudio de la habilidad del ácaro *B. phoenicis*, para transmitir el virus de la leprosis de los cítricos, se basa, además de los factores biológicos intrínsecos del vector, en la eficacia de la transmisión del CiLV-C, determinada por factores como los tiempos de adquisición y transmisión del virus, la persistencia del virus en la planta huésped y la capacidad de la enfermedad para diseminarse (Bastianel, *et al*., 2006; Rodrigues y Childers, 2013).

El ácaro rojo plano, *B. phoenicis* pasa por los estados de huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto. Cada estado de desarrollo tiene fases de quietud y alimentación. Se reproduce de forma asexual por partenogénesis teliotoquia; la reproducción sexual es menos común (Chiavegato, 1996). *B. phoenicis* mide aproximadamente 0,3 mm de largo, forma ovalada, cuerpo aplanado, con su parte anterior más ancha que la posterior y color rojo oscuro, con manchas un poco más claras sobre el dorso de su cuerpo; se ubican en el envés de las hojas y en los frutos; durante los estados de ninfa y adulto poseen 8 patas, mientras en su estado larval solo 6 patas. Los huevos son redondos, anaranjados y puestos individualmente en los rebrotes, los frutos o en el envés de las hojas (Chiavegato, 1996; León *et al*., 2006).

La longevidad de las especies de *Brevipalpus spp.,* es dos o tres veces más larga que la de varios Tetraniquidos. De acuerdo a Haramoto (1969), bajo condiciones ambientales favorables (25°C y 65-70% HR), el ciclo completo de *B. phoenicis* dura 25 días. Cada hembra puede colocar de uno a cuatro huevos por día durante 20 días aproximadamente, con lo cual se pueden presentar varias generaciones por año.

Según Sadana y Kumari (1991), el desarrollo de *B. phoenicis* en limón (*Citrus lemon*) está influenciado por la temperatura y la humedad relativa. Con temperaturas de 25 a 30°C y humedad relativa de 70%, el tiempo de desarrollo del ácaro fue más corto, el período de ovoposición más largo y la fecundidad, así como la viabilidad de los huevos fue mejor. La duración del ciclo de vida de *B. phoenicis* a temperatura promedio de 27,6±0,7°C y humedad relativa de 69±7,9% fue: huevo 4 a 6 días; larva 3 a 4 días; protoninfa 5 a 7 días; deutoninfa 6 a 8 días y adulto 21 a 24 días. De acuerdo a estos datos, el ciclo de huevo a adulto demora entre 18 a 25 días y el estado adulto dura en promedio más de 21 días (León *et al*., 2006).

El ácaro *B. phoenicis* se presenta en todos los órganos aéreos de las plantaciones. Las hojas son consideradas el mayor reservorio, pero el mayor número de ácaros se sitúa en los frutos. En el Sureste de Brasil, durante las épocas lluviosas, el número de ácaros tiende a disminuir (Oliveira, 1996; Rodrigues *et al*., 2001).

Para encontrar protección contra las lluvias y enemigos naturales, el ácaro *B. phoenicis* se asocia con la roña *Elsinoe fawcettii*, o con lesiones en la superficie de las hojas ramas o frutos (Kitajima *et al*., 1972). Cuando *B. phoenicis* coloniza las frutas afectadas con lesiones de roña, su desarrollo es mejor que en las hojas sanas y completa su fase inmadura en menor tiempo: 14,4 días sobre frutos y 17,6 días sobre hojas de naranja "Pera de Río"; al mismo tiempo la fecundidad fue mayor en frutos que en hojas con promedios de 39,2 y 8,6 huevos por hembra respectivamente (Chiavegato, 1996).

La capacidad de dispersión de *B. phoenicis* es relativamente limitada comparada con otras especies de ácaros en cítricos. El ácaro rojo plano se mueve menos de 1 cm al día y solo el 3% alcanza distancias de 40 a 50 cm; vientos con velocidad de 30 a 40 km h^{-1} solamente dispersan menos del 1% de los ácaros situados en frutos (Alves *et al*., 2005).

En cuanto a la habilidad de transmisión del CiLV-C, el ácaro *B. phoenicis* inyecta y succiona saliva tóxica en frutos, hojas, ramas y otros tejidos de numerosas plantas, lo cual se asocia con la transmisión del virus (Chagas *et al*., 1983; Kitajima *et al*., 2003). Se afirma además, que el ácaro puede transmitir virus durante toda su vida, aunque recientes trabajos (Nicolini *et al*., 2007) confirman que el virus circula pero no se replica dentro del ácaro vector.
Según Chagas *et al.,* (1983), las larvas del ácaro transmiten fácilmente la enfermedad con un 48,3%; las ninfas y adultos son menos eficientes en la transmisión y un período de 2 días de alimentación es suficiente para que el ácaro adquiera y transmita el virus. Boareto *et al*., (1993) afirman que no hay transmisión transovárica del virus de una hembra adulta infectada hacia su descendencia.

De acuerdo a Chiavegato (1996), los síntomas se tornan visibles de 15 a 60 días después que la infección ha sido transmitida por el ácaro. De acuerdo con León *et al*., (2006) las lesiones crecen de 5-7 mm de diámetro cada 15-20 días; cuando la severidad es mayor al 30%, la caída de las hojas afectadas ocurre en promedio 70 días después de

la aparición de la primera lesión. Cuando los ácaros del género *Brevipalpus* transmiten virus, inducen en las plantas hospederas lesiones con apariencia de clorosis o necrosis localizadas en el sitio de alimentación (Colariccio *et al*., 1995; Kitajima *et al*., 2004; Rodrigues *et al*., 2003).

Los tejidos de hojas sintomáticas de leprosis, presentan partículas virales, pero dichas partículas no se encontraron en las áreas asintomáticas de los alrededores (Kitajima *et al*., 1972; Kitajima *et al*., 2003); esto indica que el virus no se disemina sistémicamente en el hospedero, lo cual fue corroborado por medio de pruebas de RT-PCR (Locali *et al*., 2004). La dispersión de la enfermedad en la planta ocurre a través del movimiento de los ácaros virulíferos dentro de la plantación y es una consecuencia de sus hábitos de alimentación (Rodrigues *et al*., 2001).

En cuanto a los efectos de las lesiones causadas por CiLV-C en células de las hojas, (Gomes *et al*., 2004) reporta ausencia de hiperplasia e hipertrofia en lesiones jóvenes, pero la mayoría de las células con presencia de viroplasmas y partículas virales; en cambio, en las lesiones maduras, encontró hiperplasias e hipertrófias en la mayoría de las células afectadas, pero menos del 1% de estas células contenían viroplasmas o viriones. Esto implica que en la extracción de material viral para procesos moleculares, es mejor la utilización de lesiones jóvenes.

Dado que el conocimiento de los parámetros que inciden en la transmisión del CiLV-C, es fundamental para comprender cómo se disemina la enfermedad, en este trabajo se profundiza mediante pruebas de transmisión, en la cuantificación del tiempo de adquisición del virus, el porcentaje de ácaros infectados por el virus y el tiempo requerido por el acaro *B. phoenicis* para transmitirlo. Los resultados obtenidos, proveen bases para ampliar el conocimiento de las interacciones planta - virus - vector, lo cual es fundamental para el establecimiento de programas de prevención y manejo de la enfermedad.

1. 2. Metodología

La eficiencia de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) por el ácaro *B. phoenicis*, se estudió en el Centro de Investigación La Libertad de CORPOICA, ubicado en el Departamento del Meta, dentro de casas de malla, por medio de pruebas

controladas de transmisión, con ácaros *B. phoenicis* y plantas de naranja valencia (*C. sinensis*). Para ello se siguieron los siguientes pasos:

1.2.1. Establecimiento de colonias de ácaros *B. phoenicis*

Se colectaron ácaros *B. phoenicis* en árboles sin síntomas de leprosis del huerto experimental de naranja valencia (*C. sinensis*) del C.I. La Libertad. Los ácaros colectados, fueron llevados al laboratorio de entomología y se ubicaron con la ayuda de pinceles finos y estereoscopios sobre frutos de naranja valencia.

Para establecer las colonias, los ácaros colectados se ubicaron en la parte superior de frutos de naranja valencia, con lesiones de roña o daños de insectos, lo cual favorece el establecimiento y la reproducción de los ácaros y es modificación de la metodología utilizada por Locali *et al*., (2006). Los frutos se demarcaron previamente con una línea de tinta indeleble en su parte ecuatorial y sobre dicha línea se aplicó vaselina para lograr el confinamiento de los ácaros en la parte superior de cada fruto. Los frutos se ubicaron en bandejas de plástico y se mantuvieron en el laboratorio a condiciones ambientales favorables para el desarrollo de las colonias, a temperatura promedio de 25 +/- 4°C y humedad relativa de 80 +/- 8% (Figura 1-1).

Para garantizar el establecimiento de las colonias de ácaros libres del CiLV-C, se utilizó como colonia inaugural, la progenie descendiente de la población colectada en campo. Cada vez que los frutos iniciaron su deshidratación, fueron reemplazados por frutos más frescos, sobre los cuales se trasladaron los ácaros desde el fruto inservible, siguiendo la metodología descrita, con lo cual se garantizó el establecimiento y desarrollo de las poblaciones, así como la cantidad de individuos requeridos para las pruebas de transmisión.

Figura 1-1: Aspecto de las colonias del ácaro *Brevipalpus phoenicis* sobre frutos de naranja valencia. Laboratorio de entomología de CORPOICA - C.I. La Libertad.

1.2.2. Siembra y mantenimiento del material vegetal

La especie de planta receptora utilizada para estos estudios fue naranja valencia (*C. sinensis*.). Los arboles requeridos para las pruebas de transmisión, fueron sembrados individualmente por semilla en materas y mantenidos en confinamiento libres del virus CiLV-C bajo condiciones de casa de malla en el C.I. La Libertad de CORPOICA. Una vez establecidas las colonias del acaro y las plantas receptoras disponibles, se procedió a realizar las pruebas de transmisión del CiLV-C, para determinar los parámetros más importantes del proceso de transmisión del virus de la leprosis.

1.2.3. Pruebas de diagnóstico

Para determinar la efectividad de las pruebas de transmisión, periódicamente se realizaron observaciones directas sobre las plantas utilizadas. Las hojas que presentaron síntomas de la enfermedad, fueron colectadas y codificadas para efectuar posteriormente el diagnóstico y detección del CiLV-C, por medio de análisis moleculares RT-PCR. Los ácaros utilizados en la prueba de transmisión para determinar el tiempo de adquisición y el porcentaje de población infecciosa fueron colectados y almacenados en etanol 90% para realizar sobre ellos detección molecular del virus.

Las variables relacionadas con la transmisión del virus, fueron período de adquisición, período de transmisión y porcentaje de población infecciosa. Estas variables se ejecutaron de la siguiente manera:

- **Período de adquisición:** El tiempo requerido para que un acaro adquiera partículas virales al alimentarse de tejido infectado con CiLV-C, se determinó bajo condiciones de confinamiento en el laboratorio de entomología del C.I. La Libertad de CORPOICA. Se evaluaron 9 tratamientos correspondientes a diferentes períodos de adquisición (0, 10, 30, 60 minutos; 2, 6, 24, 48 y 72 horas), en un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental (UE) estuvo constituida por una hoja de naranja valencia con lesiones de leprosis, colectada de árboles positivos a CiLV-C e infestada con 10 ácaros de la especie *B. phoenicis*. Los ácaros se ubicaron sobre las lesiones de cada hoja, con la ayuda de estereoscopios y pinceles de punta fina (Figura 2). El pecíolo de las hojas fue delimitado con vaselina, para confinar los ácaros; las hojas se colocaron sobre viales de vidrio con agua destilada para mantener humedad durante el tiempo de experimentación (Figura 1-2).

Una vez cumplido el período de adquisición de cada tratamiento, los ácaros se capturaron y se colocaron durante tres días en alimentación sobre plantas de naranja valencia sanas, para permitir la transmisión del virus. Cumplido este tiempo, se recolectaron los ácaros y se realizó una prueba de detección molecular RT-PCR para diagnosticar la presencia de partículas virales en su cuerpo.

Figura 1-2: Ubicación de ácaros *Brevipalpus phoenicis* sobre lesiones de leprosis en hojas de naranja valencia. Laboratorio de entomología de CORPOICA - C.I. La Libertad.

Las plantas receptoras se conservaron para observación durante dos meses y las hojas se calificaron de acuerdo a la aparición o ausencia de síntomas de la enfermedad. Los resultados obtenidos, sobre aparición de síntomas en hojas, se analizaron estadísticamente mediante una regresión logística, para establecer el efecto del período de adquisición sobre la probabilidad de la presencia de síntomas de la enfermedad.

- **Período de transmisión:** El tiempo requerido para que el ácaro *B. phoenicis* pueda transmitir el CiLV-C después de su adquisición, fue evaluado bajo condiciones de invernadero en el C.I. La Libertad, en plantas de naranja valencia. Los ácaros utilizados en estas pruebas, se alimentaron previamente durante 48 horas sobre hojas de naranja valencia positivas al CiLV-C, para permitir la adquisición del virus. Luego de este periodo, los ácaros se trasladaron a plantas de naranja valencia sanas, para evaluar la transmisión del virus en diferentes tiempos. El experimento, consistió de 8 tratamientos correspondientes a diferentes períodos de transmisión (0, 10, 20, 30, 60 minutos; 2, 6 y 24 horas), en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental la constituyó una planta de naranja valencia. Para efectuar las transmisiones, se utilizaron las cuatro hojas más jóvenes de cada planta; cada hoja constituyó una unidad de muestreo y sobre cada una de ellas se ubicaron 10 ácaros, con ayuda de un pincel de punta fina. Los ácaros se confinaron mediante la aplicación de vaselina en la base de las hojas expuestas para evitar su escape.

Luego de cumplido el período de transmisión de cada tratamiento, los ácaros se retiraron con un pincel y las plantas se dejaron en observación durante dos meses, o hasta la aparición de síntomas de leprosis. Los datos obtenidos se analizaron inicialmente mediante una prueba de dependencia de Chi^2 y posteriormente se ajustó un modelo de regresión logística, para establecer el efecto del período de transmisión sobre la probabilidad de aparición de síntomas. Para el tiempo de aparición de síntomas se efectuó análisis de varianza y prueba de Tukey. Las hojas sintomáticas se colectaron para realizar pruebas moleculares RT-PCR y comprobar la presencia del virus en ellas.

- **Porcentaje de población infecciosa:** El porcentaje de población infecciosa, se refiere al porcentaje de ácaros que luego de un tiempo de adquisición prudencial

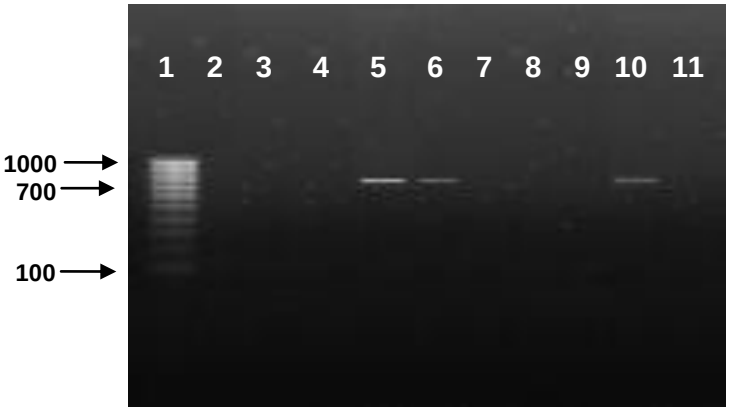
presentan partículas virales dentro de su cuerpo. Para esta prueba se utilizaron 10 grupos de 50 ácaros *B. phoenicis* por grupo. Cada grupo se colocó en alimentación sobre hojas de Naranja Valencia positivas al virus, bajo condiciones de confinamiento en el laboratorio de entomología de CORPOICA en el C.I. La Libertad. Los ácaros se situaron sobre las lesiones durante 5 días para asegurar la probabilidad de adquisición del CiLV-C y cumplido este tiempo, fueron colectados en viales de vidrio con etanol 90%, para evaluar el porcentaje de virulencia de cada grupo mediante técnica RT-PCR según metodología desarrollada por Kubo *et al*., (2011).

1.3. Resultados y Discusión

1.3.1. Período de adquisición

Los resultados de detección molecular RT-PCR, para determinar la presencia del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) en ácaros *B. phoenicis* con diferentes períodos de adquisición del virus, muestran que únicamente dos de los ocho tiempos evaluados resultaron positivos (Líneas 5 y 6 que corresponden a los tratamientos de 2 y 6 horas) (Figura 1-3). De acuerdo a los resultados de la prueba molecular, la detección del CiLV-C en ácaros con la técnica RT-PCR, es posible después de un período de adquisición de dos horas, no obstante que en tratamientos con mayor tiempo de adquisición, la detección del virus en ácaros haya resultado negativa.

Figura 1-3: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en ácaros *B. phoenicis* expuestos a diferentes períodos de adquisición. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV, **línea 2:** 10 min, **línea 3:** 30 min, **línea 4:** 60 min, **línea 5:** 2 horas, **línea 6:** 6 horas, **línea 7:** 24 horas, **línea 8:** 48 horas, **línea 9:** 72 horas, **línea 10:** Control positivo, **línea 11:** Control negativo.



La concentración de RNA total en cada uno de los tratamientos evaluados, fue determinada con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 Thermo scientific, (Tabla 1-1). En el presente estudio, se determinó por cuantificación en espectrofotometría que la menor concentración detectable, fue de 132,7 ng/ µl.; para mayores concentraciones, fue positiva la detección del virus mediante pruebas moleculares RT-PCR, en todos los casos.

Tabla 1-1: Concentración de RNA total presente en extracciones de ácaros *B. phoenicis*.

Período de Adquisición	Concentración de RNA total ng/ µl
T1 - 10 min	2,1
T2 - 30 min	4,5
T3 - 60 min	5,0
T4 - 2 h	311,7
T5 - 6 h	146,9
T6 - 24 h	34,6
T7 - 48 h	44,7
T8 - 72 h	37,9

Al evaluar la aparición de síntomas en las plantas de naranja valencia expuestas al ácaro *B. phoenicis* con diferente período de adquisición, los resultados mostraron síntomas visuales de la leprosis en siete de los ocho tratamientos, con excepción del tratamiento de menor tiempo de adquisición de 10 minutos (Tabla 1-2). En los tratamientos de 30 min y 2 h de adquisición, se observó aparición de síntomas de la enfermedad en 75% de las hojas expuestas al ácaro. Para los tratamientos de 60 min, 6 h, 48 h y 72 h, de período de adquisición, el 50% de las hojas mostró aparición de síntomas del virus. Únicamente el tratamiento de 24 h de adquisición, presentó 100% de las hojas expuestas al ácaro, con síntomas de leprosis de los cítricos. Estos resultados complementan las observaciones de Chagas *et al.*, (1983) quienes observaron que un período de 2 días de alimentación es suficiente para que el ácaro adquiera el virus.

Tabla 1-2: Porcentaje de plantas de naranja valencia con síntomas de leprosis con relación a diferentes períodos de adquisición del virus por *B. phoenicis*.

Período de Adquisición	Plantas con síntomas (%)
T1 - 10 min	0
T2 - 30 min	75
T3 - 60 min	50
T4 - 2 h	75
T5 - 6 h	50
T6 - 24 h	100
T7 - 48 h	50
T8 - 72 h	50

Con base en el análisis de regresión logística para la aparición de síntomas en función del período de adquisición, se pudo establecer que no existe efecto significativo del tiempo de adquisición, sobre la probabilidad posterior de aparición de síntomas en hojas expuestas a ácaros *B. phoenicis* (Anexo C). Esto implica que el ácaro vector consigue adquirir el CiLV-C, sobre hojas de naranja valencia con síntomas de leprosis, después de 30 min de alimentación y por consiguiente podrá transmitir el virus posteriormente.

Con respecto al tiempo de aparición de las lesiones de leprosis, después de los períodos de adquisición evaluados y tres días de transmisión, los primeros síntomas en hojas de naranja valencia, se observaron dentro de un rango de 16 y 30 días, lo cual está de acuerdo con Locali *et al.,* (2006), quienes observaron síntomas en naranja “pera” después de 17 y 21 días de exposición a ácaros infectados.

1.3.2. Período de transmisión

Al evaluar el tiempo requerido por el CiLV-C para ser efectivamente transmitido por el ácaro *B. phoenicis* hacia plantas de naranja valencia, después de un período de adquisición de 48 horas, se encontró transmisión y aparición de síntomas de leprosis en todos los tiempos de trasmisión evaluados.

Para períodos de transmisión de 10 y 20 minutos, el 25% de las hojas mostró síntomas de la enfermedad. Para los tratamientos de 30 y 60 minutos, 50% de las hojas presentó síntomas de leprosis. El tratamiento de 2 horas de transmisión mostró 56.25% de las hojas con síntomas de la enfermedad; para el tratamiento de 24 horas de transmisión, 62.5% de las hojas mostró sintomatología y en el tratamiento de 6 horas de transmisión, el 68.75% de las hojas mostró síntomas de infección por leprosis.

Mediante regresión logística, se logró explicar el efecto del tiempo de transmisión sobre la probabilidad de aparición de los síntomas del CiLV-C en hojas de naranja valencia. El modelo ajustado (α = 0.082) (Anexo D-1), corresponde a la siguiente expresión:

$$P = 1 / 1 + e^{(0.278 - 0.0007\ t)}$$

En donde:

P = Probabilidad de aparición de síntomas

t = Período de transmisión.

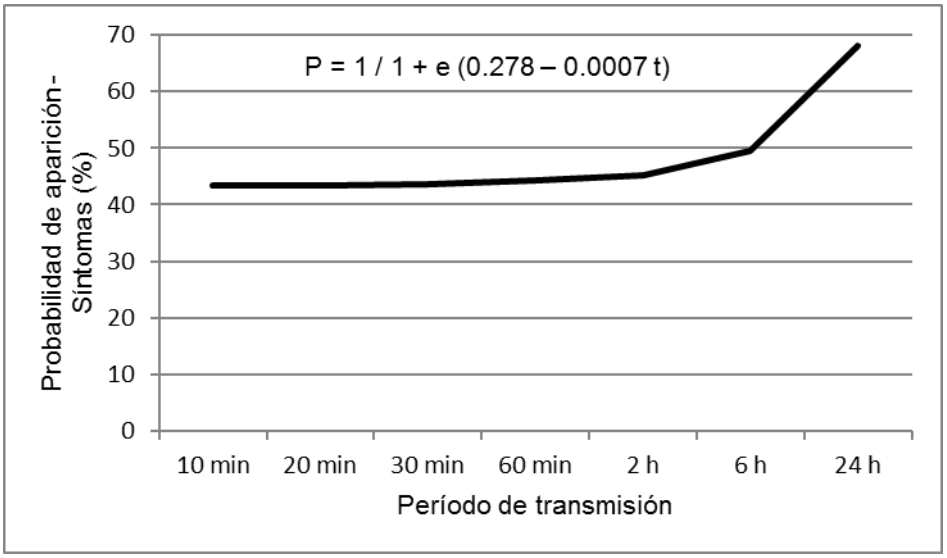
Con base en el modelo desarrollado, se establecieron las probabilidades de aparición de síntomas para cada uno de los períodos de transmisión evaluados en el experimento. En la tabla 1-2, se presentan las probabilidades estimadas asociadas con cada uno de los tiempos de transmisión.

Tabla 1-3: Probabilidad estimada de aparición de síntomas del virus de la leprosis de los cítricos en función del período de transmisión.

Período de Transmisión	Probabilidad de aparición de Síntomas (%)
10 min	43.3
20 min	43.4
30 min	43.6
60 min	44.2
2 h	45.2
6 h	49.6
24 h	68.2

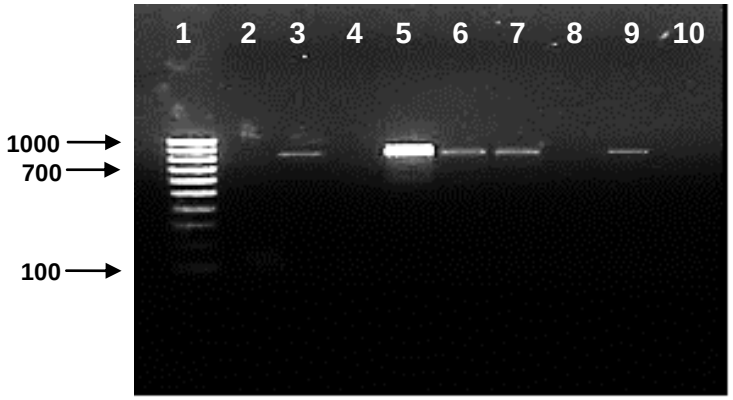
De acuerdo al modelo ajustado, la probabilidad de aparición de síntomas se incrementa cuando el período de transmisión es mayor, y sustancialmente luego de 24 horas. Para tiempos entre 10 minutos y 6 horas, el porcentaje no cambia de manera considerable, con una probabilidad estimada entre 43,3 % y 49.6% respectivamente. A las 24 horas de transmisión, la probabilidad de aparición se incrementa apreciablemente hasta el 68.2% (Figura 1-4). Los resultados permiten afirmar que el ácaro *B. phoenicis* puede transmitir eficientemente el virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C, después de 10 minutos de permanencia sobre hojas sanas de naranja valencia y después de 24 h, se incrementan las posibilidades de transmisión por encima de 68.2%.

Figura 1-4: Probabilidad estimada de aparición de síntomas del virus de la leprosis de los cítricos en función del tiempo de transmisión.



Al efectuar la prueba molecular RT-PCR, para lesiones de leprosis encontradas en hojas de naranja valencia expuestas a diferentes períodos de transmisión del virus, se encontró detección del CiLV en cuatro de los siete períodos evaluados. En el gel de agarosa 1% resultante del análisis molecular, se observa que los tratamientos positivos amplificaron en las líneas 3, 5, 6, y 7, las cuales corresponden a tiempos de transmisión de 20 min, 60 min, 2 h y 6 h (Figura 1-5).

Figura 1-5: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en hojas de naranja valencia expuestas a diferentes períodos de transmisión. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV, **línea 2:** 10 min; **línea 3:** 20 min, **línea 4:** 30 min, **línea 5:** 60 min, **línea 6:** 2 h, **línea 7:** 6 h, **línea 8:** 24 h, **línea 9:** Control positivo, **línea 10:** Control negativo.



El diagnóstico molecular por RT-PCR para ácaros *B. phoenicis*, resultó positivo para las muestras de los mismos cuatro tratamientos positivos en hojas, lo cual permite aseverar que los ácaros que lograron adquirir el virus, en un tiempo de 48 horas, lograron la transmisión efectiva del virus después de 20 minutos. Si relacionamos los tratamientos positivos con las concentraciones virales encontradas en cada una de las extracciones de las hojas sintomáticas y de ácaros (Tabla 1-3), se observa que la detección fue positiva en todos los casos de concentraciones mayores de 187,6 ng/ µl.

Figura 1-6: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en ácaros *B. phoenicis* con período de adquisición de 48 h y diferentes tiempos de transmisión. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV, **línea 2:** 10 min, **línea 3:** 20 min, **línea 4:** 30 min, **línea 5:** 60 min, **línea 6:** 2 h, **línea 7:** 6 h, **línea 8:** 24 h, **línea 9:** Control positivo, **línea 10:** Control negativo.

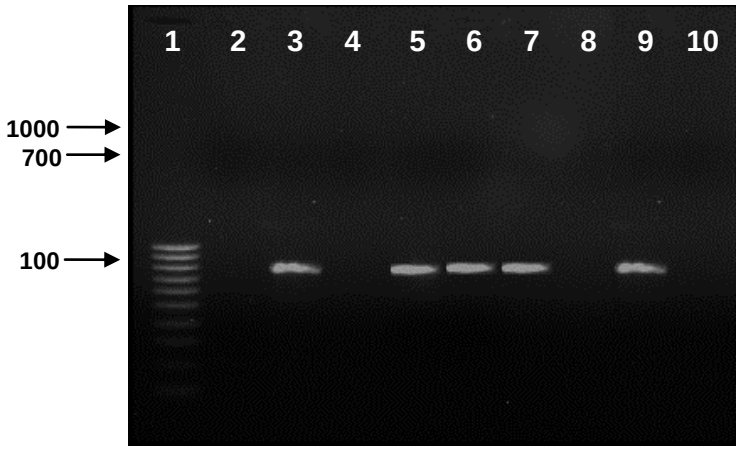


Tabla 1-4: Concentración de RNA total de ácaros *B. phoenicis* y de tejido sintomático de hojas de naranja valencia expuestas a diferentes períodos de transmisión.

Tiempo de Transmisión	Concentración de RNA total en ácaros ng/ µl	Concentración de RNA total en hojas ng/ µl
10 min	35,7	56,7
20 min	187,6	192,4
30 min	11,0	14,6
60 min	432,8	422,1
2 h	210,5	211,5
6 h	199,5	206,8
24 h	3,4	2,6

La aparición de los primeros síntomas de leprosis en hojas de naranja valencia, al ser expuestas al ácaro *B. phoenicis* en períodos de transmisión entre 10 minutos y 24 horas, se presentó a partir de 14 días, con un máximo de 32 días. El análisis estadístico sobre la variable dependiente días de aparición de síntomas, no mostró diferencias significativas al efectuar la prueba de Tukey con nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$) (Anexo D-2).

Estas observaciones, sobre el tiempo de aparición de los primeros síntomas, amplían lo afirmado por Locali *et al.,* (2006), quienes registran aparición de síntomas entre los 17 y 21 días. Otros autores (Freitas, *et al*. 2003.; Freitas, *et al*. 2004; Knorr, 1968) reportan que los síntomas iniciales se pueden observar entre los 17 a los 60 días.

1.3.3. Porcentaje de población infecciosa

Al efectuar el diagnóstico molecular mediante técnica RT-PCR, sobre 10 grupos de 50 ácaros *B. phoenicis*, expuestos a un período de cinco días de adquisición del CiLV, únicamente cuatro grupos (G3, G4, G5 y G10) resultaron positivos (líneas 4, 5, 6 y 11) (Figura 1-7).

Este resultado, significa que solamente el 40% de la población de ácaros *B. phoenicis* adquiere el virus de la leprosis, cuando están expuestos durante cinco días sobre hojas de naranja valencia con síntomas de la enfermedad. Estos resultados complementan las observaciones de Rodrigues y Childers (2013), quienes encontraron que los porcentajes de transmisión para hembras adultas de *B. phoenicis* no superan el 11%. Otros autores como Chagas *et al*., (1983) y Chiavegato (1996), habían reportado porcentajes de transmisión cercanos al 8%.

Figura 1.7: Detección del virus de la leprosis de los cítricos para diez grupos de ácaros *B. phoenicis*. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV, **línea 2:** G1, **línea 3:** G2, **línea 4:** G3, **línea 5:** G4, **línea 6:** G5, **línea 7:** G6, **línea 8:** G7, **línea 9:** G8, **línea 10:** G9, **línea 11:** G10, **línea 12:** Control positivo y **línea 13:** Control negativo.

Al efectuar la lectura de la concentración de virus, en cada una de las extracciones de RNA de ácaros *B. phoenicis***,** se observa que las concentraciones obtenidas se encuentran entre el rango 15,9 y 562,8 ng/µl (Tabla 1-5). Las extracciones de RNA total con valor superior a 243,6 ng/µl, resultaron positivas, mientras que las menores a 77,9 resultaron negativas a la detección del virus CiLV-C, mediante la técnica RT-PCR.

Tabla 1.5. Concentración de RNA total extraído de 10 poblaciones de ácaros *B. phoenicis*

Población de *B.Phoenicis*	Concentración de RNA total ng/ µl
Grupo 1	32,6
Grupo 2	77,9
Grupo 3	243,6
Grupo 4	267,0
Grupo 5	356,7
Grupo 6	21,4
Grupo 7	15,9
Grupo 8	34,6
Grupo 9	63,8
Grupo 10	562,8

Los resultados obtenidos, contribuyen a explicar lo observado por Bassanezi & Laranjeira (2007), quienes al estudiar la distribución espacial del virus de la leprosis CiLV-C y su vector *B. phoenicis* en focos de huertos de cítricos encontraron muy baja correlación entre la enfermedad y el ácaro vector, debido a que solamente parte de la población es portadora del virus. Teniendo en cuenta que la eficiencia de transmisión del virus por *B. phoenicis* es muy baja, los resultados obtenidos en este estudio sobre la detección del CiLV en poblaciones del ácaro, aportan importantes herramientas para el manejo del vector y la enfermedad. Al mismo tiempo, están de acuerdo con la afirmación de Kubo *et al*., (2011) quienes manifiestan que la detección del CiLV en ácaros se debe utilizar como un instrumento importante para entender las relaciones entre virus y vector, así como para el monitoreo y diagnóstico del virus antes de la aparición de la enfermedad.

1.4. Conclusiones

De acuerdo a los períodos de adquisición del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) evaluados en este estudio, se concluye que el ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae), adquiere eficientemente el virus después de 30 minutos de alimentación sobre hojas de naranja valencia (*Citrus sinensis* L.) con síntomas de leprosis.

Teniendo en cuenta los períodos de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) evaluados en este estudio, se concluye que el tiempo requerido por el ácaro *B. phoenicis* para transmitir eficientemente el virus, fue de 10 minutos. Los porcentajes de transmisión de acuerdo a la sintomatología encontrada en hojas de naranja valencia varían entre 25% y 68.75% de hojas con síntomas de infección por leprosis.

Luego de cinco días de adquisición del virus sobre hojas de naranja valencia con síntomas de la enfermedad, las poblaciones del ácaro *B. phoenicis* mostraron solamente un 40% de población virulífera, mediante prueba RT-PCR.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, proporcionan bases técnico científicas para ampliar el conocimiento de las complejas interacciones planta - virus - vector, que suceden con el virus de la leprosis de los cítricos, lo cual es fundamental para la formulación y ejecución de programas de prevención y manejo de la enfermedad en el país.

Bibliografía

Alves, E.B.; Casarin, N.; Omoto, C. 2005. Dispersal mechanisms of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) in citrus groves. Neotropical Entomology. 34 (1) 89-96.

Araya G. J. 2000. Informe sobre la prospección de la "leprosis de los cítricos" en la zona fronteriza (Costa Rica – Panamá). Panamá: Ministerio de Agricultura y Ganadería. 5p.

Bassanezi, R. B., and Laranjeira, F. F. 2007. Spatial patterns of leprosis and ts mite vector in commercial citrus groves in Brazil. Plant Pathology. 56: 97-106.

Bastianel, M.; Freitas, A.; Kitajima, E.; Machado M. 2006. The citrus leprosis pathosystem. Summa phytophatologica, 32 (3) 211 -220

Bastianel, M., Bassanezi, R., Freitas, J., Kitajima, E., Kubo, K., Machado, M. 2010. Citrus Leprosis Centennial of an unusual mite – vírus pathosystem. Plant Disease 94 (3) 284 -293.

Becerra, H., López, V, Matheus, H., Batidas, A., A. Esteban. 2007. Monitoreo de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) vector de La leprosis de los cítricos en el Meta y Casanare. En: Resumenes XXXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología Socolen. pp. 142.

Boaretto, M.; Chiavegato L.; Silva, C. 1993. Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. Científica, São Paulo. 21 (2) 245-253,

Carvalho M.; Jeferson L.; Sato, M.; Raga, A.; Arthur, V. 2008. Population dynamics of phytophagous and predaceous mites on coffee in Brazil, with emphasis on Brevipalpus phoenicis. Experimental & Applied Acarology. 44 (4) 277-291.

Colariccio, A.; Lovisolo, O.; Chagas, C.; Galetti, S.; Rossetti, V.; Kitajima, E. 1995. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. Fitopatologia Brasileira. 20, (208-213).

Chagas, C.M.; Rosseti, V. 1983. Transmission of leprosis symptoms by a grafting infected tissue. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IX., Riverside, Annals. Riverside: IOCV, p.70.

Chagas, C.M.; Rosseti, V.; Chiavegato, L. 1983. Influence of the biological cycle of *Brevipalpus phoenicis* on leprosis transmission. En: Annals IX Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, p.69.

Chiavegato, L.G. 1996. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes em citros. Laranja. 17 (1) 229-235.

Childers, C.C.; Rodrigues, J.; Derrick, K.; Achor, D.; French, J.; Welbourn, W.; Ochoa, R.; Kitajima, E. 2003. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. Experimental and Applied Acarology. 30 (1-3) 181-202.

Freitas-A.J.; Locali, E.C.; Antonioli, R.; Rodrigues, V.; Kitajima, E. W.; Machado, M.A. 2003. Detection of citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. Virus Reviews & Research. 8 (1) 196.

Freitas, A.J.; Cavalcante, M.; Locali, E.; Antonioli, R.; Domingues, A.; Machado, M. 2004. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. Virus Reviews & Research. 9 (1) 246-247.

Gomes, T.; Appezzato-da-Glória, B.; Salaroli, B.; Kitajima, E. 2004. Distribution of CiLV-C in the citrus leaf lesions. In: Congresso Brasileiro de Biologia Celular, XII., 2004, Resumos. Campinas: CBBC.

Gómez, E.M.; Vargas, R.; Rivadameira; Locali, E.; Freitas, A.; Astúa, G.; Rodrigues, J.; Mesa C.; Kitajima, E. 2005. First report of citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz, Bolivia. Plant Disease.89 (6) 686.

Haramoto, P.H. 1969. Biology and control of *Brevipalpus phoenicis*. Hawaii Agricultural Experimental Station Technical Bulletin, Mãnoa. 68 (1-63).

Kitajima, E.W.; Müller, G.; Costa, A.; Yuki, W. 1972. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. Virology. (50) 254-258.

Kitajima E., Muller G., Costa A., Yuki V. 1972. Short rodlike particles associated with citrus leprosis. Virology (50) 254-258.

Kitajima, E.W.; Chagas, C.; Rodrigues, J. 2003. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. Experimental and Applied Acarology. 30 (1-5) 135-160.

Kitajima, E.W.; Ferreira, P.; Freitas, A.; Machado, M. 2004. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. Summa Phytopathologica. (30) 68.

Knorr, L.C. Studies on the etiology of leprosis in citrus. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IV., 1968, Annals. Gainesville: IOCV, 1968, p.332-341

Kubo, K., Novelli, V., Bastianel, M., Locali-F., E., Antonioli-L., R., Machado, M., Freitas-A., J. 2011. Detection of *Brevipalpus* transmitted viruses in their mite vectors by RT–PCR. Experimental and Applied Acarology. (54) 33 - 39

León, M.G.; Realpe, O.; Carreño, M.; Garzón, B.; Campos, P. 2005. La Leprosis de los cítricos. Plegable divulgativo N°43. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – Corpoica. Villavicencio, Meta. 5 p.

León, M. G.; Kitajima, E.; Freitas, A.; Childers, C.; Achor, D.; Salarolli, R.; Mesa, C. 2006. Occurrence of Citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. American Phytopatological Society. Plant Disease, Dis. Note. 90 (5) 682.

León, G., Kitajima, E., Freitas, A., Machado, M., Meza, N. 2006. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia. Rev. Corpoica 7 (2) 67-72.

Locali, E.C.; Freitas, A.; Souza, A.; Takita, M.; Astúa, G.; Antonioli, R.; Kitajima, E.; Machado, M. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to Citrus production in the Americas. Plant Disease. 87 (11) 1317-1321.

Locali, E.C.; Freitas, A.; Machado, M. 2004. Leprose dos citros: Biologia e diagnóstico. Laranja. 25 (1) 53-68.

Locali-F., E.; Freitas-A, J.; Souza, A.; Takita.; M.; Astua, G.; Antonioli-L., R.; Rodrigues, V.; Targon, N.; Machado, M. 2006. Complete nucleotide sequence genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. Journal of General Virology. (87) 2721–2729

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, MADR, ASOHOFRUCOL 2002. Acuerdo de competitividad de la cadena productiva de los cítricos. Bogotá. 79 p.

Maia, O.A.; Oliveira, C. 2002. Capacidade de colonização de Brevipalpus phoenicis (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) em cercas vivas, quebra-ventos e plantas daninhas. En: Resumenes XIX Congreso Brasilero de Entomología. p. 249.

Mejia, L.; Paniagua, A.; Cruz, N.; Porras, M.; Palmieri, M. 2005. Citrus leprosis, disease that endangers plantations in Guatemala. En: Annals 2005 Annual Meeting of American Phytopathological Society, Caribbean Division. p. 17-19.

NAPPO, 2005. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Sistema de Alerta Fitosanitaria. Detección de la Leprosis en el estado de Chiapas, México. http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=165.

Nicolini, F., Bastianel, M., Freitas-A. J., Kitajima, E., Kubo, K., Antonioli-L, R., Schons, J., Machado, M. A. 2007. Evidence suggesting that *Brevipalpus phoenicis*-Citrus leprosis virus interaction may not be of the circulative propagative type. Page 156 in: XII Conf. Int. Org.Citrus Virol., 2007. IOCV, Adana, Turkey.

Oliveira, C.L. 1996. Ácaro vetor da leprose dos citros: aspectos biológicos. Laranja, Cordeirópolis. 17 (1) 229-295.

Rodrigues, J.C. 2000. Relações patógeno-vetor-planta no sistema leprose dos citros. Tese (Doutorado em Ciências), Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 168p.

Rodrigues, J.C.; Childers, C.; Kitajima, E.; Machado, M.; Nogueira, N. 2001. Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. Laranja. 22 (2) 412- 423.

Rodrigues, J.C.; Kitajima, E.; Childers, C.; Chagas, C. 2003. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. Experimental and Applied Acarology. 30 (1-3) 161-179.

Rodrigues, J.C., Zuniga J., Childers, C. 2007. Occurrence and distribution of citrus leprosis virus in Honduras. Plant Pathol 56:344

Rodrigues, J.C.; Childers, C. 2013. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. Experimental and Applied Acarology. 59:165–175

Saavedra, F; Bernal, A., Childers, C, Kitajima, E. 2001. First Report of Citrus leprosis virus in Panama. Plant Disease. Disease Notes. 85 (2) 228

Sadana. G. L.; Kumari M. 1991. Effect of temperature and relative humidity on the development of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari:Tenuipalpidae). Department of Zoology, Punjab Agricultural Unicersity, Ludhiana, India. p?

Spegazzini, C. 1920. Sobre enfermedades y hongos que afectan las plantas de agrios en el Paraguay. Annales de la Sociedad Científica Argentina 90: 155-188.

USDA. 2004. Targeting a threat to U.S. Citrus Mite-Borne disease already has foothold in South America. http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/mar04/citrus0304.htm; consulta: febrero de 2010.

2. Transmisión de CiLV-C por el acaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) desde plantas cítricas y otros hospederos no cítricos hacia plantas cítricas

Resumen

El presente capítulo estudia la transmisión, viabilidad e interacciones del virus de la leprosis de los cítricos CiLV, cuando el ácaro vector *Brevipalpus phoenicis* lo adquiere de cítricos, pasa a hospedarse en plantas no cítricas y retorna a plantas cítricas. De acuerdo a la aparición de síntomas visuales de la enfermedad, los resultados muestran que *B. phoenicis* es capaz de transmitir el virus con más del 80% de efectividad hacia plantas de naranja valencia (*Citrus sinensis* L.), luego de haber permanecido hospedado en cualquiera de las seis plantas hospederas alternas, *Dieffenbachia* sp., *Hibiscus rosa cinensis, Codiaeum variegatum*, *Swinglea glutinosa*, *Sida acuta* o *Stachytarpheta cayennensis*, durante períodos de dos a veinte días. La aparición de los primeros síntomas de leprosis en hojas de naranja valencia, tardó entre 14 a 37 días cuando el ácaro se hospedó previamente en *S. glutinosa, Dieffenbachia* sp. y *C. variegatum*. Cuando el ácaro se hospedó en *Sida acuta* los síntomas de leprosis se presentaron en naranja valencia entre los 18 y 46 días. Cuando el ácaro se hospedó en *H. rosa cinensis* y *S. cayennensis* los síntomas tardaron en aparecer entre 26 a 51 días.

Palabras clave: Cítricos, leprosis, transmisión, no cítricos, CiLV-C

Abstract

This chapter study the transmission, viability and interactions of the of citrus leprosis virus CiLV when the vector mite *Brevipalpus phoenicis* acquires the virus on citrus, then staying in non citrus plants and returns to citrus plants. According to the appearance of visual symptoms of the disease, results shown that *B. phoenicis* mite is able to transmit the virus

to valencia orange plants (*Citrus sinensis* L.) with a higher effectiveness than 80%, after having been hosted for periods of two to twenty days in any of the six alternate host plants, *Dieffenbachia* sp., *Hibiscus rosacinensis*, *Codiaeum variegatum*, *Swinglea glutinosa*, *Sida acuta* or *Stachytarpheta cayennensis*. The appearance of the first leprosis symptoms in valencia orange leaves, when the mite previously stayed in *S. glutinosa*, *Dieffenbachia* sp. and *C. variegatum* took between 14-37 days. When the mite stayed at *S. acuta,* leprosis symptoms occurred in valencia orange between 18 and 46 days. When the mite stayed in *H. rosa cinensis* and *S. cayennensis* symptoms appear between 26-51 days after transmission.

Keywords: Citrus, leprosis, transmission, non citrus, CiLV-C.

2.1. Introducción

La leprosis de los cítricos es una enfermedad de importancia económica y cuarentenaria, que afecta principalmente naranjos y mandarinos. Según Rodrigues *et al.*, (2001), Freitas *et al*., (2004), en Brasil es considerada la enfermedad viral más importante en cítricos porque los costos del control del ácaro transmisor suman alrededor de 90 millones de dólares al año. La diseminación del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C), se ha ampliado recientemente, hacia países de Centro, Sur América y el sur de México (Freitas *et al*., 2005; Kitajima *et al*., 2004; Rodrigues *et al*., 2001; NAPPO, 2005) y debido a esta dispersión, se han incrementado las restricciones para el mercadeo internacional de cítricos y algunos productos agropecuarios.

Los naranjos dulces naranjos (*Citrus sinensis* L.) y los mandarinos (*Citrus reticulata*) frecuentemente son afectadas por la enfermedad (Domingues y Rodrigues, 1999; Locali *et.al.,* 2003; Salvo, 1997). Las limas (*C. latifolia* Tanaka) y los limones (*C. limón* L.) son considerados inmunes a la leprosis, mientras el Tangor Murcot (híbrido entre naranjo dulce y mandarino), muy utilizado en Brasil, puede hospedar el virus de la leprosis CiLV-C y ser asintomático (Bastianel *et.al.,* 2004). Las toronjas (*C. paradisi* Macfad) y algunos tangores muestran niveles variables de resistencia al virus de la leprosis (Bastianel, *et.al.* 2004; Rodrigues *et al*., 2001; Locali *et al*., 2004).

En Colombia el virus de la leprosis de los cítricos fue reportado en el Departamento de Casanare durante el año 2004. Para el año 2005 se registró ampliamente distribuido en varios municipios de los Departamentos del Meta y Casanare (Becerra *et al*., 2007; León *et al*., 2006). Posteriormente, se encuentra un reporte de presencia de leprosis de los cítricos en Ibagué, Tolima (Bastianel *et al.,* 2010), lo cual indica la dispersión de la enfermedad en el país.

El principal transmisor del virus de la Leprosis de los cítricos, es el ácaro rojo plano *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). Chagas y Rosseti, (1983); es una especie polífaga, distribuida en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo (Carvalho *et al*., 2008; Chagas *et al*., 1983; Childers *et al*., 2003; Maia y Oliveira, 2002; Rodrigues *et al*., 2001; Salvo, 1997). En Colombia, este ácaro se encuentra diseminado en todas las regiones geográficas del país, y puede infestar los cultivos de cítricos durante todo el año (León *et al*., 2005).

Kitajima *et al*., (2003), Bassanezi y Laranjeira (2004), afirman que el virus CiLV-C es de tipo circulativo y no acumulativo dentro del ácaro *B. phoenicis,* es decir que una vez el ácaro se ha infectado, el virus circula y se propaga dentro de su cuerpo y tiene la habilidad de transmitirlo durante toda su vida. Boareto y Chiavegato (1994), al estudiar la transmisión de CiLV en hospederos diferentes a cítricos, encontraron que cuando un ácaro infectado se hospeda por lo menos seis días sobre hojas de cítricos o café sanas, no pierde la capacidad de transmitir el virus CiLV-C hacia nuevas plantas de cítricos; no existe transmisión transovarial del virus desde una hembra adulta infectada hacia sus descendientes (Boareto *et al*., 1993).

Para transmitir el virus, *B. phoenicis* inyecta saliva en frutos, hojas, ramas y otros tejidos de las plantas (Olivera 1996). Solo los ácaros que han tenido acceso a las lesiones pueden transmitir leprosis y un período de 2 días de alimentación es suficiente para que el ácaro transmita el virus. El 48,3% de las larvas del ácaro transmiten la enfermedad; las ninfas y adultos son menos eficientes en la transmisión (Chagas *et al.*, 1983). De acuerdo a Kitajima *et al*., (2003), el virus no es sistémico, lo cual significa que no se disemina a través de la planta.

En cuanto a aspectos biológicos, *B. phoenicis* pasa por los estados de huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto (Chiavegato y Mischan 1987). Cada estado de desarrollo tiene fases de quietud y alimentación. Se reproduce de forma asexual por partenogénesis teliotoquia; la reproducción sexual es menos común (Chiavegato, 1996). De acuerdo a Haramoto (1969), bajo condiciones ambientales favorables (25°C y 65-70% HR), el ciclo completo de *B. phoenicis* dura 25 días. Cada hembra puede colocar de uno a cuatro huevos por día durante 20 días aproximadamente, con lo cual se pueden presentar varias generaciones por año.

La duración del ciclo de vida de *B. phoenicis* a un promedio de temperatura 27,6±0,7°C y humedad relativa de 69±7,9% fue: huevo 4 a 6 días; larva 3 a 4 días; protoninfa 5 a 7 días; deuteroninfa 6 a 8 días y adulto 21 a 24 días. De acuerdo a estos datos, el ciclo de huevo a adulto demora entre 18 a 25 días y el estado adulto dura en promedio más de 21 días (León *et al*., 2006).

Hasta hace poco tiempo se consideraba que el virus CiLV-C solamente afectaba plantas rutaceas cítricas. (Colariccio *et al*., 1995) lograron transmitir mecánicamente con éxito, el virus de naranja dulce a naranja dulce y hacia hospederos herbáceos y plantas indicadoras como *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* y *Glomphrena globosa*. Lovisolo *et al*., (2000) ampliaron el número conocido de hospederos del virus a 13 especies de 5 géneros diferentes a rutáceas, entre las cuales mencionan *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae), *Tetragonia tetragonioides* (Tetragoniaceae), *Atriplex hortensis, A. latifolia, Beta vulgaris* ssp. *cicla* y *Chenopodium bonus-henricus* (Chenopodiaceae), como nuevos registros de hospederos experimentales del virus de la leprosis (CiLV), puesto que lograron inoculación mecánica en estas especies, pero no lograron retransmitir el virus de vuelta hacia plantas cítricas. Los mismos autores, afirman además que la transmisión mecánica del virus entre plantas cítricas es posible, pero en muy bajo porcentaje.

Nunes *et al*., (2012) confirmaron la retransmisión del CiLV-C, hacia plantas de naranjo variedad Pera dulce, después de pasar ácaros *B. phoenicis* por los hospederos alternos cayena (*Hibiscus rosa-sinensis L.*), malvaviscus (*Malvaviscus arboreus*), Pino de oro (*Grevilea robusta*) y achiote (*Bixa Orellana*), de las familias Malvaceae, Proteaceae y

Bixaceae respectivamente. Adicionalmente, con análisis RT-PCR y microscopía electrónica, estas plantas presentaron síntomas de leprosis positivos al virus CiLV-C.

Los anteriores resultados confirman que el virus CiLV-C puede infectar plantas no cítricas, como cercas vivas o malezas frecuentes de los huertos de cítricos, las cuales pueden ser hospederas tanto del virus como del ácaro vector *B. phoenicis*, tal como lo había planteado Maia y Olivera (2005). En Colombia *Swinglea glutinosa*, se reconoce como hospedero natural del virus CiLV-C y del ácaro vector *B. phoenicis* (León *et al*., 2008); además, se registran varias malezas hospederas del ácaro *B. phoenicis*, que son frecuentes en huertos de cítricos, como la verbena (*Stachytarpeta cayanensis*), yerbamora (*Lantana camara*) y escobo (*Sida* spp.) entre otras (León *et al*., 2006).

El diagnóstico correcto de la enfermedad es decisivo, puesto que los síntomas se pueden confundir. Melzer, *et al*., (2012). Observaron síntomas muy similares a los causados por el virus de la leprosis sobre hojas y corteza de las ramas de árboles de *Citrus volkameriana*. Al realizar los análisis específicos de detección RT-PCR para CiLV-C resultaron negativos, aunque con el microscópio electrónico encontraron pequeñas partículas baciliformes como virus, y concluyen que se trata del virus HGSV **(**Hibiscus Green Ringspot Virus), un nuevo virus del genero *Higrevirus*.

En cuanto a los efectos citopáticos causados por CiLV-C, las lesiones jóvenes en hojas, no presentan hiperplasia o hipertrofia y la mayoría de las células contienen viroplásmas o partículas virales, mientras que las lesiones maduras presentan claramente hiperplasia e hipertrofia, pero las células que contienen viroplásmas o viriones son muy escasas (Gomes *et al*., 2004; Bastianel *et al*., 2006; Kitajima *et al.,* 1972*;* Kitajima *et al*. 2003), lo cual es determinante para la detección del virus en análisis molecular por RT-PCR o por microscopía electrónica.

El ácaro *B. phoenicis*, puede vivir y multiplicarse en diversas plantas. Childers *et. al*., (2003), reportan 486 plantas hospederas del ácaro. Entre las plantas cultivadas, tiene como principal hospedera los cítricos y mencionan además Marañón (*Anacardium occidentalis*), Papaya (*Carica papaya*), Yuca (*Manihot sculenta*), Algodón (*Gossypium sp*.), Guayaba (*Pisidium guajava*), Maracuyá (*Pasiflora sp*.), Café (*Coffea arabica*), Cacao (*Theobroma cacao*) y Uva (*Vitis vinifera*). Maia y Oliveira, (2002) afirman que las malezas

dormidera (*Mimosa caesalpiniaefolia*), malvavisco (*Malvaviscos arboreus*), escobo (*Sida cordifolia*), siempre viva (*Commelina benghalensis*), mastranto (*Ageratum conizoides*) y cadillo (*Bidens pilosa*) son muy comunes en los huertos de cítricos en Brasil y son hospederas importantes del ácaro vector del virus CiLV-C.

Chiavegato (1996), afirma que *B. phoenicis* tiene 34 especies diferentes de plantas hospederas. Ulian y Oliveira, (2002) evaluaron la habilidad de *B. phoenicis* para vivir en barreras rompe vientos de cítricos como *Morus sp., Rhododendron indicum, Hibiscus sp., Eugenia laevigata, Pennisetum purpureum, Poncirus trifoliata, Bougainvillea spectabilis, Mimosa caesalpiniaefolia M. caesalpiniifolia y Bixa orellana.* De acuerdo a los resultados, concluyen que *Hibiscus sp.* y *Bixa orellana* no deben ser usadas como barreras vivas porque proveen condiciones favorables para la supervivencia de vector *B. phoenicis*. Maia y Oliveira, (2002) identificaron plantas hospederas que son reservorios para la supervivencia de *B. phoenicis* en plantaciones de cítricos en Brasil, e incluyen malezas como *Bidens pilosa* y también barreras rompevientos como *Mimosa caesalpiniaefolia* y *Malvaviscus arboreus*.

A pesar de conocerse la abundancia de plantas hospederas naturales del ácaro transmisor, así como el creciente número de hospederos alternos del virus CiLV-C, pocos estudios han sido desarrollados con respecto a la transmisión de la leprosis por ácaros *B. phoenicis*, cuando pasan por plantas hospederas alternas de diferente especie. Estudios recientes, consideran que la eficiencia y el proceso de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos por el ácaro *B. phoenicis* es desconocido, cuando el vector pasa por diferentes hospederos. Esta tesis plantea abordar aspectos relacionados con la transmisión del virus y las interacciones virus, vector y plantas hospederas alternas.

Para ello, el presente trabajo realiza pruebas de transmisión sobre plantas cítricas y no cítricas, hospederas alternas del *B. phoenicis,* con el objeto de establecer la viabilidad del virus de la leprosis CiLV-C y la eficacia de transmisión del ácaro vector, cuando está hospedado en otras plantas y se relocaliza posteriormente sobre plantas de cítricos. Los resultados, permitirán generar estrategias para prevenir y evitar la entrada de leprosis a regiones libres del CiLV-C, asi como para desarrollar medidas de cuarentena preventivas contra la enfermedad. La metodología contribuye a desarrollar pruebas para determinar

rápidamente si los ácaros son viruliferos y su potencial para transmitir el virus, aunque se encuentre en plantas diferentes a cítricos.

2.2. Metodología

La eficiencia de transmisión del ácaro *B. phoenicis* vector del virus de la leprosis CiLV-C, cuando adquiere el virus de una planta cítrica, pasa a una no cítrica y regresa posteriormente a una planta cítrica, se estudió por medio de pruebas controladas de transmisión dentro de casas de malla, del Centro de Investigación La Libertad de CORPOICA. Para este objetivo, se siguieron los siguientes pasos:

2.2.1. Selección y mantenimiento del material vegetal

Las plantas requeridas para las pruebas de transmisión fueron seleccionadas por ser hospederas del ácaro vector *B. phoenicis* y/o del virus CiLV. Las plantas se sembraron individualmente en materas y mantuvieron libres del virus, bajo condiciones de casa de malla de CORPOICA en el C. I. La Libertad. Las especies utilizadas para el experimento fueron: las ornamentales millonaria, *Dieffenbachia* sp. (Araceae), hibisco o cayena, *Hibiscus rosa cinensis* (Malvaceae) y croto, *Codiaeum variegatum* (Euphorbiaceae), la cerca viva *Swinglea glutinosa* (Rutaceae) y las malezas hospederas del acaro *B. phoenicis* escobo, *Sida acuta* (Malvaceae) y verbena negra, *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae). Como planta hospedera cítrica, se utilizó naranjo Valencia.

2.2.2. Adquisición del virus por ácaros *B. phoenicis*

Para la adquisición del virus por los ácaros *B. phoenicis*, se aislaron dos árboles de naranjo Valencia con lesiones del CiLV-C bajo invernadero en el C.I. La Libertad; se colectaron hojas con abundantes lesiones de la enfermedad de dichos árboles y se llevaron al laboratorio de entomología, en donde se pusieron sobre viales de vidrio con agua destilada para mantener humedad durante el tiempo de experimentación. Sobre las lesiones de las hojas seleccionadas, con la ayuda de estereoscopios y pinceles de punta fina, se colocaron en alimentación durante un periodo de tres días, 1500 ácaros *B. phoenicis* de los estados larval, ninfal y adulto. Las hojas ya infestadas, fueron aisladas mediante la aplicación de una banda de vaselina en su pecíolo, para asegurar el confinamiento de los ácaros, su alimentación y la adquisición del CiLV-C.

2.2.3. Infestación de ácaros sobre hospederos no cítricos

Transcurrido el tiempo de adquisición, los ácaros se colectaron y se ubicaron en grupos de 50 por planta en cada una de las seis especies no cítricas (*Swinglea glutinosa*, *Dieffenbachia* sp., *Codiaeum variegatum*, *Hibiscus rosacinensis*, *Sida acuta* y *Stachytarpheta cayennensis*), a diferentes tiempos de exposición (2, 4, 8, 15 y 20 días). Una vez cumplido el tiempo de tratamiento sobre cada una de las plantas no cítricas, se procedió a reubicar los ácaros sobre plantas de naranja valencia (*Citrus sinensis* L.) sanas.

2.2.4. Retransmisión del virus CiLV hacia plantas cítricas

Luego de cumplir el tiempo programado en las especies no cítricas, se reubicaron los ácaros sobre plantas de naranja valencia sanas, para permitir la transmisión del CiLV. Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 repeticiones de 10 ácaros por cada tiempo de exposición correspondiente a las seis especies de plantas no cítricas. Los ácaros se ubicaron en grupos de 10 sobre las cuatro hojas superiores de cada planta de naranja valencia, de tal forma que cada hoja correspondió a una unidad experimental. Las plantas de naranja valencia, se sometieron a un periodo de cinco días de transmisión y luego los ácaros se retiraron manualmente con ayuda de un pincel. Las plantas fueron mantenidas en casa de malla durante dos meses para observar la expresión de los síntomas. Las hojas expuestas a los tratamientos se evaluaron de acuerdo a la aparición o ausencia de síntomas de la leprosis. Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de regresión logística para establecer el efecto del tiempo de exposición y la permanencia del ácaro *B. phoenicis* sobre diferentes plantas no cítricas, con relación a la probabilidad de aparición de síntomas en las plantas de naranja valencia. Las hojas que presentaron síntomas de la enfermedad, se colectaron para pruebas RT-PCR.

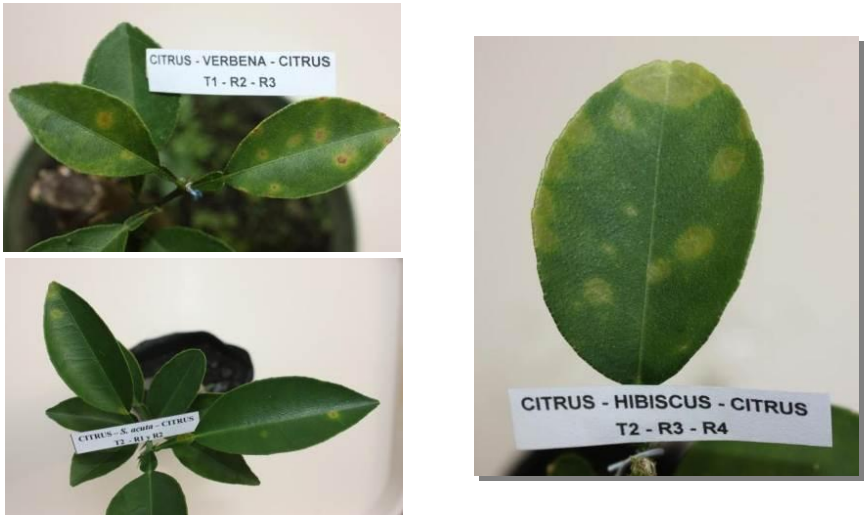
2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Observación de síntomas de leprosis en hojas de naranja valencia

Los resultados muestran aparición de síntomas visuales de la enfermedad en porcentajes mayores al 80% sobre las hojas expuestas al ácaro, en todos los tratamientos evaluados; esto permite afirmar que el ácaro *B. phoenicis* es capaz de transmitir el virus de la leprosis de los cítricos hacia plantas de naranja valencia (*C. sinensis* L.), luego de haber

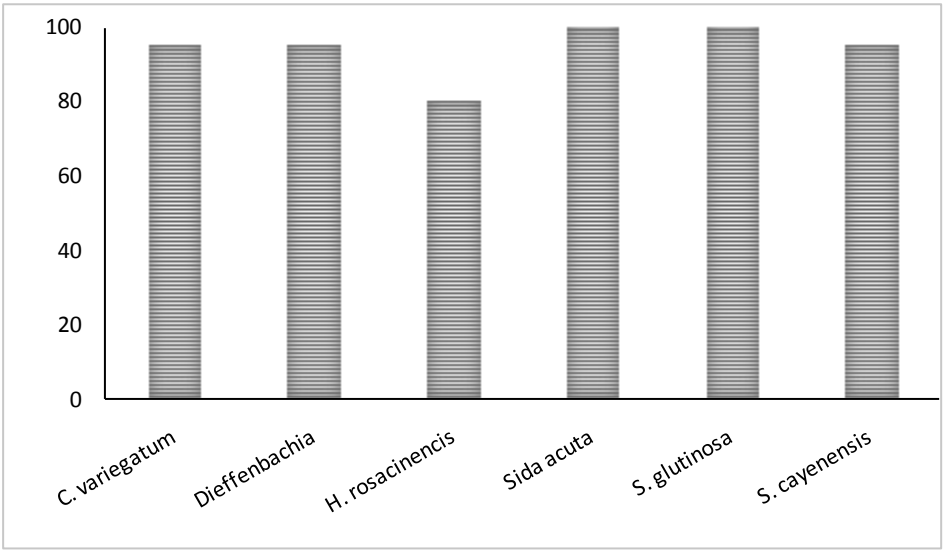
permanecido albergado en cualquiera de las seis plantas alternas no cítricas, para las cuales se permitieron cinco tiempos diferentes de exposición.

Figura 2-1: Lesiones de leprosis desarrolladas en hojas de naranja valencia, después que el ácaro *B. phoenicis* se hospedó en las plantas no cítricas *Sida acuta* (inf. Izq) *Stachytarpheta cayennensis* (sup. Izq) e *Hibiscus rosa cinensis* (Derecha).



Cuando el ácaro vector se hospedó en *H. rosa cinensis* y luego retornó a cítricos, el 80% de las hojas de naranja valencia mostró aparición de síntomas de leprosis. Para los tratamientos de *C. variegatum, Dieffenbachia y S. cayennensis*, se observó aparición de síntomas de la enfermedad en el 95% de las hojas. Para los tratamientos de *S. glutinosa* y *S. acuta*, el 100% de las hojas tratadas de naranja valencia, mostró síntomas de leprosis de los cítricos (figura 2-1).

Figura 2-2. Porcentajes de aparición de síntomas de leprosis en plantas de naranja valencia, luego que *B. phoenicis* fue hospedado en plantas no cítricas.



En la Tabla 2-1, se presentan los porcentajes de aparición de síntomas CiLV en hojas de naranja valencia, con relación a tiempos de permanencia de 2 a 20 días del ácaro *B. phoenicis* sobre seis diferentes plantas no cítricas. La aparición de los síntomas de la enfermedad, alcanzó el 100% en la gran mayoría de los tratamientos, por lo cual se deduce que el virus CiLV puede ser transmitido efectivamente y los síntomas aparecerán en las plantas de naranja valencia con una probabilidad entre el 75 y 100%, luego que el ácaro vector se ha hospedado durante 2 a 20 días, en cualquiera de las especies no cítricas evaluadas.

Tabla 2-1: Porcentaje de hojas de naranja valencia con lesiones de leprosis, en función del tiempo de estadía del ácaro *B. phoenicis* en diferentes hospederos no cítricos.

Tiempo de permanencia	***Codiaeum variegatum***	***Diefenbachia* sp.**	***Hibiscus rosa cinensis***	***Sida acuta***	***Swinglea glutinosa***	***Stachytarpheta cayennensis***
T1 = 2 días	100	100	100	100	100	100
T2 = 4 días	100	100	100	100	100	100
T3 = 8 días	100	100	100	100	100	100
T4 = 15 días	100	100	0	100	100	100
T5 = 20 días	75	75	100	100	100	75
Promedio	95	95	80	100	100	95

Con un nivel de significancia de 0.01%, se determinó una probabilidad alta de transmisión del virus y aparición de los síntomas de leprosis en naranja valencia, luego que el ácaro fue hospedado en cualquiera de las plantas no cítricas evaluadas en este estudio. Con la prueba Chi^2, se pudo establecer que existe dependencia entre la aparición de síntomas de la leprosis en naranja valencia y las especies no cítricas hospederas temporales del ácaro *B. phoenicis* (Chi^2 = 101,13 ; $\alpha < 0.0001$).

Los modelos de regresión logística, propuestos para explicar el efecto del tiempo de transmisión sobre la aparición de los síntomas de la leprosis en naranja valencia, no mostraron efectos significativos del tiempo sobre la aparición de síntomas, para ninguna de las seis especies no cítricas evaluadas. Por tanto se concluye que, no hay efecto del tiempo de permanencia del ácaro *B. phoenicis* sobre las especies no cítricas y el virus puede ser trasmitido por el vector, luego de hospedarse en cualquiera de las plantas no cítricas, sin importar el tiempo de permanencia en cada una de ellas.

2.3.2. Detección del virus de la leprosis de los cítricos en naranja valencia, luego de hospedar el vector en plantas no cítricas

Las pruebas de diagnóstico molecular con la técnica RT-PCR, sobre lesiones sintomáticas de leprosis de los cítricos, en hojas de naranja valencia expuestas al vector *B. phoenicis* luego de ser hospedado en plantas no cítricas, fueron positivas para los tratamientos en que el ácaro se hospedó en *S. cayennensis*, *S. glutinosa*, *H. rosa cinensis* y *S. acuta*; para los tratamientos en que el ácaro se hospedó en *C. variegatum* y *Dieffenbachia* sp., la detección del virus no fue posible.

En las figuras 2-3 y 2-4, se presentan los geles de agarosa 1%, resultado de productos RT-PCR en hojas de naranja valencia y ácaros *B. phoenicis* respectivamente:

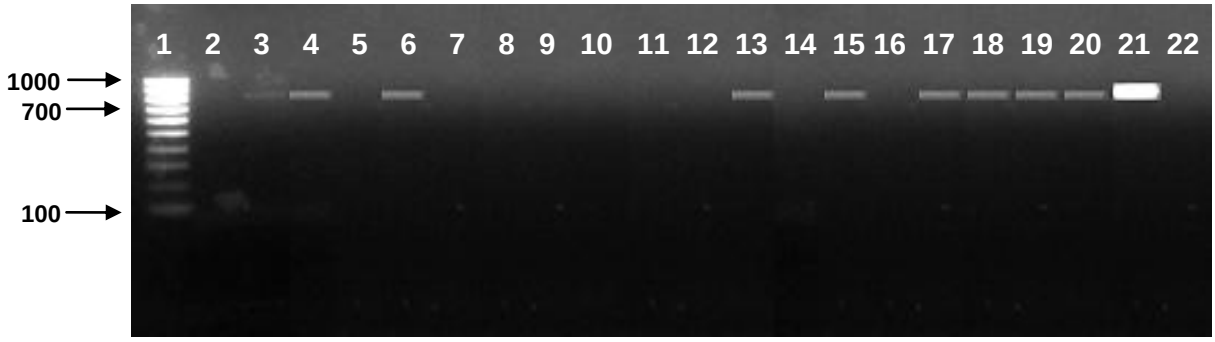
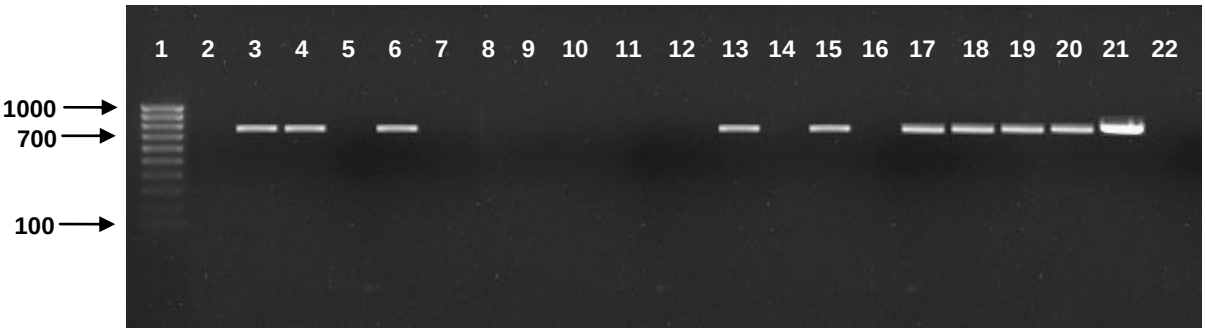


Figura 2-3: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en hojas de naranja valencia, luego que el ácaro *B. phoenicis* fue hospedado en plantas no cítricas. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV; **líneas 2 a 4:** *S. cayennensis* tratamientos 1, 3 y 5; **líneas 5 a 7:** *H. rosa cinensis* tratamientos 1, 3 y 5; **líneas 8 y 9:** *Dieffenbachia* sp., tratamientos 1 y 5; **líneas 10 y 11:** *C. variegatum* tratamientos 1 y 5; **líneas 12 a 15:** *S. glutinosa* tratamientos 1, 3, 4 y 5; **líneas 16 a 20:** *S. acuta* tratamientos 1 a 5; **línea 21:** Control positivo y **línea 22:** Control negativo.

La prueba de detección molecular RT-PCR en ácaros *B. phoenicis*, resultó positiva para los mismos tratamientos en que se detectó el virus sobre las lesiones en naranja valencia, ratificando la precisión de la prueba. Aun cuando el diagnóstico para todos los tratamientos debió ser positivo, este resultado es debido a la desuniformidad en el tamaño y número de lesiones observadas en cada tratamiento, lo cual condujo a la obtención de diferentes concentraciones de virus CiLV disponible para la extracción y para el procesamiento molecular.

Figura 2-4: Detección del virus de la leprosis de los cítricos en ácaros *B. phoenicis* luego de ser hospedados en plantas no cítricas. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV; **líneas 2 a 4:** *S. cayennensis* tratamientos 1, 3 y 5; **líneas 5 a 7:** *H. rosa cinensis* tratamientos 1, 3 y 5; **líneas 8 y 9:** *Dieffenbachia* sp., tratamientos 1 y 5; **líneas 10 y 11:** *C. variegatum* tratamientos 1 y 5; **líneas 12 a 15:** *S. glutinosa* tratamientos 1, 3, 4 y 5; **líneas 16 a 20:** *S. acuta* tratamientos 1 a 5; **línea 21:** Control positivo y **línea 22:** Control negativo.



Las concentraciones de RNA total obtenidas de las extracciones de ácaros *B. phoenicis* y del tejido sintomático de hojas de naranja valencia para cada tratamiento, presentan grandes diferencias (Tabla 2-2), debido a múltiples factores que influyen en los procesos de adquisición y transmisión del virus por el ácaro vector. Entre las variables independientes que inciden sobre dichos procesos, se pueden mencionar el desarrollo de los ácaros *B. phoenicis* utilizados durante todo el período de exprimentación que abarca desde la adquisición del virus, el paso por plantas no cítricas y los períodos de transmisión hacia plantas de naranja valencia. Los sitios de alimentación que el vector escoge de forma aleatoria, el tamaño, la edad y el número de las lesiones viruliferas utilizables por hoja durante el período de adquisición del virus, inciden en la disponibilidad de inóculo, lo cual se traduce en desigualdad de síntomas de leprosis presentes en las hojas analizadas y por consiguiente en la diferencia de concentración de partículas virales extraidas en las muestras examinadas.

La concentración mínima de detección de RNA total, con la técnica RT-PCR en el presente estudio fue de 132,7 ng/µl y por tanto, los tratamientos con concentraciones virales menores a dicho valor, no pudieron ser detectados con los procedimientos de diagnóstico molecular, aun cuando la aparición de síntomas visuales en las hojas haya sido registrada.

Tabla 2-2: Concentración de RNA total en ácaros y hojas de naranja valencia cuando *B. phoenicis* fue hospedado previamente en plantas no cítricas.

ESPECIE NO CÍTRICA Y TRATAMIENTO	Concentración de RNA total en ácaros ng/ µl	Concentración de RNA total en naranja valencia ng/ µl
Dieffenbachia 2 días	67,9	78,5
Dieffenbachia 4 días	83,2	84,7
Dieffenbachia 8 días	97,7	85,4
Dieffenbachia 15 días	9,5	38,5
Dieffenbachia 20 días	96,4	99,8
C. variegatum 2 días	77,2	90,5
C. variegatum 4 días	97,5	75,3
C. variegatum 8 días	12,1	27,1

C. variegatum 15 días	45,3	53,1
C. variegatum 20 días	9,1	12,3
S. glutinosa 2 días	2,4	1,2
S. glutinosa 4 días	107,6	110,5
S. glutinosa 8 días	142,8	132,7
S. glutinosa 15 días	54,7	33,4
S. glutinosa 20 días	602,5	544,8
S. acuta 2 días	32,5	56,7
S. acuta 4 días	241,6	232,8
S. acuta 8 días	174,1	175,5
S. acuta 15 días	326,7	231,8
S. acuta 20 días	299,6	341,1
S. cayennensis 2 días	121,5	124,5
S. cayennensis 4 días	43,8	46,8
S. cayennensis 8 días	307,0	315,0
S. cayennensis 15 días	67,7	99,7
S. cayennensis 20 días	319,2	554,4
H. rosa cinensis 2 días	57,1	63,2
H. rosa cinensis 4 días	101,4	111,3
H. rosa cinensis 8 días	399,7	410,7
H. rosa cinensis 20 días	49,5	54,7

2.3.3 Expresión de lesiones iniciales de leprosis en hojas de naranja valencia

La observación de las primeras lesiones de leprosis, en hojas de naranja valencia, luego que el ácaro *B. phoenicis* fue hospedado en plantas no cítricas, tardó entre 14 y 47 días. Cuando el ácaro vector se hospedó en *Swinglea glutinosa* las lesiones se observaron luego de 15 a 37 días; para *C. variegatum* pasados 14 a 23 días; con *Dieffenbachia* sp. después de 15 a 36 días y con *S. acuta* entre 18 y 46 días; Cuando el ácaro *B. phoenicis* se hospedó en *S. cayennensis* e *H. rosa cinensis*, las primeras lesiones en las hojas de naranja valencia, se tardaron un poco más en expresarse. Para *S. cayennensis*, se observaron entre los 27 y 47 días y para *H. rosa cinensis* entre 26 a 51 días (Tabla 2-3). Locali *et al.,* (2004), observaron síntomas entre los 17 y 21 días. (Freitas, *et al*. 2003.;

Freitas, *et al*. 2004; Knorr, 1968) reportan que los síntomas aparecen entre los 17 a los 60 días.

Tabla 2-3: Tiempo requerido para la expresión de lesiones iniciales de leprosis en naranja valencia, luego de hospedar el vector sobre plantas no cítricas.

ESPECIE NO CITRICA HOSPEDERA DEL VECTOR *B. phoenicis*	**EXPRESION PRIMERAS LESIONES (Rango en días)**
Codiaeum variegatum	14 - 23
***Dieffenbachia* sp.**	15 - 36
Swinglea glutinosa	15 - 37
Sida acuta	18 - 46
Stachytarpheta cayennensis	27 - 47
Hibiscus rosa cinensis	26 - 51

2.3.4: Modelos de regresión TAS, en función del tiempo de permanencia del ácaro *B. phoenicis* sobre plantas no cítricas

Con respecto al tiempo de aparición de síntomas (TAS) en hojas de naranja valencia, se propusieron modelos de regresión lineal, cuadrático y cúbico. Se seleccionaron los que resultaron significativos de acuerdo con la prueba t-Student ($\alpha = 0.05$). Los modelos obtenidos, relacionan el tiempo de permanencia del ácaro *B. phoenicis* sobre las plantas hospederas no cítricas, con los días en que tardan en expresarse las lesiones iniciales de leprosis en las hojas de naranja valencia, sobre las cuales se trasladaron posteriormente los ácaros infectados.

Se obtuvieron dos modelos de regresión cuadráticos y dos cúbicos para el tiempo de aparición de síntomas en naranja valencia (TAS), en función del tiempo de permanencia del ácaro *B. phoenicis* sobre las especies *Dieffenbachia* sp., *S. cayennensis*, *C. variegatum* y *S. acuta* respectivamente. Cuando el ácaro fué hospedado en las especies *H. rosa cinensis* y *S. glutinosa*, los datos obtenidos, no permitieron ajustar los modelos propuestos.

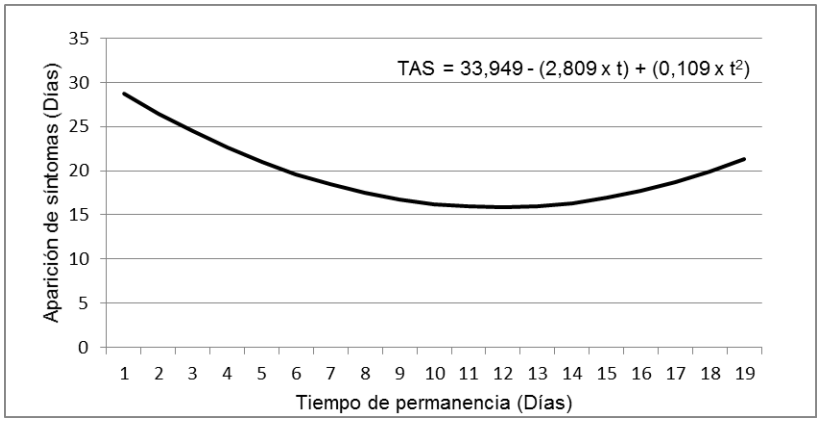
Los modelos en que se encontró dependencia significativa para las especies no cítricas, se presentan en las figuras 2-4 a 2-7 y se expresan en las siguientes ecuaciones:

$TAS = 33,949 - (2,809 \times t) + (0,109 \times t^2)$ para *Dieffenbachia* sp.

$TAS = 42,881 – (2,421 \times t) + (0,104 \times t^2)$ para *Stachytarpheta cayennensis*
$TAS = 16,094 - (1,325 \times t) + (0,251 \times t^2) - (0,0089 \times t^3)$ para *Codiaeum variegatum*
$TAS = 51,612 - (9,198 \times t) + (0,746 \times t^2) - (0,018 \times t^3)$ para *Sida acuta*

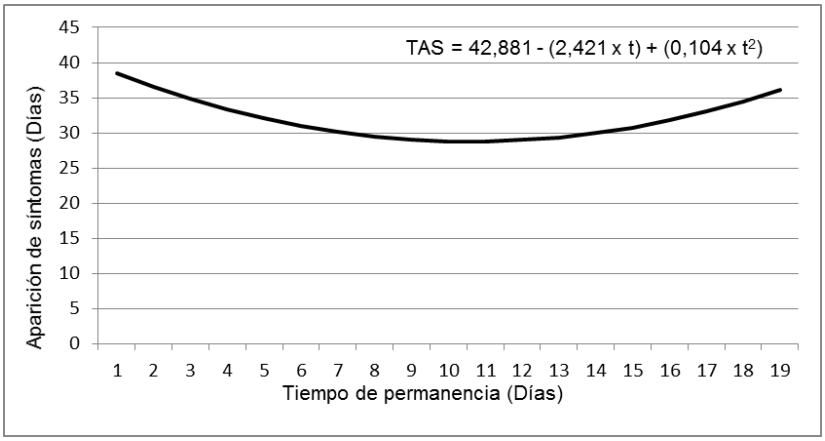
De acuerdo al modelo calculado, para el caso en que el ácaro *B. phoenicis* infectado con virus de la leprosis de los cítricos se hospedo previamente sobre *Dieffenbachia* sp, y luego pasó a una planta de naranja valencia, el virus es transmitido efectivamente y las primeras lesiones deberán aparecen después de 15 días; se aprecia un leve aumento en el tiempo en que inician aparición las primeras lesiones con relación al tiempo de permanencia del ácaro en las plantas no cítricas (Figura 2-5).

Figura 2-5: Tiempo de aparición de síntomas de leprosis en naranja valencia, en función del tiempo de permanencia de *B. phoenicis* sobre *Dieffenbachia* sp.



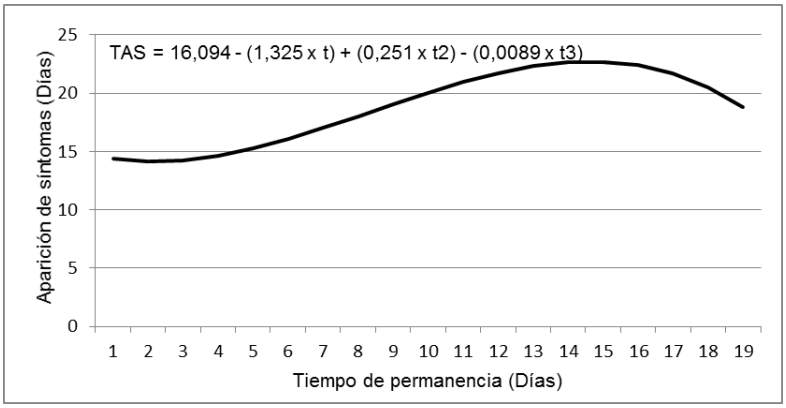
Para el caso en que el ácaro *B. phoenicis* se hospedó previamente sobre *S. cayennensis* y luego pasó a una planta de naranja valencia, las primeras lesiones aparecen después de 28 días, con un rango de aparición entre 28 y 38 días, sin depender del tiempo en que el ácaro vector permaneció sobre la planta no cítrica.

Figura 2-6: Tiempo de aparición de síntomas de leprosis en naranja valencia, en relación con el tiempo de permanencia de *B. phoenicis* sobre *S. cayennensis*.



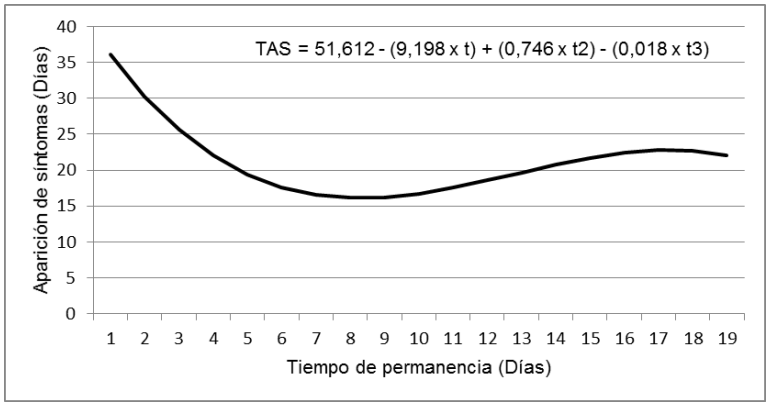
Cuando el ácaro *B. phoenicis* se hospedo sobre *C. variegatum,* y luego pasó a naranja valencia, las primeras lesiones aparecen después de 14 días, con un rango de aparición entre 14 y 22 días, sin que incida el tiempo en que el ácaro vector permaneció sobre la planta no cítrica (Figura 2-7).

Figura 2-7: Tiempo de aparición de síntomas de leprosis en naranja valencia, en relación con el tiempo de permanencia de *B. phoenicis* sobre *C. variegatum*.



En caso que el ácaro vector infeccioso se hospede previamente sobre *Sida acuta*, y luego pase a una planta de naranja valencia, el virus es transmitido y las las primeras lesiones aparecen después de 16 días, con un rango de aparición entre 16 y 36 días; se aprecia que a medida que el ácaro permanece durante más tiempo en la planta no cítrica, el tiempo de aparición de las primeras lesiones podría ser más corto (Figura 2-8).

Figura 2-8: Tiempo de aparición de síntomas de leprosis en naranja valencia, en relación con el tiempo de permanencia de *B. phoenicis* sobre *S. acuta*.



2.4. Conclusiones

El ácaro *B. phoenicis* logra transmitir el virus de la leprosis de los cítricos hacia plantas de naranja valencia (*C. sinensis* L.), luego de haber permanecido hospedado en cualquiera de las seis plantas alternas no cítricas evaluadas, puesto que más de 80% de hojas desarrollaron síntomas visuales de leprosis en todos los tratamientos.

El CiLV puede ser transmitido eficientemente y los síntomas aparecerán en las plantas de naranja valencia con una probabilidad entre el 75 y 100%, luego que el ácaro vector infectado se ha hospedado durante 2 a 20 días, en cualquiera de las especies hospederas aalternas evaluadas. La expresión de los síntomas de la enfermedad, se presenta entre 14 y 52 días después de la inoculación y no depende del tiempo de permanencia del ácaro *B. phoenicis* en las plantas hospederas alternas.

Cuando el ácaro *B. phoenicis* se hospeda temporalmente en *H. rosa cinensis* y luego retorna a naranja valencia, la aparición de síntomas de leprosis fue de 80%. Cuando el ácaro se hospeda temporalmente en *Codiaeum, Dieffenbachia* y *S. cayennensis*, la aparición de síntomas de la enfermedad fue del 95%. Cuando el ácaro pasa por *Swinglea glutinosa* y *Sida acuta*, el 100% de las hojas de naranja valencia presentaron síntomas de leprosis de los cítricos

Bibliografía

Bassanezi, R.; Laranjeira, F. 2004. Padroes espaciais da leprose dos citros e do ácaro vetor em pomares do estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira, Fortaleza, 29: 53-54.

Bastianel, M. Freitas, A.; Rodrigues, V.; Arrivabem, F.; Antonioli, L.; Machado, M. 2004. Resposta do tangor ´Murcott´ à inoculação do vírus da leprose dos citros em campo e em casa de vegetação. Laranja. 2: 337-348.

Bastianel, M.; Freitas, A.; Kitajima, E.; Machado M. 2006. The citrus leprosis pathosystem. Summa phytophatologica, 32 (3) 211 -220

Bastianel, M., Bassanezi, R., Freitas, J., Kitajima, E., Kubo, K., Machado, M. 2010. Citrus Leprosis Centennial of an unusual mite – vírus pathosystem. Plant Disease 94 (3) 284 -293.

Becerra, H.; López, V.; Matheus, H.; Batidas, A.; Esteban, A. 2007. Monitoreo de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) vector de La leprosis de los cítricos en el Meta y Casanare. En: Resumenes XXXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología SOCOLEN. p. 142.

Boaretto, M.A.C.; Chiavegato L.G.; Silva, C.A.D. 1993. Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. Científica, São Paulo, 21 (2) 245-253

Boaretto. M.A.; Chiavegato, L.G. 1994. Transmissão da leprose por ácaros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) temporariamente mantidos em hospedeiros intermediários, em condições de laboratório. Científica, São Paulo, 22 (1) 81-93

Carvalho M.; Jeferson L.; Sato, M.; Raga, A.; Arthur, V. 2008. Population dynamics of phytophagous and predaceous mites on coffee in Brazil, with emphasis on Brevipalpus phoenicis. Experimental & Applied Acarology. 44 (4) 277-291.

Colariccio, A.; Lovisolo, O.; Chagas, C.; Galetti, S.; Rossetti, V.; Kitajima, E. 1995. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. Fitopatologia Brasileira. 20: 208-213.

Chagas, C.M.; Rosseti, V. 1983. Transmission of leprosis symptoms by a grafting infected tissue. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IX., Riverside, Annals. Riverside: IOCV, p.70.

Chagas, C.M.; Rosseti, V.; Chiavegato, L. 1983. Influence of the biological cycle of Brevipalpus phoenicis on leprosis transmission. En: Annals IX Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, p.69.

Chiavegato, L.G. 1986. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 21 (8) 813-816

Chiavegato, LG.; Mischan, M. 1987. Comportamento do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em frutos de diferentes variedades cítricas. Científica, São Paulo. 15 (1/2) 17-22

Chiavegato, L.G. 1996. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro Brevipalpus phoenicis Geijskes em citros. Laranja. 17 (1) 229-235.

Childers, C. C.; Rodrigues, J. C. V.; Welbourn, W. C. 2003. Host plants of Brevipalpus californicus, B. obovatus, and B. phoenicis (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. Experimental and Applied Acarology. 30 (1/3) 29-105.

Childers, C.C.; Rodrigues, J.; Derrick, K.; Achor, D.; French, J.; Welbourn, W.; Ochoa, R.; Kitajima, E. 2003. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. Experimental and Applied Acarology. 30 (1-3) 181-202.

Domingues, A.D.; Rodrigues, J.C. 1999. Ocorrência de leprose dos citros em Paraíso do Tocantins (TO). Laranja, Cordeirópolis, 20 (1) 35-50

Freitas-A.J.; Locali, E.C.; Antonioli, R.; Rodrigues, V.; Kitajima, E. W.; Machado, M.A. 2003. Detection of citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. Virus Reviews & Research. 8 (1) 196.

Freitas, A.J.; Cavalcante, M.; Locali, E.; Antonioli, R.; Domingues, A.; Machado, M. 2004. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. Virus Reviews & Research. 9 (1) 246-247.

Freitas, A.J.; Kitajima, E.; Locali, E.; Antonioli, L.; Bastianel, M.; Machado, M. 2005. Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. En: Annals XLV Annual Meeting of the American Phytopathological Society. Caribbean Division. San Jose. APS. p.93.

Gomes, T.; Appezzato-da-Glória, B.; Salaroli, B.; Kitajima, E. 2004. Distribution of CiLV-C in the citrus leaf lesions. In: Congresso Brasileiro de Biologia Celular, XII., 2004, Resumos. Campinas: CBBC.

Haramoto, P.H. 1969. Biology and control of *Brevipalpus phoenicis*. Hawaii Agricultural Experimental Station Technical Bulletin, Mãnoa. 68, p.1-63.

Kitajima, E.W.; Müller, G.; Costa, A.; Yuki, W. 1972. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. Virology. 50: 254-258.

Kitajima, E.W.; Chagas, C.; Rodrigues, J. 2003. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. Experimental and Applied Acarology. 30 (1-5) 135-160.

Kitajima, E., Ferreira, P., Freitas-A, J., Machado, M. 2004. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. Summa Phytopathologica, Botucatu. 30 (68)

León, M.G.; Realpe, O.; Carreño, M.; Garzón, B.; Campos, P. 2005. La Leprosis de los cítricos. Plegable divulgativo N°43. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – Corpoica. Villavicencio, Meta. 5 p.

León, M. G.; Kitajima, E.; Freitas, A.; Childers, C.; Achor, D.; Salarolli, R.; Mesa, C. 2006. Occurrence of Citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. American Phytopatological Society. Plant Disease, Dis. Note. 90 (5) 682.

León, G., Kitajima, E., Freitas, A., Machado, M., Meza, N. 2006. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia. Rev. Corpoica 7 (2) 67-72.

León, G., H. Becerra, R. Salarolli y E. Kitajima. 2008. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus Cytoplasmatic type (CiLV-C) in Colombia. APS. Plant Disease, Disease Note 92 (9) 1364.

Locali, E.C.; Freitas, A.; Souza, A.; Takita, M.; Astúa, G.; Antonioli, R.; Kitajima, E.; Machado, M. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to Citrus production in the Americas. Plant Disease. 87 (11) 1317-1321.

Locali, E.C.; Freitas, A.; Machado, M. 2004. Leprose dos citros: Biologia e diagnóstico. Laranja. 25 (1) 53-68.

Lovisolo, O., Colariccio, A., Masenga V. 2000. New Experimental Hosts and Further Information on Citrus Leprosis Virus. Fourteenth IOCV Conference, 2000— Other Viruses. 164-173

Maia, O.A.; Oliveira, C. 2002. Capacidade de colonização de Brevipalpus phoenicis (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) em cercas vivas, quebra-ventos e plantas daninhas. En: Resumenes XIX Congreso Brasilero de Entomología. p. 249.

Maia, O. M. A., and Oliveira, C. A. L. 2005. Transmissibilidade do vírus da leprose de cercas-vivas, quebra-ventos e plantas daninhas para laranjeiras através de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). Bragantia 64: 417-422.

Melzer, M. J., Sether, D. M., Borth, W. B., and Hu, J. S. 2012. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. Phytopathology 102: 122-127.

NAPPO, 2005. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Sistema de Alerta Fitosanitaria. Detección de la Leprosis en el estado de Chiapas, México. http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=165.

Nunes, M.A., De Oliveira, C.L., De Oliveria, M.L., Kitajima, E., Hilf, M.E., Gottwald, T.R., Freitas-Astua, J. 2012. Transmission of Citrus leprosis virus C by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to Alternative Host Plants Found in Citrus Orchards. Plant Disease. 96: 968-972.

Oliveira, C.L. 1996. Ácaro vetor da leprose dos citros: aspectos biológicos. Laranja, Cordeirópolis. 17 (1) 229-295.

Rodrigues, J.C.; Childers, C.; Kitajima, E.; Machado, M.; Nogueira, N. 2001. Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. Laranja. 22 (2), p.412- 423.

Salvo Filho, A. 1997. Notas sobre o tratamento fitossanitário em citros. Laranja. 18: 155-163

Ulian, L.F.; Oliveira, C. 2002. Leprosis citrus mite *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, behavior on different plants species, used as wind-break in citrus orchards. Revista de Agricultura (Piracicaba). 77 (1) 103-112.

3. Deteción del virus de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2) mediante RT-PCR en los departamentos de Meta y Casanare

Resumen

Este capítulo trata del diagnóstico y detección del nuevo virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático tipo 2 (CiLV-C2) en muestras colectadas en los departamentos del Meta y Casanare, mediante técnicas moleculares RT-PCR realizadas sobre tejido vegetal y ácaros vectores *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). Para las pruebas de detección RT-PCR, se utilizaron los iniciadores específicos MP y CPG. Con los iniciadores CPG, se logró la detección del CiLV-C2, en muestras de tejido vegetal con síntomas de leprosis en frutos y hojas de naranja valencia (*Citrus sinensis* L.) y hojas de *Swinglea gluinosa* Merr., lo cual confirma la presencia de este virus en Colombia. Los iniciadores MP, no detectaron el virus CiLV-C2 en ninguna de las pruebas realizadas. La técnica RT-PCR, permitió detectar el virus CiLV-C2 en muestras de ácaros vectores *B. phoenicis*, cuando se utilizaron los iniciadores específicos CPG. La detección molecular del CiLV-C2, mediante la técnica RT-PCR, se constituye en un instrumento fundamental para el diagnóstico del virus en Colombia y debe ser usada en los programas de detección y prevención de la leprosis de los cítricos en el país.

Palabras clave: Cítricos, leprosis, detección, CiLV-C2.

Abstract

This chapter discusses the diagnosis and detection of the new citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) in samples collected in Meta and Casanare States, using molecular techniques performed RT-PCR on plant tissue and mite vectors Brevipalpus phoenicis (Geijskes). Tests for RT-PCR, was carry out using specific primers MP and

CPG. The use of CPG primers allows the detection of CiLV-C2, in tissue plant samples with leprosis symptoms on fruits and leaves of Valencia orange (*Citrus sinensis* L.) and *Swinglea gluinosa* Merr. leaves, which confirms the presence of this virus in Colombia. The MP primers, did not detect the CiLV-C2 in any of performed tests. The RT-PCR technique, allows detection of CiLV-C2 in samples of *B. phoenicis* mite vectors, with the specific CPG primers. Molecular detection of CiLV-C2 by RT-PCR technique, is a fundamental tool for the virus diagnosis in Colombia, and should be used in diagnosis and prevention programs of citrus leprosis in the country.

Keywords: Citrus, leprosis, detection, CiLV-C.

3.1. Introducción

La leprosis de los cítricos (CiLV) está relacionada con dos tipos de virus, de acuerdo a su ubicación dentro de las células afectadas: el citoplasmático (CiLV-C) cuando se presenta en el citoplasma y el nuclear (CiLV-N) cuando se aloja en el núcleo (Guerra *et al*., 2007; Bastianel *et al*., 2006). La distribución geográfica del CiLV-C es mucho más amplia que la del CiLV-N, el cual solamente se ha encontrado en una región de Panamá y en algunos sitios del Sur de Brasil (Domínguez *et al*., 2001). El de tipo citoplasmático (CiLV-C), es frecuente en las plantaciones de cítricos, mientras que el de tipo nuclear (CiLV-N), es de muy rara ocurrencia (Rodrigues *et al*., 2003; Freitas *et al*., 2004; Kitajima *et al*., 2004; Rodrigues & Kitajima, 2005).

En Colombia se presenta el virus de tipo citoplasmático (CiLV-C) (León *et al.,* 2006), verificado bajo microscopía electrónica en naranja valencia (*Citrus sinensis* L.), por la presencia de partículas cortas baciliformes en el retículo endoplasmático y viroplasmas de formas irregulares en el citoplasma dé las células infectadas, lo cual coincide con descripciones de Kitajima *et al*., (1974) y Colariccio *et al*., (1995).

El CiLV-C, no es un virus común en las plantas (Bastianel *et al.,* 2010). De acuerdo a su morfología y por estar presente en las células del citoplasma o en el núcleo de las células infectadas, se asumía que era un virus de la familia Rhabdoviridae. Colariccio *et al*., (2000) y Rodrigues *et al.,* (2000) reportaron una doble cadena de RNA asociada con el virus CiLV-C extraído de hojas de cítricos. Posteriormente, Locali *et al.*, (2003) al obtener la secuencia genómica del virus, comprueban que esa doble cadena pertenece al CiLV-C y su RNA posee un genoma bipartita, a diferencia del genoma monopartita característico

de los rhabdovirus. Pascon *et al*., (2006) y Bastianel *et al*., (2006) al efectuar la secuencia del genoma completo del CiLV-C y el análisis filogenético, definen que el virus pertenece a una nueva familia de virus de plantas y a un nuevo género llamado cilevirus, relacionado con tobamovirus.

Los virus CiLV-C y CiLV-N, son transmitidos principalmente por ácaros del género *Brevipalpus* (Acarina: Tenuipalpidae). Entre las especies de *Brevipalpus*, el ácaro rojo plano *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) es el vector más diseminado y eficaz en el mundo; otras especies como *B. californicus, B. inornatus* y *B. obovatus* han sido relacionadas también como vectores de estos virus, pero con poca frecuencia. (Rodrígues *et al*., 2003; Childers *et* al., 2001; Rodrigues & Childers, 2013). En Colombia el ácaro *B. phoenicis* ha sido identificado como el principal vector de la leprosis de los cítricos CiLV-C (León *et al*., 2006) y se encuentra registrado y disperso en varias zonas del país (Posada, 1989; León, 2001).

La leprosis de los cítricos se encuentra reportada en Suramérica, Centro América y México. Su importancia se ha incrementado durante los últimos años, puesto que es una enfermedad de carácter cuarentenario, con restricciones que buscan dar protección a la industria citrícola de países citricultores que aún no están afectados. Ha causado pérdidas económicas en Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Venezuela, Costa Rica, Panamá y Honduras. La enfermedad ha sido reportada en Guatemala, Perú, Bolivia, México, Colombia (Freitas *et al.,* 2004 y 2005; Araya, 2000; Domínguez *et al*., 2001; Mejía *et al*., 2005; Gómez *et al*., 2005; USDA, 2004; León *et al*., 2006; NAPPO, 2005) y recientemente en Belice (Rodrigues & Childers, 2013).

En Colombia, la leprosis CiLV-C se observó en el año 2004 en el Departamento de Casanare y se dispersó rápidamente; durante los años 2004 a 2006 se reportó en varios municipios de los Departamentos del Meta y Casanare (León *et al*., 2006; Becerra, *et al*., 2007). El Meta, es el departamento de mayor producción de cítricos en los Llanos Orientales de Colombia, con 4.300 ha sembradas en cítricos, que se encuentran amenazadas por la presencia de la enfermedad y representan el 10% del área nacional cultivada; Casanare, aunque posee solo alrededor de 500 ha sembradas en cítricos, la presencia de la enfermedad continúa actualmente.

Los ácaros del género *Brevipalpus* además de ser los principales transmisores del CiLV, poseen un gran número de plantas hospederas y pueden vivir tanto en cítricos, como en cultivos no cítricos que son exportados de Centro y Sur América hacia Norte América, Europa y Asia (Childers *et al*., 2003; Childers, Rodrigues, *et al*., 2003). Childers *et al.,* (2003), reportan 486 plantas que hospedan la especie *B. phoenicis*, por lo cual la leprosis CiLV-C es considerada una amenaza para la industria citrícola de varios países.

El CiLV-C afecta varias especies de cítricos, principalmente naranjos (*Citrus cinensis)* y mandarinos (*Citrus reticulata*) (Domingues y Rodrigues 1999; Bastianel, *et.al.,* 2004). Anteriormente, las únicas plantas reconocidas como hospederos naturales del virus de la leprosis CiLV-C eran rutáceas del género *Citrus* (Rodrigues *et al.,* 2003). Colariccio *et al*., (1995), lograron transmitir mecánicamente el virus hacia hospederos herbáceos y plantas indicadoras como *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* (Chenopodiaceae) y *Glomphrena globosa* (Amaranthaceae). Lovisolo *et al*., (2000) ampliaron el número conocido de hospederos alternos del virus a 13 especies de 5 géneros diferentes a rutáceas, entre las cuales mencionan *G. globosa* (Amaranthaceae), *Tetragonia tetragonioides* (Tetragoniaceae), *Atriplex hortensis, A. latifolia, Beta vulgaris* ssp. *cicla* y *Chenopodium bonus-henricus* (Chenopodiaceae), como nuevos registros de hospederos experimentales del virus de la leprosis (CiLV). Nunes *et al*., (2012), mediante análisis RT-PCR y microscopía electrónica, reportan a *Hibiscus rosa-sinensis, Malvaviscus arboreus* (Malvaceae), *Grevilea robusta* (Proteaceae) y *Bixa Orellana* (Bixaceae), como plantas hospederas del virus. En Colombia, el virus también fue detectado afectando en forma natural hojas de *Swinglea gluinosa*, especie ampliamente utilizada en el país como cerca viva (León *et al.*, 2008).

Los métodos utilizados durante años para el diagnóstico de la enfermedad fueron el reconocimiento de síntomas, las pruebas de transmisión mecánica o con el ácaro vector y los análisis de tejido infectado mediante microscopía electrónica (Kitajima *et al*., 1972; Colariccio *et al*., 1995). Sin embargo todos estos métodos tienen una o más desventajas: no tienen especificidad, son poco confiables tienen altos costos y se requiere mucho tiempo para obtener resultados.

Kitajima *et al*., (1972), describen partículas virales de CiLV-C en los tejidos de hojas sintomáticas; dichas partículas no se encuentran en las áreas asintomáticas de los alrededores, lo cual indica que el virus no es sistémico en la planta, y por tanto su diseminación depende de los hábitos de alimentación y el movimiento de los ácaros vectores infectados con el virus (Ferreira *et al*., 2003; Rodrigues *et al*., 2003).

Locali *et al*. (2003), desarrollaron el primer método específico molecular para el diagnóstico de la enfermedad a través de RT-PCR (Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa), el cual permite una detección del virus rápida y eficiente en todos los tejidos infectados. Los diagnósticos mediante RT-PCR, han sido utilizados para confirmar la presencia del virus en el vector y también para estudiar la resistencia genética o la tolerancia de genotipos de cítricos, puesto que mediante estas pruebas es posible detectar el virus en plantas asintomáticas (Freitas *et al*., 2003 y 2005; Gómez *et al*., 2005; Bastianel *et al*., 2004). En Colombia no existen reportes sobre diagnóstico de CiLV-C en ácaros vectores. Kubo *et al*., (2011), reportan detección del virus CiLV-C y otros virus de plantas en ácaros *Brevipalpus* spp., usando la técnica RT-PCR con iniciadores específicos y resultados positivos.

La caracterización molecular del CiLV-C, fue posible a través de la extracción de moléculas de RNA de hojas de cítricos con síntomas de leprosis. Colariccio *et al*. (2000) y Rodrigues (2000), mostraron la presencia de moléculas de RNA en tejidos con leprosis, mientras que Locali *et al.* (2003), demostraron la naturaleza viral de estas moléculas y las usaron para construir la secuencia DNA del virus citoplasmático. Con la secuencia parcial del genoma del virus CiLV-C, se obtuvieron dos pares de iniciadores que amplifican específicamente regiones dentro de la replicasa putativa (Rep) y la proteína de movimiento (MP), para la detección del CiLV-C por medio de RT-PCR. Locali *et al*., (2006) y Pascon *et al*., (2006), publican la secuencia completa de nucleótidos, la organización genética y el análisis filogenético del virus de la leprosis tipo citoplasmático CiLV-C.

Según Locali *et al.* (2004); Freitas *et al*. (2005), los resultados de pruebas de detección molecular con los iniciadores que amplifican eficientemente regiones del virus citoplasmático CiLV-C no sirven para hacerlo con el virus nuclear CiLV-N, con lo cual se comprobó que los dos virus son diferentes. Guerra *et al*., (2007) reportan la

caracterización parcial del genoma del virus citoplasmático (CiLV-C), con RNA de genoma bipartita y confirman que los síntomas causados por los dos tipos de virus CiLV, el nuclear y el citoplasmático, son causados por dos virus distintos.

La detección del Virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) en Colombia se efectuó por métodos moleculares RT-PCR y microscopía electrónica. El análisis RT-PCR fue efectuado con los iniciadores MPF (5'-CGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC-3') y MPR (5'-TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT-3'), que amplificaron fragmentos específicos del genoma viral. Una de las amplificaciones de DNA citoplasmático fue secuenciada (NCBI-GenBank DQ272491) y esta secuencia coincidió 98% con la secuencia de nucleótidos del CiLV-C aislado del Brasil (GenBank AY289190.1), lo cual permitió adelantar el diagnóstico molecular del virus en Colombia. (León *et al.*, 2006).

Colariccio *et al*. (2000) y Guerra *et al*. (2007) describieron la asociación de RNA bipartita, positivo del virus de la leprosis de los cítricos citoplasmática CiLV-C. La secuencia completa del genoma bipartita de CiLV-C muestra que el RNA 1 posee dos marcos de lectura abierta (Open Reading Frame- ORF). El ORF1 en el RNA 1 codifica una poliproteína de 276 kDa y el ORF2 en el ARN1 no muestra ninguna similitud con otras secuencias en el GenBank. El RNA 2 tiene tres ORFs. Si bien ORF1 y 3 de RNA 2 no muestran ninguna similitud con las secuencias en el GenBank, el ORF2 codifica una proteína de movimiento 30,6 kDa.

Recientemente en Colombia, la detección del CiLV-C mediante la técnica RT-PCR, no resultó específica. Lenis y Angel (2009), evaluaron 15 parejas de iniciadores diferentes para la detección del CiLV-C por medio de pruebas RT-PCR, y solamente lograron detección del virus con una pareja (LCL1/MP4), que codifican con la proteína de movimiento P32, pero los resultados no fueron reproducibles. Estos resultados, confirman que el CiLV-C en Colombia, presenta diferencias con las secuencias previas reportadas en la base de datos del GenBank. Por ello concluyen que el diagnóstico mediante técnicas RT-PCR, con los iniciadores que originalmente detectaron, presenta inespecificidad para la amplificación molecular de diferentes regiones del genoma, y sugieren que el virus CiLV-C presente en Colombia, se debe secuenciar para establecer el grado de variabilidad entre estos aislamientos.

Roy *et al*., (2013) confirman que durante los años 2010 y 2011, las pruebas de diagnóstico por RT-PCR, con los iniciadores amplificados de la secuenciación GenBank DQ272491, fallaron para detectar el virus de la leprosis en Colombia; los escasos resultados positivos obtenidos, no fueron reproducibles cuando el virus se logró detectar con dichos iniciadores.

Por ello, en trabajo cooperativo con la Universidad de La Florida y USDA-APHIS, se secuenció nuevamente el genoma completo del virus, a partir de muestras con síntomas de leprosis, colectadas en los Departamentos del Meta y Casanare, encontrando un nuevo tipo de virus de leprosis en Colombia, el cual de acuerdo al análisis filogenético, se clasificó como miembro del género Cilevirus y se denominó virus de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2). Aun cuando la estructura de los genomas de los dos virus es muy similar, el genoma completo de CiLV-C2 contiene en sus RNA -1 y RNA -2 un total de 8.717 y 4.989 nucleótidos respectivamente, a diferencia del CiLV-C (genBank accession DQ157465-66), que posee 8.730 y 4.975 nucleótidos en los RNA -1 y RNA -2 respectivamente. El marco de lectura abierta 1 (ORF1) del CiLV-C2 codifica el módulo de replicación y contiene en su RNA -1, máximo 60% de nucleótidos y aminoácidos idénticos a los que posee el ORF1 del CiLV-C; la proteína putativa (CPG) p29, del CiLV-C2 tiene en su secuencia únicamente 48% de nucleótidos y 33% de aminoácidos idénticos a los de la secuencia de la p29 del CiLV-C. Además, el RNA -2 del nuevo CiLV-C2, que codifica el movimiento de proteína MP, contiene un marco de lectura abierta adicional y una proteína hipotética (p7) más que el RNA -2 del CiLV-C. (Roy *et al*., 2013).

El artículo científico resultado de dicha investigación “A Novel Virus of the Genus *Cilevirus* Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis” fue publicado en Mayo de 2013, en la revista Phytopathology, Volumen 103, Numero 5. Páginas 488-500. El artículo completo se anexa a la presente disertación (Anexo A) y se aclara que para efectuar la detección del virus de la leprosis CiLV-C2 mediante pruebas moleculares RT-PCR, en la presente tesis se utilizaron los iniciadores (CPG-F y CPG-R), desarrollados en la investigación mencionada y se comparan con los iniciadores MPR y MPF, anteriormente utilizados.

3.2. Metodología

Inicialmente, se realizaron pruebas moleculares con la técnica RT-PCR, para muestras de hojas de naranja valencia, (*Citrus sinensis* L.) y *Swinglea glutinosa* con lesiones de leprosis, colectadas de árboles que anteriormente habían resultado positivos a CiLV-C, mediante RT-PCR con los iniciadores MPF y MPR, secuencias 5'-CGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC-3' y 5'-TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT-3', respectivamente, que codifican la proteína de movimiento (339 bp). Posteriormente, luego de confirmar la detección negativa del virus con dichos iniciadores, se procedió a efectuar pruebas de detección molecular para el virus de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2). Para la detección del virus CiLV-C2, se utilizaron los iniciadores específicos desarrollados por Roy *et al*., (2013), denominados iniciador especifico positivo CPG-F, secuencia 5'-ATG AGT AAC ATT GTG TCG TTT TCG TTG T-3', e iniciador específico negativo CPG-R, secuencia 5'-TCA CTC TTC CTG TTC ATC AAC CTG TT-3', que codificaron exitosamente el amplicón del gen de proteína de la cubierta (CPG - 795 bp), para muestras de Colombia. En las pruebas realizadas, se incluyó paralelamente la utilización de los iniciadores MP, para comparación de los diagnósticos; adicionalmente, se realizaron pruebas de detección RT-PCR en ácaros *B.phoenicis,* previamente colocados en alimentación sobre hojas de naranja valencia con lesiones de leprosis de los cítricos.

3.2.1. Obtención del material vegetal y ácaros *B. phoenicis*

La obtención del material vegetal se realizó mediante colecta de muestras de hojas y frutos de naranja valencia con síntomas de leprosis de los cítricos, en árboles de fincas del Meta y Casanare, así como en los huertos de cítricos de los centros de Investigación La Libertad y Taluma de CORPOICA. Los árboles muestreados, habían resultado positivos a CiLV-C en estudios anteriores, mediante pruebas RT-PCR con los iniciadores MPR y MPF. Para *S. glutinosa*, se colectaron hojas con lesiones de leprosis en las localidades de Guamal y Villavicencio.

Para el Departamento de Casanare, las muestras fueron colectadas en los municipios de Aguazul, (finca Villa Flor - N 05º 09`55,7" W 72º 4`14.0") y Yopal, (finca La Parcela - N 05º 25`72" W 73º 59`11,04"). Para el departamento del Meta, las muestras fueron colectadas en los municipios de Villavicencio, (C.I. La Libertad - N 04º 03`44,8" W 73º

27`9,6"), Guamal, (finca El Progreso - N 03º 52`53.1" W 073º 45`44.7") y Puerto Gaitán, (C.I. Taluma - N 04º 22`28.5" W 072º 13`37.7").

Los ácaros vectores, libres de virus, se obtuvieron de las colonias de multiplicación de *B. phoenicis*, del laboratorio de entomología de CORPOICA en el C.I. La Libertad. Para permitir la adquisición del virus por los ácaros, se colocaron en alimentación durante cinco días, adultos y ninfas del ácaro sobre hojas de naranja valencia con síntomas de leprosis, colectadas en los departamentos de Meta y Casanare, C.I. La Libertad y finca Villa Flor respectivamente. En este proceso, se utilizó la metodología descrita en el capítulo 1 de la presente tesis. Una vez transcurrido el período de adquisición del virus, se colectaron los ácaros y se almacenaron en viales de vidrio con etanol 90% a temperatura controlada de -20^{o}C. Posteriormente los ácaros *B. phoenicis* fueron procesados y se efectuó prueba de diagnóstico molecular RT-PCR para la detección molecular del virus CiLV-C2, utilizando la metodología descrita por Kubo *et al*., (2011).

3.2.2 Procesamiento del material - Puebas RT-PCR

Las muestras de material vegetal fueron llevadas al laboratorio de biotecnología de CORPOICA en el Centro de Investigación Tibaitata, para diagnóstico molecular del virus mediante técnica RT-PCR.

La extracción de RNA total de tejido vegetal, se efectuó tomando 0.1 g de hojas o corteza de frutos con lesiones de leprosis por muestra según el caso. La muestra se macero en nitrógeno líquido hasta obtener una proporción de polvo muy fino y se homogenizó mediante la adición de 100 µl de Trizol por cada macerado; se siguió el protocolo para extracción de RNA con Trizol® de la compañía Invitrogen (Anexo F-1). Las pruebas de RT-PCR fueron realizadas utilizando Superscript III First-strand Reverse Transcriptase (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo de la casa fabricante. El resumen se encuentra en el Anexo F-1. Para los ácaros vectores, se procesaron muestras con un mínimo de 20 individuos, de acuerdo al protocolo de extracción de ARN con buffer CTAB (Anexo F2).

Para la detección de CiLV-C2 tanto en tejido vegetal, como en ácaros se utilizó la técnica RT-PCR con los nuevos pares de iniciadores CPG-F y CPG-R; paralelamente se utilizaron los iniciadores MP-F y MP-R para comparar los diagnósticos. El Resumen del protocolo PCR y el programa de termociclado utilizado en las pruebas se encuentran en el Anexo F-3. Las pruebas de diagnóstico molecular RT-PCR que se exponen en la presente tesis son las siguientes:

- **Prueba RT-PCR - Iniciadores MP:** Detección del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) con iniciadores MP, para muestras de hojas de naranja (*Citrus cinensis*) y *Swinglea gluinosa* colectadas en los departamentos del Meta (localidades La Libertad, Guamal, Taluma) y Casanare (localidad de Yopal).
- **Prueba RT-PCR - Departamentos Meta y Casanare:** Comparación de los iniciadores MP y CPG, para detección del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV), por medio de una prueba de RT-PCR. Esta prueba se realizó con muestras de lesiones de hojas de naranja valencia (*C. cinensis*), colectadas en los departamentos del Meta y Casanare.
- **Prueba RT-PCR - Tejido vegetal:** Detección del virus de la leprosis de los cítricos Tipo 2 (CiLV-C2) con el nuevo iniciador específico CPG, para muestras de lesiones de hojas de *S. glutinosa*, y lesiones de hojas y frutos de naranja valencia colectadas en los departamentos del Meta y Casanare. Los amplicones obtenidos en la Prueba 2, se utilizaron como controles positivos para Meta y Casanare.
- **Prueba RT-PCR - Tamaño de lesiones cítricos y *S. glutinosa*:** Detección del virus de la leprosis de los cítricos Tipo 2 (CiLV-C2) con el nuevo iniciador específico CPG, para hojas de naranja valencia y *S. glutinosa*, colectadas en los departamentos del Meta y Casanare, comparando muestras de lesiones de diferente tamaño. Para el control positivo se utilizó el producto RT-PCR correspondiente a la muestra Casanare obtenido en la Prueba 2.
- **Prueba RT-PCR 5 - Ácaros *B. phoenicis*:** Detección del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C2) con iniciadores MP y CPG, para ácaros *Brevipalpus phoenicis* con período previo de tres días de alimentación sobre hojas de naranja valencia, colectadas de árboles positivos a CiLV-C2 en los departamentos del Meta y Casanare. Los productos amplificados en la Prueba 2, se utilizaron como controles positivos para Meta y Casanare.

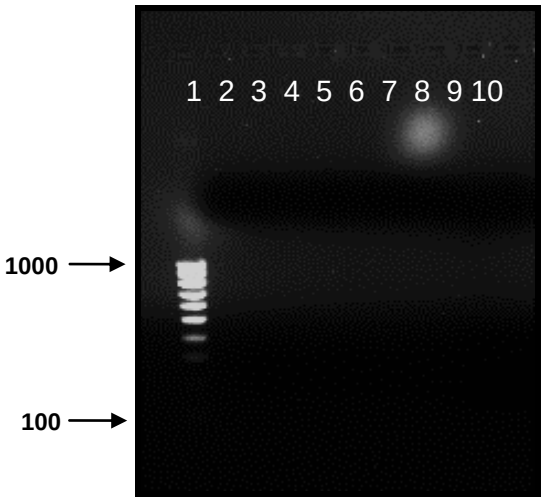
3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Prueba RT-PCR - Iniciadores MP

Al desarrollar la prueba RT-PCR con los iniciadores MP (339 pb), para la detección del virus de la leprosis de los cítricos en muestras de naranja valencia (*C. cinensis*) y *Swinglea glutinosa* colectadas en los departamentos del Meta y Casanare, localidades La Libertad, Guamal, Taluma y Yopal, el resultado fue negativo para la totalidad de las

muestras analizadas, a pesar que en estudios de diagnóstico previos, habían funcionado para el diagnóstico del virus CiLV-C en Colombia (León *et al*., 2006). El resultado de la prueba (Figura 3-1), corresponde al gel de Agarosa 1%, buffer TAE 1X, por 1 hora a 80 voltios, obtenido de las muestras evaluadas con los productos de PCR, en el cual no se observa amplificación de los fragmentos esperados para ninguno de los casos.

Figura 3-1: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores MP, para muestras de naranja y *S. glutinosa* colectadas en diferentes localidades del Meta y Casanare. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV, **línea 2:** Yopal-hojas, **línea 3:** Yopal-frutos, **líneas 4 y 5:** La Libertad-hojas, **líneas 6 y 7:** Guamal-hojas, **línea 8:** Guamal, *S. glutinosa*, **línea 9:** Taluma-hojas; **línea 10:** Control Positivo (CiLV-C2) Casanare.

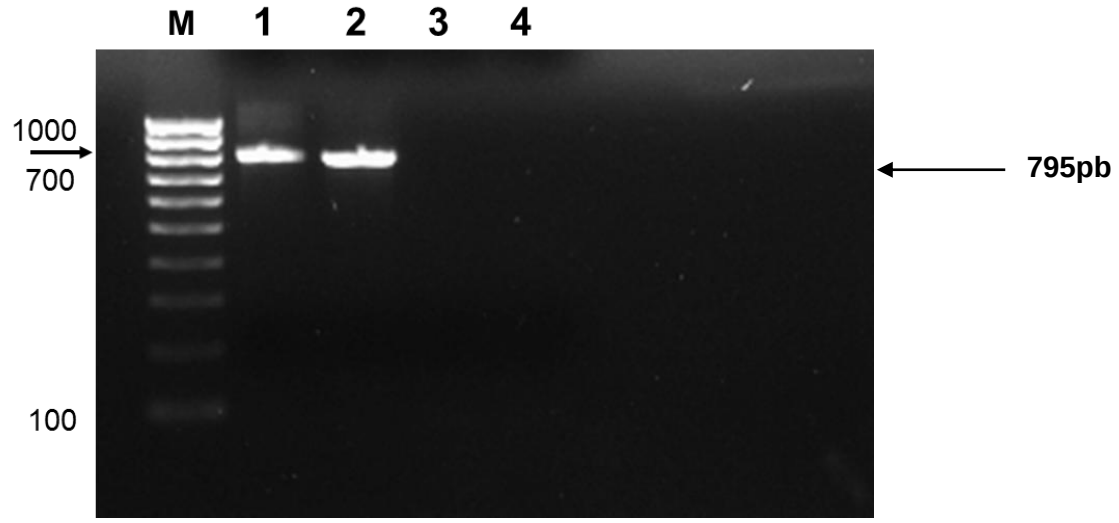


3.3.2.Prueba RT-PCR - Departamentos Meta y Casanare

Al comparar los iniciadores específicos CPG y MP, por medio de la prueba molecular RT-PCR para la detección del virus de la leprosis CiLV, en lesiones de leprosis de muestras de hojas de naranjo (*Citrus sinensis* L.), colectadas en los departamentos de Meta y Casanare, se encontró que únicamente los nuevos iniciadores CPG, lograron la amplificación de la secuencia genética esperada al nivel 795 bp. Con los iniciadores MP, no se logró ninguna amplificación (Figura 3-2). La concentración viral de las extracciones obtenidas fue de 335,9 ng/µl, para la muestra del Meta y de 558,3 ng/µl, para la muestra de Casanare.

Este diagnóstico, confirma los resultados de detección para el virus de la leprosis de los cítricos obtenidos por Lenis y Angel (2010) y Roy *et al*., (2013), y demuestra que el virus presente en las muestras analizadas de los Departamentos del Meta y Casanare, corresponde al virus citoplasmático de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2).

Figura 3-2: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores CPG y MP para muestras de naranja valencia colectadas en Meta y Casanare. **M:** Marcador de peso molecular 100 pb (Biolabs); **Línea 1:** Meta iniciador CPG; **Línea 2:** Casanare iniciador CPG; **Línea 3:** Meta iniciador MP; **Línea 4:** Casanare iniciador MP.



3.3.3 Prueba RT-PCR - Tejido vegetal

Para esta prueba de detección del virus de la leprosis de los cítricos Tipo 2 (CiLV-C2), usando el nuevo iniciador específico CPG, para lesiones de hojas de *S. glutinosa*, y lesiones de hojas y frutos de naranja valencia colectadas en los departamentos del Meta y Casanare, únicamente se encontraron detecciones positivas para las muestras analizadas de lesiones de frutos colectados en Yopal, departamento de Casanare y lesiones de hojas colectadas en el C.I. La Libertad, departamento del Meta.

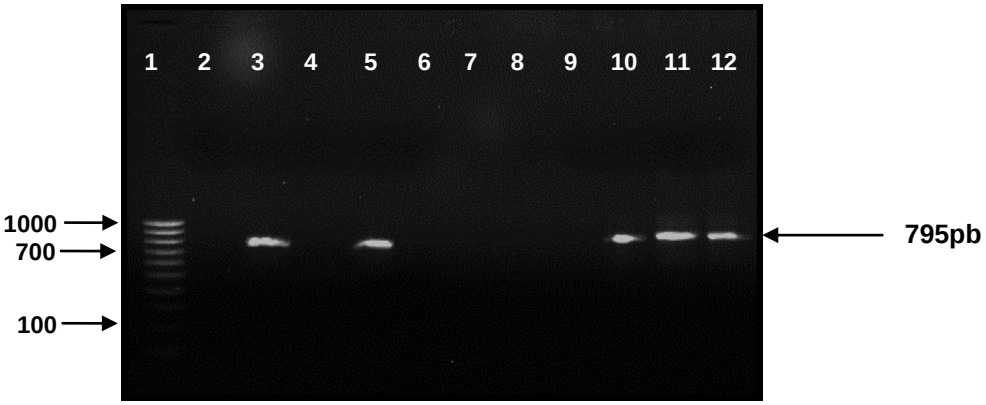
Teniendo en cuenta que los controles positivos utilizados en esta prueba, fueron amplificados exitosamente, se esperaba detección positiva para la totalidad de las muestras analizadas. Las concentraciones virales obtenidas con espectrofotómetro NanoDrop 1000 Thermo scientific, presentan diferencias considerables para cada una de las extracciones (Tabla 3-1), lo cual permite explicar los resultados obtenidos.

Dado que la mínima concentración detectable en el presente estudio fue de 132,7 ng/µl., se encuentra que únicamente las muestras de Yopal frutos y La Libertad 4 (líneas 3 y 5), superan estas concentraciones con 176,2 y 371,8 ng/ µl, y por lo tanto, resultaron positivas para el virus de la leprosis de los cítricos Tipo 2 (CiLV-C2) con la técnica de diagnóstico RT-PCR realizada (Figura 3-3).

Tabla 3-1: Concentración de RNA total obtenida de extracciones de tejido vegetal con lesiones de leprosis en los departamentos del Meta y Casanare

Localidad Tejido vegetal	**Concentración RNA total ng/ µl**
Yopal hojas	71,2
Yopal frutos	176,2
La libertad hojas	85,1
La Libertad hojas	371,8
Guamal hojas	127,6
Guamal hojas	87,8
S. glutinosa	62,7
Taluma hojas	2,1
Taluma frutos	167,2

Figura 3-3: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores CPG. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV; **línea 2:** Yopal Hojas; **línea 3:** Yopal Frutos; **línea 4:** La Libertad hojas; **línea 5:** La Libertad hojas; **líneas 6 y 7:** Guamal hojas; **línea 8:** *Swinglea,* Guamal hojas; **línea 9:** Taluma hojas; **línea 10:** Taluma frutos; **línea 11:** Control positivo Meta; **línea 12:** Control positivo Casanare.



3.3.4 Prueba RT-PCR - Tamaño de lesiones cítricos y *S. glutinosa*

Esta prueba se realizó con el fin de lograr el diagnóstico del virus tipo 2 (CiLV-C2), a partir de muestras de hojas de naranja valencia y *S. glutinosa*, comparando lesiones de leprosis grandes (mayores a 1.0 cm de diámetro) y pequeñas (menores a 0.5 cm de diámetro). Para el control positivo, se utilizó el producto correspondiente a la muestra positiva de Casanare obtenido en la Prueba 2.

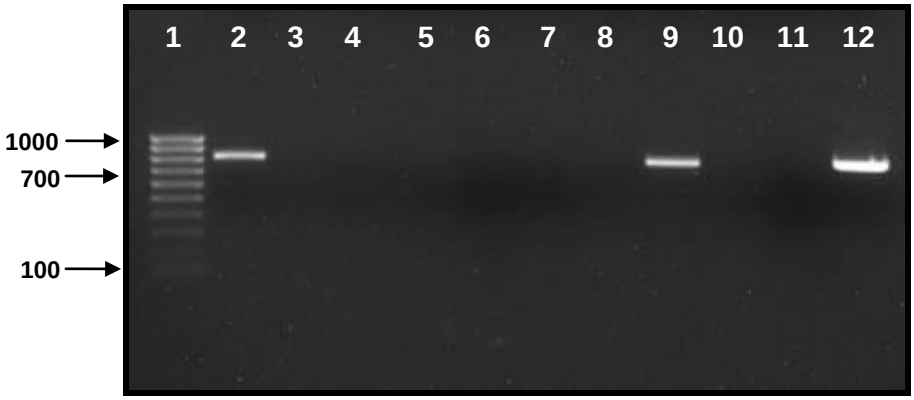
Los resultados muestran detección únicamente en dos de las diez muestras evaluadas. Se obtuvo amplificación para las muestras de hojas de naranjo (*C. sinensis*) con lesiones menores a 0.5 cm colectadas de árboles del C.I. La Libertad, y para la muestra de *S. glutinosa* con lesiones pequeñas colectada en la localidad de Guamal. Parece haber una mejor detección sobre las lesiones con diámetros menores a 0.5 cm, pero los resultados no permiten concluir con seguridad acerca del tamaño apropiado para el diagnóstico positivo del CiLV-C2, con el método RT-PCR utilizado en este estudio. Las concentraciones virales obtenidas por cuantificación con espectrofotómetro NanoDrop 1000 Thermo scientific, para cada extracción se presentan en la tabla 3-2.

Tabla 3-2: Concentración de RNA total obtenida en extracciones de lesiones de leprosis grandes y pequeñas colectadas en los departamentos del Meta y Casanare

Localidad Tamaño de lesión	Concentración de RNA total ng/ µl
Libertad 1 lesiones pequeñas	187,9
Libertad 4 lesiones pequeñas	121,4
Libertad 4 lesiones grandes	56,4
Taluma lesiones grandes	67,8
Taluma lesiones pequeñas	34,8
Yopal lesiones grandes	119,8
Yopal lesiones pequeñas	12,4
***S. glutinosa* Guamal pequeñas**	233,3
Libertad 1 lesiones grandes	77,8
Guamal lesiones grandes	68,5

Se destaca la amplificación obtenida para la muestra de *S. glutinosa* con lesiones pequeñas, lo cual permite afirmar que esta planta no cítrica es susceptible a la infección por virus de la leprosis tipo 2 (CiLV-C2), y se constituye en el primer registro de detección este tipo de virus en una planta no cítrica (Figura 3-4).

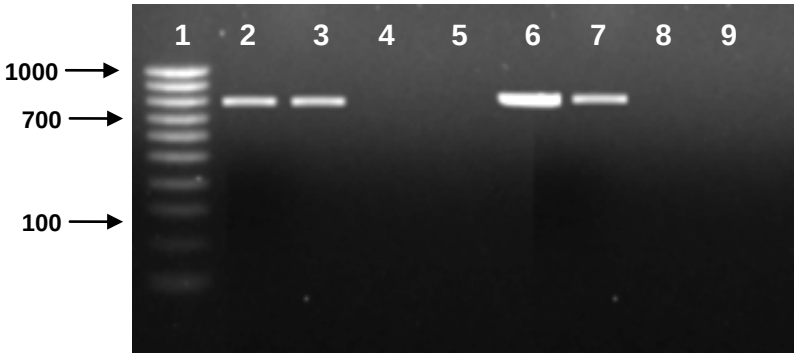
Figura 3-4: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores CPG para tejido vegetal con lesiones de diferente tamaño. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV; **línea 2:** Libertad pequeñas; **línea 3:** Libertad pequeñas; **línea 4:** Libertad Grandes; **línea 5:** Taluma grandes; **línea 6:** Taluma pequeñas; **línea 7:** Yopal grandes; **línea 8:** Yopal pequeñas; **línea 9:** *S. glutinosa* Guamal pequeñas; **línea 10:** Libertad 1; **línea 11:** Guamal; **línea 12:** Control positivo.



3.3.5 Prueba RT-PCR - Ácaros *B. phoenicis*

Los resultados de esta prueba se presentan en la figura 3-5. El diagnóstico RT-PCR utilizando los iniciadores específicos CPG, permitió la detección exitosa del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C2) para muestras de ácaros *B. phoenicis* infectados con virus CiLV-C2 de árboles de Meta y Casanare (líneas 2 y 3). Los iniciadores MP, no lograron la amplificación de ninguna de las muestras de ácaros evaluadas, ni tampoco de los controles putilizados en esta prueba.

Figura 3-5: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos RT-PCR con iniciadores CPG y MP, para ácaros *B. phoenicis* infectados con virus CiLV-C2. **Línea 1:** Marcador de peso molecular hyperladder IV; **línea 2:** *B.phoenicis* Meta, iniciador CPG; **línea 3:** *B.phoenicis*, Casanare iniciador CPG; **línea 4:** *B.phoenicis* Meta, iniciador MP; **línea 5:** *B.phoenicis* Casanare iniciador MP; **línea 6:** Control positivo Meta, iniciador CPG; **línea 7:** Control positivo Casanare, iniciador CPG; **línea 8:** Control Meta, iniciador MP; **línea 9:** Control Casanare, iniciador MP.



3.4. Conclusiones

Los resultados de detección molecular del presente estudio, confirman la presencia del virus citoplasmático de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2) en Colombia, puesto que se logró detección positiva del virus, mediante la técnica RT-PCR para muestras de tejido vegetal de naranjo y *S. glutinosa*, colectadas en los departamentos del Meta y Casanare, así como para ácaros vectores *B. phoenicis*, utilizando los iniciadores específicos CPG-F y CPG-R.

Los iniciadores MP utilizados para el diagnóstico del virus de la leprosis de los cítricos en este estudio, no detectaron el virus citoplasmático de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-2), en muestras de naranjo (*C. sinensis*) y *S. gluinosa*, colectadas en los departamentos del Meta y Casanare; tampoco fue positiva la detección del virus para ácaros vectores *B.phoenicis*, con dichos iniciadores.

El diagnóstico positivo del virus de la leprosis tipo 2 (CiLV-C2) en *Swinglea glutinosa*, se constituye en el primer registro de detección de este tipo de virus en una planta no cítrica; demuestra además que *S. glutinosa*, es una planta hospedera alternativa de este tipo de virus, lo cual puede contribuir a la diseminación de la enfermedad en Colombia.

La detección positiva del virus CiLV-C2, en ácaros vectores *B. phoenicis* por medio de técnicas RT-PCR utilizadas en el presente estudio, utilizando los iniciadores específicos CPG-F y CPG-R, se constituye en una herramienta importante para el diagnóstico y la prevención de la diseminación del virus en Colombia

Bibliografía

Araya G. 2000. Informe sobre la prospección de la "leprosis de los cítricos" en la zona fronteriza (Costa Rica – Panamá). Ministerio de Agricultura y Ganadería, Panamá.

Bastianel, M., A. Freitas, V. Rodrigues, F. Arrivabem, L. Antonioli, M. Machado. 2004. Resposta do tangor ´Murcott´ à inoculação do vírus da leprose dos citros em campo e em casa de vegetação. Laranja 2: 337-348.

Bastianel, M., Freitas, J., Kitajima, E., Machado, M. 2006. The citrus leprosis pathosystem. Summa Phytophatol. 32 (3) 211-220.

Bastianel, M., Bassanezi, R., Freitas, J., Kitajima, E., Kubo, K., M. Machado. 2010. Citrus Leprosis Centennial of an unusual mite – vírus pathosystem. Plant Disease 94 (3) 284 -293.

Becerra, H., López, V, Matheus, H., Batidas, A., A. Esteban. 2007. Monitoreo de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) vector de La leprosis de los cítricos en el Meta y Casanare. pp. 142. En: Resumenes XXXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología Socolen.

Bitancourt, A. 1955. Estudos sobre a leprose dos citros. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 22: 161-231.

Colariccio, A.; Lovisolo, O.; Chagas, C.; Galetti, S.; Rossetti, V.; Kitajima, E. 1995. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. Fitopatologia Brasileira. 20: 208-213.

Colariccio, A., Lovisolo, O., Boccardo, G., Chagas, C. M., D'aquilio, M., and Rossetti, V. 2000. Preliminary Purification and Double Stranded RNA Analysis of Citrus Leprosis Virus. 14th IOCV Conf. pp. 159-163.

Childers C., Kitajima E., Welbourn C., Rivera C. and Ochoa R. 2001. *Brevipalpus* mites on citrus and their status as vectors of citrus leprosis. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 60: 66 - 70.

Childers, C., Rodriguez, J., Wellbourn, W. 2003. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. Experimental and Applied Acarology. 30: 29 -105.

Childers C., Rodrigues J.C., Derrick K., Achor D., French J., Welbourn C., Ochoa R. and Kitajima E. 2003. The status of citrus leprosis in Florida and Texas: past and present. Experimental and Applied Acarology. 30: 181 - 202.

Domingues, A.D.; Rodrigues, J.C. 1999. Ocorrência de leprose dos citros em Paraíso do Tocantins (TO). Laranja, Cordeirópolis, 20 (1) 35-50

Domingues, F.; Bernal, A.; Childers, C.; Kitajima, E. 2001. First report of citrus leprosis on Panama. Plant Disease, St. Paul. 85: 228.

Ferreira, P.; Freitas-Astúa, J.; Rodrigues, J.C.; Kitajima, E. 2003. Dados preliminares de transmissão mecânica e por ácaros de alguns dos vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae). Fitopatologia Brasileira, Fortaleza. 28: 250.

Freitas-Astúa, J.; Locali, E.C.; Antonioli, R.; Rodrigues, V.; Kitajima, E. W.; Machado, M.A. 2003. Detection of citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. Virus Reviews & Research. 8 (1) 196.

Freitas, A. J., Cavalcante, M., Locali, E., Antonioli, R., Domingues A. y Machado. M. 2004. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. Virus Reviews & Research 9 (1) 246-247.

Freitas, A. J., Kitajima, E., Locali, E., Antonioli, L., Bastianel M. y Machado, M. 2005. Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear

types are different viruses. En: Annals XLV Annual Meeting of the American Phytopathological Society (APS). Caribbean Division. San Jose. pp. 93.

Gómez, E., Rivadameira, V., Locali, E., Freitas, A., Astúa, G., Rodrigues, J., Mesa N. y Kitajima, E. 2005. First report of citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz, Bolivia. Plant Dis. 89 (6) 686.

Guerra-M.; Keremane, M.; Brlansky, R.; Lee, R. 2007. Citrus leprosis symptoms can be associated with the presence of two different viruses: Cytoplasmic and Nuclear, the Former Having a Multipartite RNA Genome. International Organization of Citrus Virologists Proceedings, 16th Conference, Pgs. 230-239.

Kitajima, E.W.; Müller, G.; Costa, A.; Yuki, W. 1972. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. Virology. 50: 254 - 258.

Kitajima, E.; Rosillo, M.; Portillo, M.; Muller, G.; Costa, A. 1974. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. Fitopatologia, Lima, 9: 55 - 56.

Kitajima, E., Ferreira, Freitas A. J. y Machado, M. 2004. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. Summa Phytopathologyca. 30: 68.

Kubo, K., Novelli, V., Bastianel, M., Locali-F., E., Antonioli-L., R., Machado, M., Freitas-A., J. 2011. Detection of *Brevipalpus* transmitted viruses in their mite vectors by RT–PCR. Experimental and Applied Acarology. 54: 33 - 39

Lenis, B.; Angel, J. (2010). Evaluación de iniciadores para la detección del vírus de la leprosis de los cítricos mediante la técnica Transmisión Reversa Reacción en Cadena de La Polimerasa. Universidad Francisco de Paula Santander. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. 134 p.

León, G. 2001. Insectos de los cítricos. Guía ilustrada de plagas y benéficos con técnicas para el manejo de los insectos dañinos. Ed. Produmedios. Bogotá. 81 p.

León, G., Kitajima E., A. Freitas, C. Childers, D. Achor, R. Salarolli y C. Mesa. 2006. Occurrence of Citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. American Phytopatological Society. Plant Dis. Note. 90 (5) 682.

León, G., Kitajima, E., Freitas, A., Machado, M., Meza, N. 2006. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia. Rev. Corpoica 7 (2) 67-72.

León, G., H. Becerra, R. Salarolli y E. Kitajima. 2008. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus Cytoplasmatic type (CiLV-C) in Colombia. American Phytopatological Society. APS. Plant Disease, Disease Note 92 (9) 1364.

Locali-F, E.; Freitas, A. J.; Souza, M.; Takita, M.; Astúa, G.; Antonioli R.; Kitajima, E.; Machado, M. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to Citrus production in the Americas. Plant Disease. 87 (11) 1317-1321.

Locali-F., E.; Freitas, A.; Machado, M. 2004. Leprose dos citros: Biologia e diagnóstico. Laranja. 25 (1) 53-68.

Locali-F., E.; Freitas-A, J.; Souza, A.; Takita.; M.; Astua, G.; Antonioli-L., R.; Rodrigues, V.; Targon, N.; Machado, M. 2006. Complete nucleotide sequence genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. Journal of General Virology. 87: 2721–2729

Lovisolo, O., Colariccio, A., Masenga V. 2000. New Experimental Hosts and Further Information on Citrus Leprosis Virus. Fourteenth IOCV Conference, 2000— Other Viruses. 164-173

Mejia, L., A. Paniagua, N. Cruz, M. Porras y M. Palmieri. 2005. Citrus leprosis, disease that endangers plantations in Guatemala. pp. 17-19. En: Annals Annual Meeting of American Phytopathological Society, Caribbean Division.

NAPPO, 2005. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Sistema de Aletra Fitosanitaria. Detección de la Leprosis en el estado de Chiapas, México, http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=165; consulta: enero de 2010.

Nunes, A., de Oliveira, A., de Oliveira, M., Kitajima, E., Hilf, M., Gottwald, T., and Freitas-A., J. 2012. Transmission of Citrus leprosis virus C by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to alternative host plants found in citrus orchards. Plant Dis. 96: 968-972.

Pascon, R.; Kitajima, J.; Breton, M.; Assumpção, L.; Greggio, C.; Zanca, A.; Okura, V.; Alegria, M.; Camargo, M.; Silva, G.; Cardozo, J.; Vallim, M.; Franco, S.; Silva, V.; Giachetto, P.; Silva, J.;Ferro, J.; Reinach, F.;Silva, A. 2006. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus Leprosis associated Virus, Cytoplasmatic type (CiLVC). Virus Gene 32: 289 - 298.

Posada, L. 1989. Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Boletín técnico No. 43. Cuarta edición 622 p.

Rodrigues, J. C. V., Targon, M. L. N., and Machado, M. A. 2000. dsRNA associado a lesões de leprose dos citros. Fitopatol. Bras.25: 447-448.

Rodrigues, C., K. Derrick, D. Achor, J. French, W. Welbourn, R. Ochoa y E. Kitajima. 2003. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. Exp. Appl. Acarol. 30 (1-3) 181-202.

Rodrigues, J.C.; Kitajima, E. 2005. Levantamento de vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) na região de Manaus e Urucu, AM. Summa Phytopathologica, Botucatu. 31: 26.

Rodrigues, J.C.; Childers, C. 2013. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. Experimental and Applied Acarology. 59: 165–175

Roy, A., Choudhary, N., Leon, G., Shao, J., Govindarajulu, A., Achor, D., Wei, G., Picton, D., Levy, L., Nakhla, M., Hartung, J. and Brlansky, R. 2013. A Novel Virus of the Genus Cilevirus Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis. Phytophatology. 103 (5) 488 - 500

USDA. 2004. Targeting a threat to U.S. Citrus Mite-Borne disease already has foothold in South America.

http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/mar04/citrus0304.htm; consulta: febrero de 2010.

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

Con respecto a las interacciones virus - vector - planta, se puede concluir que el ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae), reconocido como el principal vector del virus de la leprosis de los cítricos en Colombia, es capaz de adquirir efectivamente el virus, después de 30 minutos de alimentación sobre hojas de cítricos (*Citrus sinensis* L.), que presenten lesiones de la leprosis.

Al efectuar el diagnóstico molecular sobre poblaciones del ácaro *B. phoenicis*, que pasaron por un período de cinco días de adquisición del virus sobre hojas de *C. sinensis* con síntomas de la enfermedad, se detectó únicamente el 40% de población infectada con el virus (CiLV-C).

En cuanto a los períodos de transmisión, se concluye que el tiempo requerido por el ácaro *B. phoenicis* para transmitir efectivamente el virus de la leprosis de los cítricos, fue de 10 minutos.

Los resultados obtenidos del estudio de la interacción citrus - no citrus – citrus, permiten concluir que cuando el ácaro *B. phoenicis* adquiere el virus CiLV en una planta cítrica (*C. sinensis*), luego se hospeda en plantas no cítricas y se traslada nuevamente una planta cítrica sana, logra transmitir el virus efectivamente. En el 80% de hojas cítricas tratadas, se observó la expresión de los síntomas de la enfermedad. Cuando el ácaro *B. phoenicis* se hospedó temporalmente en plantas de *Swinglea glutinosa* y *Sida acuta*, las lesiones de leprosis en *C. sinensis* se expresaron en el 100% de las hojas evaluadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio mediante la técnica RT-PCR, se confirma la presencia del virus citoplasmático de la leprosis de los cítricos tipo 2 (CiLV-C2) en Colombia. Este nuevo tipo de virus se detectó positivamente en muestras

de tejido vegetal de naranjo (*C. sinensis*) y *S. glutinosa*, colectadas en los departamentos del Meta y Casanare. La detección positiva en *S. glutinosa*, se constituye en el primer reporte de este tipo de virus en una planta no cítrica. El diagnóstico de CiLV-C2 para ácaros vectores *B. phoenicis* también fue positivo.

4.2 Recomendaciones

El presente estudio, proporciona bases técnico científicas que amplian el conocimiento de las complejas interacciones planta - virus - vector referentes al CiLV-C. Por tanto, deben ser difundidas y tenidas en cuenta como apoyo en la formulación y ejecución de programas de prevención y manejo de la enfermedad en el país.

El diagnóstico positivo del virus de la leprosis tipo 2 (CiLV-C2), permite pensar que los cítricos de nuestro país pueden estar afectados por más de un tipo de virus CiLV-C. Por tanto, se requiere de un programa de detección del virus de la leprosis de los cítricos en Colombia, basado las técnicas moleculares, que permita conocer la situación actual de la enfermedad en el país.

La detección del virus CiLV-C2, en ácaros vectores *B. phoenicis* por medio de técnicas RT-PCR utilizadas en el presente estudio, se constituye en un instrumento importante que puede ser utilizado para el diagnóstico del virus y la prevención de la diseminación de la enfermedad en Colombia.

El diagnóstico positivo del virus de la leprosis tipo 2 (CiLV-C2) en *S. glutinosa*, demuestra que esta planta hospedera alterna del virus, puede contribuir a la diseminación de la enfermedad en Colombia, por lo cual los programas de manejo del virus y el vector, deberán incluir esta planta.

Efectuar estudios sobre tipificación de ácaros *B. phoenicis* en Colombia y su posible relación con diferentes tipos de CiLV.

Implementar la técnica RT-PCR para la detección del CiLV-C y CiLV-C2, en los programas de diagnóstico, prevención y erradicación la leprosis de los cítricos en Colombia.

A. Anexo Artículo publicado Revista Phytopathology.

"A Novel Virus of the Genus *Cilevirus* Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis"

Phytopathology Journal. May 2013. Vol 103, N 5 (488 – 500)

Autores:

Avijit Roy, Nandlal Choudhary, Leon M. Guillermo, Jonathan Shao, Ananthakrishnan Govindarajulu, Diann Achor, G. Wei, D. D. Picton, L. Levy, M. K. Nakhla, John S. Hartung, and R. H. Brlansky

Accepted for publication 14 November 2012.

http://dx.doi.org/10.1094 / PHYTO-07-12-0177-R
© 2013 The American Phytopathological Society

Virology

- *

e **X**tra

A Novel Virus of the Genus *Cilevirus* Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis

Avijit Roy, Nandlal Choudhary, León M. Guillermo, Jonathan Shao, Ananthakrishnan Govindarajulu, Diann Achor, G. Wei, D. D. Picton, L. Levy, M. K. Nakhla, John S. Hartung, and R. H. Brlansky

First, second, fifth, sixth, and twelfth authors: University of Florida, IFAS, Plant Pathology Department, Citrus Research and Education Center, 700 Experiment Station Road, Lake Alfred; third author: Centro de Investigación La Libertad, CORPOICA, Villavicencio, Colombia; fourth and eleventh authors: United States Department of Agriculture (USDA)–Agricultural Research Service, MPPL, Beltsville, MD; seventh, eighth, and tenth authors: USDA Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) PPQ-CPHST, Beltsville, MD; and ninth author, USDA-APHIS-PPQ-CPHST, Riverdale, MD.

Accepted for publication 14 November 2012.

ABSTRACT

Roy, A., Choudhary, N., Guillermo, L. M., Shao, J., Govindarajulu, A., Achor, D., Wei, G., Picton, D. D., Levy, L., Nakhla, M. K., Hartung, J. S., and Brlansky, R. H. 2013. A novel virus of the genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus leprosis. Phytopathology 103:488-500.

Citrus leprosis in Colombia was previously shown to be caused by cytoplasmic *Citrus leprosis virus* (CiLV-C). In 2011, enzyme-linked immunosorbent assay and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)-based diagnostic methods failed to identify CiLV-C from citrus samples with symptoms similar to citrus leprosis; however, virions similar to CiLV-C were observed in the cytoplasm of the symptomatic leaves by transmission electron microscopy. Furthermore, the causal organism was transmitted by the false spider mite, *Brevipalpus phoenicis*, to healthy citrus seedlings. A library of small RNAs was constructed from symptomatic leaves and used as the template for Illumina high-through-put parallel sequencing. The complete genome sequence and structure of a new bipartite RNA virus was determined. RNA1 (8,717 nucleotides [nt]) contained two open reading frames (ORFs). ORF1 encoded the replication module, consisting of five domains: namely, methyltransferase (MTR), cysteine protease-like, FtsJ-MTR, helicase (Hel), and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp); whereas ORF2 encoded the putative coat protein. RNA2 (4,989 nt) contained five ORFs that encode the movement protein (MP) and four hypothetical proteins (p7, p15, p24, and p61). The structure of this virus genome resembled that of CiLV-C except that it contained a long 3′ untranslated terminal region and an extra ORF (p7) in RNA2. Both the RNA1 and RNA2 of the new virus had only 58 and 50% nucleotide identities, respectively, with known CiLV-C sequences and, thus, it appears to be a novel virus infecting citrus. Phylogenetic analyses of the MTR, Hel, RdRp, and MP domains also indicated that the new virus was closely related to CiLV-C. We suggest that the virus be called *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) and it should be unambiguously classified as a definitive member of the genus *Cilevirus*. A pair of CiLV-C2 genome-specific RT-PCR primers was des-igned and validated to detect its presence in citrus leprosis samples collected from the Casanare and Meta states in Colombia.

Additional keywords: citrus virus, deep sequencing, detection, Illumina, mite transmission.

Citrus leprosis is one of the most economically important viral diseases of *Citrus* spp. in South and Central America (5). Two types of virions, one in the cytoplasm (*Citrus leprosis virus* cytoplasmic type [CiLV-C]) and the other in the nucleus (CiLV nuclear type [CiLV-N]) have been reported from citrus leprosis-symptomatic tissues. CiLV-N has been restricted to states of Sao Paulo, Rio Grande do Sul, and Minas Gerais in Brazil and Boquete in Panama (5), whereas CiLV-C has been spread-ing rapidly in South and Central America. Citrus leprosis was formerly a major problem in Florida but has not been found there since the 1960s (9). Both causal viruses are transmitted by the tenuipalpid false spider mite, *Brevipalpus* spp. (40,41). Bra-zilian citrus growers control citrus leprosis by applying acaricides (two to four sprays/season) costing ≈$80 million US every year (5,40).

Corresponding author: R. H. Brlansky; E-mail address: rhby@ufl.edu GenBank accession numbers for the sequences reported in this article are JX000024 (RNA1) and JX000025 (RNA2).

* The ***e*-Xtra** logo stands for "electronic extra" and indicates that Figures 3 and 4 appear in color online.

http://dx.doi.org/10.1094 / PHYTO-07-12-0177-R
© 2013 The American Phytopathological Society

Citrus leprosis affects various *Citrus* spp. but the degree of symptom severity depends on the citrus variety, with sweet orange (*Citrus sinensis* L.) being the most susceptible host (4,5). CiLV-C infection causes localized chlorotic lesions, often with necrotic centers. Severe infection in sweet orange can lead to defoliation, fruit drop, reduction of quality and yield, dieback, and, ultimately, tree death within a few years (6). Recently, *Hibiscus green spot virus* (HGSV) was reported from Hawaii displaying citrus-leprosis-like symptoms on *C. volkameriana* (31).

CiLV-C is the type member of the new genus *Celivirus* but further taxonomic classifications are undetermined. The short membrane-bound bacilliform virions (50 to 60 by 110 to 120 nm) are found in the cytoplasm of the infected cells using transmission electron microscopy (TEM) (13). The ≈14-kb bipartite, single-stranded (ss), positive-sense genomic RNA (gRNA) of CiLV-C is composed of RNA1 (8,729 to 8,730 nucleotides [nt]) and RNA2 (4,969 to 4,975 nt) (28,37).

In 2006, CiLV-C was first reported in Colombia from the piedmont area of the eastern plains of Casanare and Meta states, although citrus leprosis symptoms on leaves and fruit of Valencia sweet orange were first observed in Casanare in 2003 and, later, in Meta in 2004 (25). TEM and (RT-PCR) successfully identified CiLV-C from citrus leprosis samples from Yopal and Aguazul in Casanare state and from Cumaral, Guamal, and Villavicencio in Meta state (25).

the non-citrus rutaceous plant *Swinglea glutinosa* Merr. ('Blanco'), which is often grown as hedgerows in Colombia, was found naturally infected with CiLV-C (23). Confirmation of a symptom-based diagnosis of CiLV-C depends on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (10) or RT-PCR (27). In 2011, these tests were applied to confirm CiLV-C associated with citrus-leprosis-like symptoms but failed to identify CiLV-C from affected samples even though virions similar to CiLV-C were observed in cytoplasm. Therefore, the pathogen causing citrus-leprosis-like symptoms in these samples from Colombia was unknown.

The advent of high-throughput sequencing (HTS) technology and its application allows not only the identification of known pathogens but also the assembly of genome sequences of un-known pathogens associated with diseases (1,2,21,52). Small RNAs (sRNAs) derived from viral genomes accumulate in the virus-infected tissues due to antiviral defense. Assembly of overlapping sRNA sequences was considered for virus identifi-cation utilizing HTS (26,38). Both RNA and DNA viruses activate RNA silencing, which is initiated when viral double-stranded (ds)RNA is recognized by Dicer-like (DCL) endoribo-nucleases (26). Thus, the sRNA deep sequencing (sRDS) is a novel approach that can identify both RNA and DNA viruses (21,54). The sRDS approach was utilized first in plant virology to identify five sweet potato viruses in a single plant (21). A similar approach was applied to identify virus sequences from fruit fly, mosquito, and nematode cells (52). The method has since been used for the discovery of plant viral pathogens associated with diseases in citrus (29,30), vineyards (12,36,54), *Dactylis glomerata*, the wild cocksfoot grass (35), and sweet potato (18).

The objective of this study was to identify the cause of citrus-leprosis-like symptoms found in multiple locations in Colombia where diagnostics for CiLV-C based on results of ELISA and RT-PCR assays were negative. We utilized HTS of sRNA to identify and further characterize the unknown virus associated with citrus leprosis-symptomatic plants in Colombia.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and virus sources. Thirty-two sweet orange samples with severe symptoms of citrus leprosis were collected from locations in Casanare and Meta states, Colombia. Symp-tomatic and healthy leaf, fruit, and twig samples were shipped to the United States Department of Agriculture–Animal and Plant Health Inspection Service (USDA-APHIS)-PPQ-CPHST, Belts-ville, MD for testing under APHIS permits P526P-09-02704 and P526P-11-04003, and further processed in the Bio-containment Level 3 Agriculture (BCL3-Ag) facility. Symptomatic leaf samples were washed with water, and air dried; then, the chlorotic and yellow halo leaf spots (5 to 7 mm in diameter) were excised using stainless steel razor blades. In all, 8 to 10 lesions (equiva-lent to 100 mg of tissue) were pooled and stored at –20°C before isolation of total nucleic acids. CiLV-C-infected leaf tissues from Panama (received under permit P526P-11-04003) and healthy sweet orange leaf samples from the greenhouse of Citrus Re-search and Education Center, Lake Alfred, FL were used through-out the study as positive and negative controls, respectively.

ELISA and RT-PCR. Citrus-leprosis-like symptomatic tissues were excised using stainless steel razor blades and homogenized in extraction buffer at a 1:20 ratio (wt/vol); 1× phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. Crude extracts of citrus-leprosis-affected plants were tested with CiLV-C-specific polyclonal antibody (PAb) CREC-13 using double-antibody sandwich (DAS)-ELISA following the protocol developed by Choudhary et al. (10), with modification (11,15). A 1:1,000 dilution of the primary antibody CREC-13 was used in ELISA to test CiLV-C isolates (antigen dilution 1:20) from Panama (10). Healthy sweet orange leaf tis-sues and sample extraction buffer (PBS-Tween with 0.2% poly-vinylpyrrolidone) were used as negative controls. The optical density at 405 nm (OD_{405}) values were recorded after subtracting the average OD_{405} values of healthy sweet orange leaf tissue and extraction buffer. Citrus-leprosis-affected plants were considered positive if the recorded OD_{405} values were at least three times greater than the negative control.

Total RNA from healthy citrus leaf tissues as well as from the plant affected with citrus-leprosis-like symptoms in Colombia was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's protocol. Primer pairs specific to the CiLV-C replicase (RNA1, p285) and movement protein (MP) genes (RNA2, p32) were used to amplify targets from CiL-V-C-type isolates following the published RT-PCR protocol (27). In addition, the HGSV RNA1-specific primer pairs (from open reading frame [ORF]1) also were used to detect the presence of HGSV from citrus-leprosis-affected samples following the RT-PCR protocol described by Melzer et al. (31).

TEM. Symptomatic chlorotic leaf spots from citrus leprosis and samples of asymptomatic leaf tissues were fixed following the protocol described by Hartung et al. (16). Tissue was fixed for 24 h at 4°C in 3% glutaraldehyde in 0.066 M phosphate buffer, pH 6.8. The glutaraldehyde was removed by three washes with phosphate buffer and the samples were then post-fixed in 2% osmium tetroxide for 4 h. The samples were dehydrated in a graded acetone series and then infiltrated and embedded in Spurr's resin (48). Ultrathin sections were prepared with an LKB-Huxley ultramicrotome (LKB Instruments, Ltd., Rockville, MD) and placed on 200-mesh Formvar-coated copper grids. The grids were stained with 2% aqueous uranyl acetate followed by Reynolds lead citrate (39) and then examined with a Morgagni 268 transmission electron microscope (FEI, The Netherlands).

Mite transmission. The tenuipalpid false spider mite, *Brevi-palpus phoenicis* (Geijskes), is an insect vector of CiLV-C in Colombia and was used for transmission studies (24). *B. phoeni-cis* mites were collected from a leprosis-symptom-free citrus grove and nonviruliferous laboratory mite colonies were estab-lished from their eggs and maintained on virus-free sweet orange fruit with scab lesions following previously described protocols (34,41). For transmission studies, 80 to 100 nonviruliferous mites were fed on 6 to 8 sweet orange seedlings with leprosis-like symptoms. An acquisition access period (AAP) of 72 h at 27 □ 1°C was used for virus acquisition. After the AAP, 8 to 10 mites per leaf were then placed on each of the 10 virus-free sweet orange seedlings. Transfers were done using a number 01 Sable brush and a stereoscopic microscope. To keep the mites confined, petroleum jelly was applied to the petiole of the inoculated leaves. An inoculation access period (IAP) of 72 h at 27 □ 1°C with 75 □ 5% relative humidity was used. After the IAP, all the mites were removed and stored in 70% ethanol for further analysis.

Construction of sRNA libraries for deep sequencing. Plants with symptoms similar to citrus leprosis but which were negative for CiLV-C by RT-PCR were selected. Total RNA from two composite samples, L147V1 and GD1234, was isolated using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). From each pooled RNA sample, 50 µl was sent for HTS service on the Illumina GA IIX platform (Fasteris SA, Switzerland).

Discovery of a new virus tentatively named CiLV cyto-plasmic type 2 from citrus-leprosis-symptomatic plants. Two libraries of fastq reads of 15 to 35 bases containing a potential virus from sRDS were analyzed with a subtractive approach. The citrus genome, known plant virus, and viroid sequences were identified and removed using bowtie, a short-read alignment tool (22). The remaining reads were assembled using the Velvet/Oases suite using various kmers (47,53). The resulting transcripts and contigs were subjected to a blastx program (3) against a non-redundant protein database from the National Center for Bio-technology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) using the standard parameters. Novel sequences that matched

virus sequences with low *e* values were similar to CiLV-C. The *e* values obtained from blastx search ranged from e-24 to 1.5. Protein domains were determined using the "simple modular architecture research tool" (SMART) (46) and the Conserved Do-main Database (CDD) programs (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml).

Singleton reads of CiLV cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) RNA1 and RNA2 from sRDS data were assembled and several contigs were obtained at different positions of the new virus genome associated with citrus leprosis. Based on a partial CiLV-C2 ge-nome sequence, specific nucleotide regions were selected to de-sign the RT-PCR primers to bridge gaps between contigs for completion and confirmation of the entire genome sequence of CiLV-C2 (RNA1 and RNA2), excluding 5′ and 3′ untranslated regions (UTRs). In all, ≈1.3- to 1.8-kb overlapping RT-PCR amplicons with an overlap of 44 to 620 nt were amplified (Table 1) and cloned following a previously described protocol applied for *Citrus tristeza virus* (CTV) (44). At least three to five clones were bidirectionally sequenced for each overlapping amplicon with an ABI Prism 3100 automatic DNA Sequencer (DNA Se-quencing Core Laboratory, Gainesville, FL). Overlapping se-quences were aligned using BLAST (bl2seq) and assembled using the ClustalX (50) and GeneDoc version 2.6.002 (33) algorithms to complete the nucleotide sequence of the CiLV-C2 associated with citrus-leprosis-like symptoms.

The 5′ and 3′ UTRs from RNA1 and RNA2 were obtained by amplifying the terminal mRNA sequences utilizing RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE) (cata-log number AM1700; Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. The CiLV-C2 5′ and 3′ RACE gene-specific outer and inner reverse primers specific to the RNA1 or RNA2 genomes were designed and utilized (Table 1). Outer and inner 5′ and 3′ RLM-RACE PCR amplicons were cloned and a minimum of five clones for each terminus was sequenced for further analysis.

Preparation of riboprobes and Northern blot hybridization of CiLV-C2 RNAs. Total RNA (≈2.50 µg) from symptomatic citrus leprosis leaves from Colombia, CiLV-C-positive controls from Panama, and healthy sweet orange leaves were separated by electrophoresis in a formaldehyde-containing 1% agarose gel and transferred to a positively charged nylon membrane (catalog number 11209299001; Bio-Rad, Hercules, CA). Northern blot hybridizations were performed using a digoxigenin (DIG) Northern starter kit (catalog number 12039672910; Roche, Indianapolis, IN). DIG-labeled specific RNA probes designated as pCiLV-C2-p29 and pCiLV-C2-p24 complementary to the 3′-terminal region of RNA1 and RNA2, respectively, were generated according to the in vitro transcription labeling technique using the manufacturer's protocol. The positive-sense DIG-labeled RNA probes were used to probe total RNAs extracted from citrus-leprosis-affected tissues and healthy tissue controls for hybri-dization according to standard methods (45). The hybridized probes were detected with anti-DIG-AP-Fab fragments and were visualized with the chemiluminescence substrate CDP-Star and X-ray film. The 0.5- to 10-kb RNA ladder (5 µl) (catalog number 15623-200; Life Technology) was used as a molecular mass reference.

Phylogenetic analyses. Amino acid sequences of three con-served protein domains (methyltransferase [MTR], helicase [Hel], and RNA-dependent RNA polymerase [RdRp]) encoded on RNA1 and the MP domain of RNA2 were used to compare phylogenetic relationships of the newly discovered virus (CiLV-C2) with other selected plant viruses. Phylogenetic analysis was completed using the MEGA5 (49) program, with neighbor-joining and bootstrap analysis supported by 1,000 replicates with default parameters. All alignments were performed using the ClustalX algorithm (50). Phylogenetic trees based on MTR, Hel, RdRp, and MP domains from selected viruses were constructed.

Specific detection of the new cytoplasmic virus, CiLV-C2, from citrus-leprosis-affected samples in Colombia. Total RNA

TABLE 1. Oligonucleotide primers used for amplification of the complete RNA1 and RNA2 genomes of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 from Colombia

Number	Name[a]	Primer sequence (5′–3′)	Strand	Positions[b]	Amplicon size (nt)	Overlapping nucleotides
RNA1						
1	CiLV-C2-5′ RACE-gs-OP-R	ACG CAT GTA ATG ACG CAA AAC CCT A	Negative	619-643	…	…
2	CiLV-C2-5′ RACE-gs-IP-R	CAT CTG GCT GCT TCC TCA ACA TCT	Negative	418-441	…	112
3	CiLV-C2-F1	CAG CAC TAT TAG CTG TCA TGG GAT CA	Positive	330-355	1,269	…
4	CiLV-C2-R1	TCA CAA TTG TGG TAC CGC CTA AGT TC	Negative	1,573-1,598	…	327
5	CiLV-C2-F2	TTG CCA TTA TTG AAG TGT TTC GTC GTG	Positive	1,272-1,298	1,580	…
6	CiLV-C2-R2	GGT ACA TCT CAT CGC AAC AAC TAT GGA A	Negative	2,824-2,851	…	364
7	CiLV-C2-F3	TGA CCA ACA TTA TGA TTT GTT GAT CCC TC	Positive	2,488-2,516	1,499	…
8	CiLV-C2-R3	TAC AAA ACT CAC GAC GGT TGC AAG A	Negative	3,962-3,986	…	620
9	CiLV-C2-F4	ATT CGC AAA GGA TCT CTG TGG GTT T	Positive	3,367-3,391	1,588	…
10	CiLV-C2-R4	ATT ATG ATC AAC CAG AAA GCC GTT AAG C	Negative	4,927-4,954	…	72
11	CiLV-C2-F5	TAC TCT GAC TTG AAG GGT GAT GAG ATC A	Positive	4,883-4,910	1,813	…
12	CiLV-C2-R5	CAA ACT CCA TGT AGG CCT CAT CAG T	Negative	6,671-6,695	…	44
13	CiLV-C2-F6	TAA CCC AAA GCC TAC GTT GAC TGA TG	Positive	6,652-6,677	1,671	…
14	CiLV-C2-R6	ATC TTC AGG TGA AGC AAC CTT ATC CTT	Negative	8,296-8,322	…	314
15	CiLV-C2-3′ RACE-gs-OP-F	ACC AGG AGT ATT ACC GTT CCT TAC CAG	Positive	8,009-8,035	…	…
16	CiLV-C2-3′ RACE-gs-IP-F	AAG GAT AAG GTT GCT TCA CCT GAA GAT	Positive	8,296-8,322	…	…
RNA2						
1	2CiLV-C2-5′ RACE-gs-OP-R	AAG AAC AGC GCT TAG ATG TAC ATC TCG	Negative	1,584-1,610	…	…
2	2CiLV-C2-5′ RACE-gs-IP-R	ATC CAT TGT GTG AAC TCA TAC CTT GAT	Negative	1,472-1,498	…	87
3	2CiLV-C2-F1	CGA GAT GTA CAT CTA AGC GCT GTT CTT	Positive	1,584-1,610	1,617	…
4	2CiLV-C2-R1	GAT TCT AAT TCA GCA AAG TCG TCA GCA	Negative	3,174-3,200	…	944
5	2CiLV-C2-F2	TTT GAC TTT CCC AGC CTG GTT TAG A	Positive	2,257-2,281	1,656	…
6	2CiLV-C2-R2	GTG AAA TGG ATC TCT TAA GGT CAG CGT	Negative	3,782-3,808	…	381
7	2CiLV-C2-F3	CAG CCA CAC TTA CAT TAA AGT TGG TTG A	Positive	3,428-3,455	969	…
8	2CiLV-C2-R3	TTG CGG AAA CCC TAG CAA GAA GAG	Negative	4,373-4,396	…	919
9	2CiLV-C2-F3	CAG CCA CAC TTA CAT TAA AGT TGG TTG A	Positive	3,428-3,455	1,212	…
10	2CiLV-C2-R4	TCA ACC CGA AAA GGA TTG TTG ACC A	Negative	4,615-4,639	…	267
11	2CiLV-C2-3′ RACE-gs-OP-F	CTC TTC TTG CTA GGG TTT CCG CAA	Positive	4,373-4,396	…	…
12	2CiLV-C2-3′ RACE-gs-IP-F	TGG TCA ACA ATC CTT TTC GGG TTG A	Positive	4,615-4,639	…	…

[a] RACE = rapid amplification of cDNA ends.
[b] Nucleotide (nt) positions

was extracted from healthy Valencia sweet orange leaves and from leaves with leprosis-like symptoms. In total, 32 leprosis-like samples from four sweet orange cultivars ('Valencia', 'Delta Valencia', 'Rhode Red Valencia', and 'Cara Cara Navel') were extracted. All extractions were completed using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) and were analyzed for the presence of CiLV-C by RT-PCR (27). CiLV-C2 putative coat protein gene (CPG) (RNA1-ORF2)-specific positive-sense (CiLV-C2-CPG-F: ^{7699}ATG AGT AAC ATT GTG TCG TTT TCG TTG T^{7726}) and negative-sense primers (CiLV-C2-CPG-R: ^{8493}TCA CTC TTC CTG TTC ATC AAC CTG TT^{8468}) were designed, optimized, and applied for detection of the CiLV-C2 found in Colombia following the RT-PCR protocol described earlier (44). The nucleotide positions are based on the RNA1 genome sequences of the isolate L147V1 (accession number JX000024). PCR products were cloned, se-quenced, and compared with existing CiLV-C sequences.

RESULTS

Citrus-leprosis-like symptoms in Colombia. Symptomatic sweet orange materials for this research work were obtained from Colombia and showed severe disease symptoms like those re-ported for citrus leprosis. These samples had symptoms of chlo-rotic leaf spots and yellow halos (Fig. 1A). In advanced stages of infection, the spots coalesced into large areas of chlorosis and the yellow tissue often turned brown (Fig. 1B). Brown ring spots with a central depression were a common symptom on fruit (Fig. 1C). Similar raised brown rings also were observed in twigs or branches (Fig. 1D). The symptoms were similar, if not identical, to those previously reported for CiLV-C in Colombia (25). Severe infections in sweet orange often lead to defoliation and fruit drop, which directly reduce production within a few years.

CiLV-C and HGSV are undetectable in Colombian citrus-leprosis-affected plant tissues. Tissues from different sweet orange trees that displayed citrus-leprosis-like symptoms were tested utilizing ELISA (10) and RT-PCR (27) developed for CiLV-C detection. In DAS-ELISA tests, the average calculated ab-sorbance (OD_{405}) value of samples with citrus-leprosis-like symp-toms was 0.090 ± 0.002, compared with the healthy sample average value of 0.109 ± 0.001. Known isolates of CiLV-C from Panama had OD_{405} values measured between 0.439 ± 0.008 and 0.684 ± 0.010.

In addition, a previously developed RT-PCR assay was utilized (27). No amplicons typical of CiLV-C were produced. The RT-PCR assay successfully detected the known CiLV-C isolate from Panama and did not produce any amplicons from healthy sweet orange. We concluded that the Colombian citrus leprosis samples did not contain CiLV-C. Furthermore, HGSV-specific primers (31) were utilized to determine whether citrus-leprosis-like symp-

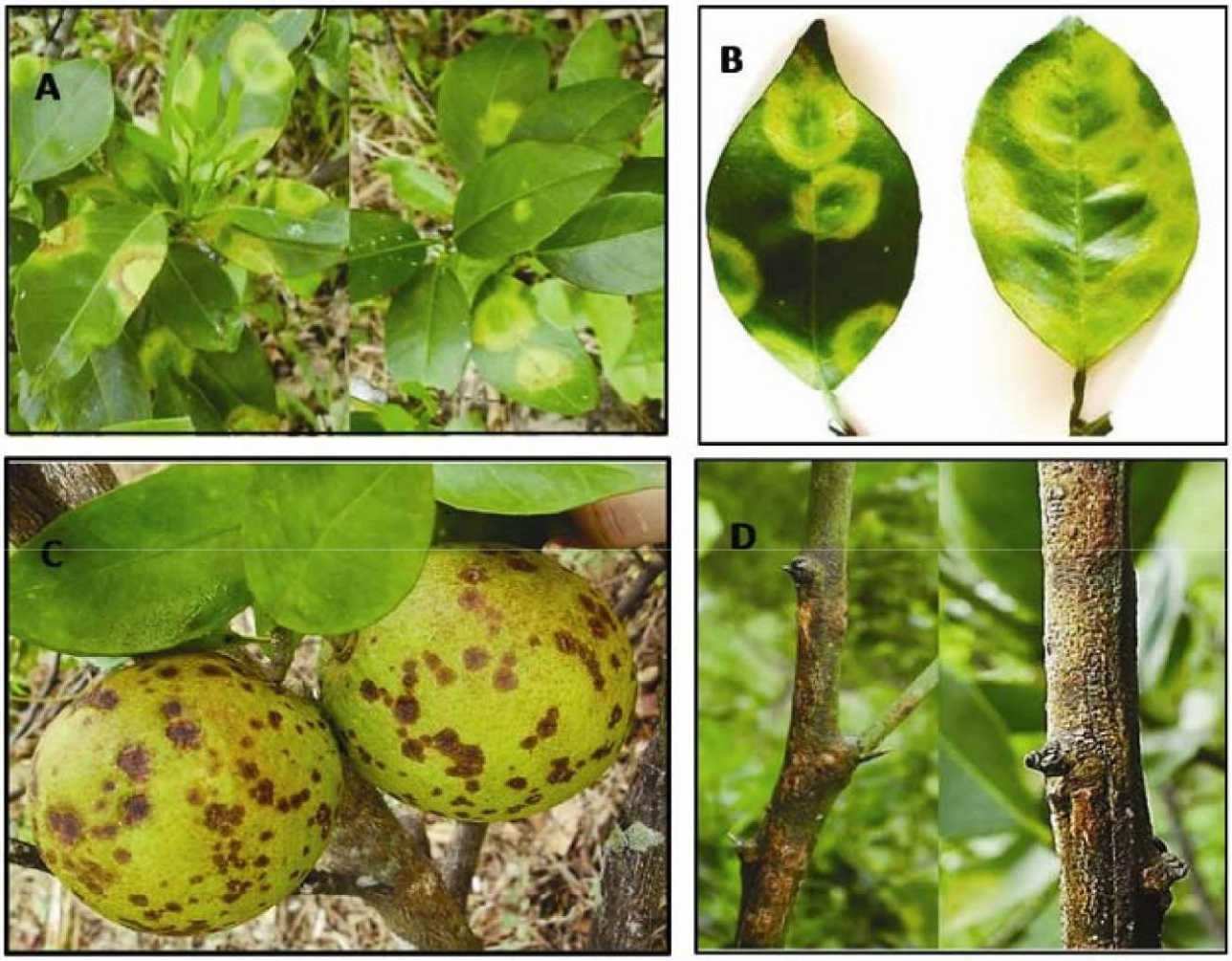


Fig. 1. Citrus-leprosis-affected Valencia sweet orange plant showing typical leprosis symptoms in citrus **A and B,** leaves; **C,** fruit; and **D,** twigs infected with *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 (CiLV-C2).

toms were caused by HGSV but no HGSV-specific amplicon was produced.

TEM. TEM was carried out to search for virions in the citrus-leprosis-like symptomatic leaf samples. Asymptomatic leaf sections of Valencia sweet orange were also examined for comparisons. Short bacilliform virions (40 to 50 by 100 to 110 nm) characteristic of CiLV-C infections were observed within the endoplasmic reticulum in the cytoplasm of the symptomatic leaf samples and compared with CiLV-C from Brazil and Colombia (Fig. 2A to C). No particles were observed in the nuclei of the affected samples or in healthy plants (data not shown).

Mite transmission. Citrus-leprosis-like symptoms in the greenhouse-grown Valencia sweet orange plants were characterized by the appearance of small, circular chlorotic leaf spots 25 days after viruliferous *B. phoenicis* inoculation (Fig. 3A). The chlorotic spots increased in size over time and, after 120 days, the spots began to coalesce into larger chlorotic areas (Fig. 3B). Ten plants inoculated with *B. phoenicis* produced citrus-leprosis-like symptoms. In ELISA tests with CiLV-C-specific CREC-13 PAb, the average calculated absorbance (OD_{405}) values of *B. phoenicis*-inoculated symptomatic samples were 0.090 ± 0.002 and were similar to values obtained for healthy samples (0.109 ± 0.001). Therefore, the mite transmission samples were considered as negative for CiLV-C infection. The CiLV-C RT-PCR assay also did not produce any amplicon from the *B. phoenicis*-inoculated sweet orange leaves.

Identification of a new virus in the Colombian citrus leprosis samples using deep sequencing. The genome of a new citrus virus (referred to as CiLV-C2) was identified by HTS of sRNAs from the sweet orange plants showing similar symptoms of citrus leprosis tested negative for CiLV-C infection. Two enriched sRNA libraries, GUB1 from sample L147V1 and GUB2 from sample GD1234, were generated from the total RNA of citrus-leprosis-like symptomatic leaves. The GUB1 and GUB2

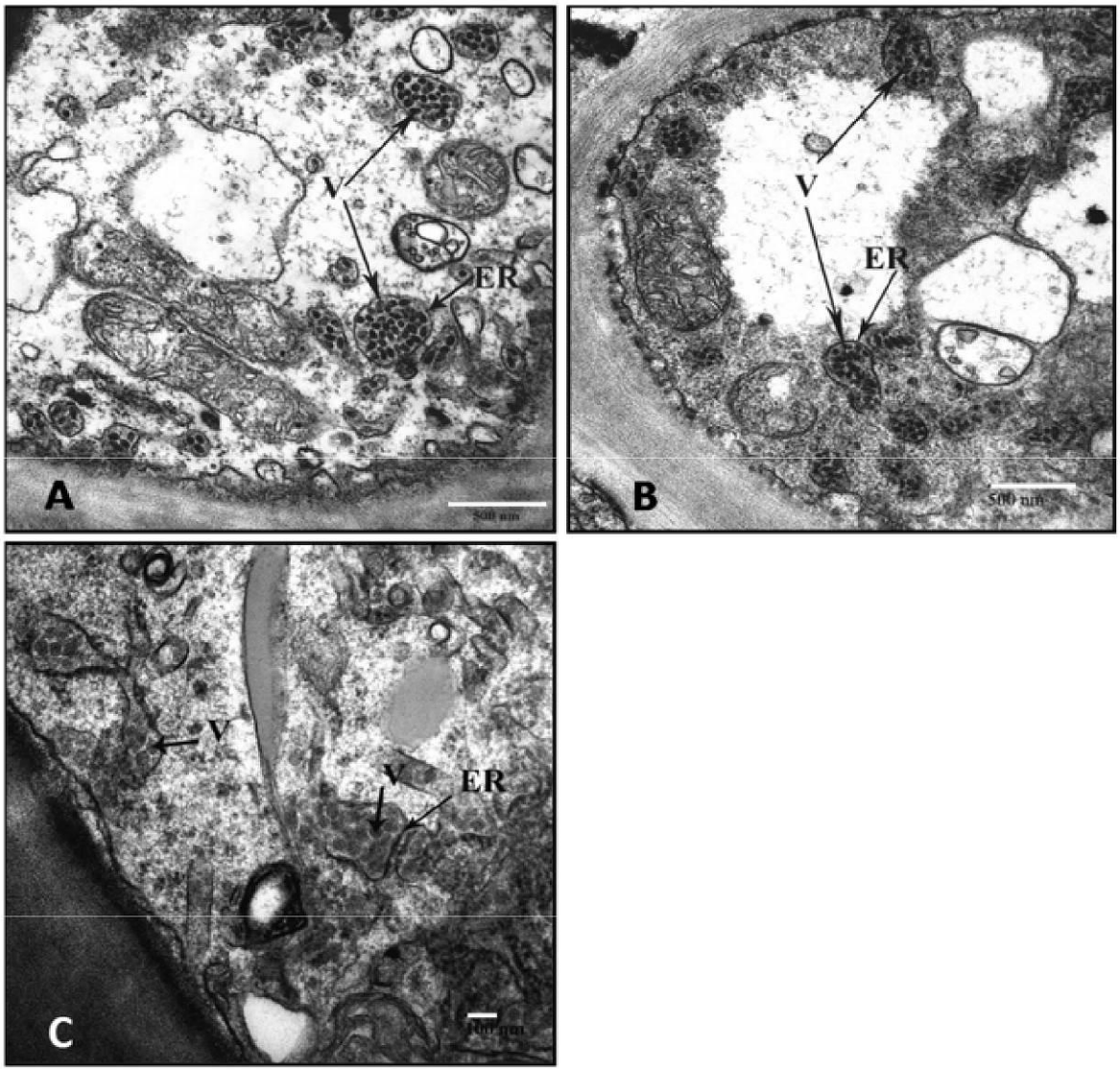


Fig. 2. Transmission electron micrographs of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type (CiLV-C) from **A,** Brazil and **B,** Colombia and compared with **C,** type 2 (CiLV-C2) from Colombia. Sections were prepared from typical lesions of citrus-leprosis-affected Valencia sweet orange leaves tissues. All virions (V) in the endoplasmic reticulam (ER) of the cytoplasm were of similar size and shape.

sRNA deep-sequence libraries had 20,935,577 and 16,122,595 single-end raw reads, respectively. Reads were 15 to 35 nt in length. In the GUB1 and GUB2 libraries, reads were mapped to genome sequences of citrus, various genotypes of CTV, and small sequence fragments of other plant viruses. Some reads obtained in the GUB2 library were also mapped to the *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and *Citrus dwarfing viroid* (CDVd). After subtracting the sequences of the citrus genome, CTV, and citrus viroids, the remaining sequence pools were used to assemble contigs by tiling using two small sequence assembly software programs. The total number of virus contigs was reduced from 231 to 46 for GUB-1 and from 185 to 27 for GUB-2 after subtracting the contigs of CTV and citrus viroids (Table 2). These contigs partially matched the CiLV-C genome in the NCBI nonredundant protein database. From the 46 and 27 contigs assembled from the GUB-1 and GUB-2 libraries, 24 and 9 contigs of 101 to 807 and 102 to 637 nt, respectively, were retained for further analysis because they had the most significant expect (*e)* values. Overall, 304,846 and 153,295 reads to RNA1 and 328,168 and 240,233 reads to RNA2 were assembled that mapped to the CiLV-C2 genomes from the GUB-1 and GUB-2 libraries, respectively. The majority of reads that mapped to the new leprosis virus had a read length of 21 to 22 bases. Thus, only 2.44 to 3.02% of the total reads were mapped to the CiLV-C2 sequences. Of the 73 contigs assembled from the GUB-1 and GUB-2 libraries, 23 RNA1contigs (17 encoding p285 and 6 encoding p29) and 10 RNA2 contigs (4 encoding p61, 5 encoding p32 and 1 encoding p24) had 38 to 91 and 32 to 74% nucleotide-translated protein sequence identity with CiLV-CRNA1 and -RNA2, respectively.

After eliminating the overlapping sequences, the sequences provided coverage of ≈33% (RNA1) and ≈55% (RNA2) of the probable length of the CiLV-C2. These numbers were generated after the complete sequencing of the CiLV-C2 genome. Contigs were aligned with most of the ORFs from the published CiLV-C genome but no contig or singleton reads matched the CiLV-C RNA2-ORF1 sequence that encodes the putative protein p15. Primers were designed to anneal and bridge the gaps in the sequence, and the expected amplicons were obtained using RT-PCR (Table 1). Clones corresponding to the overlapping region were sequenced and aligned to get the complete nucleotide sequences, excluding UTRs. Sanger and deep-sequence data of the CiLV-C2 shared 99% sequence identity. Neither 5′ nor 3′ UTR sequences were found by deep sequencing. In total, 316 and 1,350 nt were obtained using 5′ UTR RACE whereas 216 and 288 nt were obtained by 3′ UTR RACE for RNA1 and RNA2, respectively, to complete the viral genome.

Complete genome analysis of the CiLV-C2 and comparisons with CiLV-C. The complete genome of CiLV-C2 was 13,706 nt in length. The genome was composed of RNA1 and RNA2 of 8,717 and 4,989 nt, respectively. Both RNAs also had 3′-terminal poly(A) tails. The structure of the CiLV-C2 genome closely resembles the genome organization of CiLV-C. RNA1 of CiLV-C2 is organized into two ORFs, one of them in frame +1 and the other in frame +2, whereas RNA2 contained five ORFs, one of them in frame +1 and two each in frame +2 and frame +3.

ORF1 of CiLV-C2 RNA1 started at nucleotide position 119 and terminated at nucleotide position 7633. As observed with *Cile-virus* type member CiLV-C, the CiLV-C2 genome also encoded a large polyprotein (p285) with five domains. The first and third domains, namely MTR (nucleotides 503 to 1486, 328 amino acids [aa]) (Pfam accession PF01660) and rRNA FtsJ-MTR (nucleo-tides 2975 to 3256, 94 aa) are involved in mRNA capping in

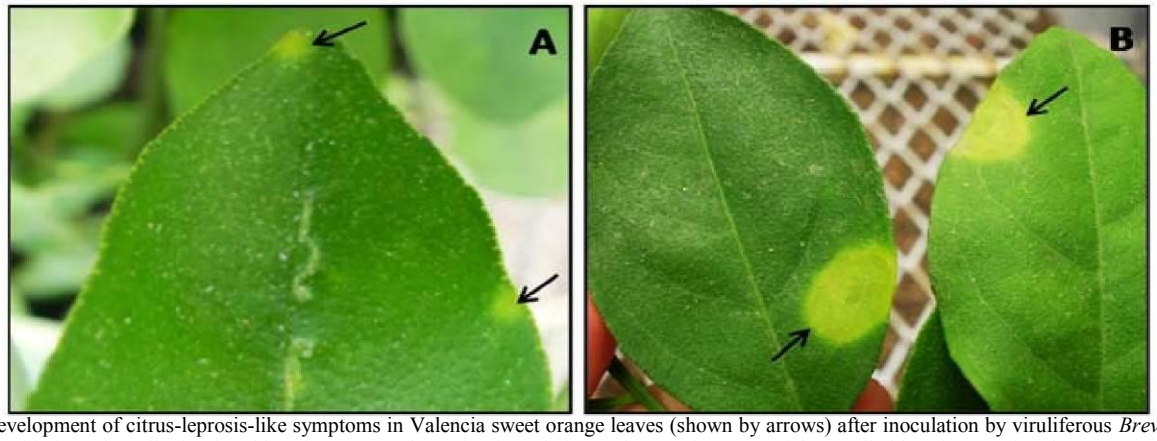


Fig. 3. Development of citrus-leprosis-like symptoms in Valencia sweet orange leaves (shown by arrows) after inoculation by viruliferous *Brevipalpus phoenicis* mites. **A,** Initiation of small, circular chlorotic spots 25 days after inoculation and **B,** coalescence of the small chlorotic spots in advance stages of infection 120 days after inoculation.

TABLE 2. Features of small RNA (sRNA) libraries[a] considered to assemble the genome sequence of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) obtained by sRNA deep sequencing

Features of sRNA libraries	Library GUB1	Library GUB2
Single-end raw reads	20,935,577	16,122,595
Reads that map to the citrus genome	12,512,869	10,170,825
Reads that map to other plant viruses and viroids	4,366,936	2,833,216
Reads that map to *Citrus tristeza virus* and citrus viroids genome sequences	4,055,772	3,118,554
Reads actually aligned with CiLV-C2	633,014	393,528
Contigs for CiLV-C2 and other citrus virus and viroid related contigs	231	185
Contigs- for CiLV-C2 / -with significant expect values	46/24	27/9
Average length of CiLV-C2 contigs (nt)	192	197
Maximum length of CiLV-C2 contig (nt)	807	637

[a] Contigs of CiLV-C2 were selected based on CiLV cytoplasmic (CiLV-C) genome. nt = nucleotides.

CiLV-C and other positive-sense virus genera. The second domain of p285 is similar to cysteine protease (C-Pro) (nucleotides 2174 to 2500, 109 aa), as previously reported for CiLV-C (27). The fourth and fifth domains of ORF1-RNA1 are the viral Hel (nu-cleotides 4757 to 5620, 288 aa) (Pfam accession PF01443) and an RdRp (nucleotides 6257 to 7576, 440 aa) (Pfam accession PF00978), members of the Hel (superfamily 1) and RdRp (super-family RdRp_2), respectively, and play multiple roles at various stages of virus replication (17). ORF1 of CiLV-C2 had maximum nucleotide and amino acid identities with ORF1 of CiLV-C isolates of only ≈60% (Table 3). The conserved domains (MTR, C-Pro, FtsJ-MTR, Hel, and RdRp) had amino acid sequence identities of 73, 68, 55, 61, and 75 to 77%, respectively, with the CiLV-C sequences from Brazil and Panama. ORF2 of RNA1 (+1 frame) encodes a putative CP of 264 aa (p29), 1 aa longer than the corresponding protein from CiLV-C (Fig. 4). The putative CPG of CiLV-C2 had only 47 to 48% nucleotide and 33% amino acid sequence identity with CPGs of CiLV-C isolates.

Excluding the poly(A) tail, RNA2 of CiLV-C2 was 4,989 nt long. Five ORFs were identified that potentially encoded five proteins with molecular masses of 15, 7, 61, 32, and 24 kDa, respectively (Fig. 4; Table 3). The predicted molecular mass of

TABLE 3. Characteristics of the open reading frames (ORFs) and untranslated regions (UTRs) of RNA1 and RNA2 of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) and *Citrus leprosis virus* cytoplasmic (CiLV-C) isolates

	CiLV-C2		CiLV-C[a]		Nucleotide/amino acid sequence identity between CiLV-C2 and CiLV-C isolates (%)[b]		
Genes/UTRs	Position	Size (nt)	Position	Size (nt)	Br-66	Br-95	Pa-13
RNA1							
5′ UTR	1–118	118	1–107	107	60/UD	60/UD	59/UD
ORF1 (p285)	119–7633	7,515	108–7646	7,539	60/58	60/59	60/58
ORF2 (p29)	7699–8493	795	7709–8500	792	47/33	48/33	48/33
3′ UTR	8494–8717	224	8501–8729	229	54/UD	52/UD	54/UD
Full sequence	1–8717	8,717	1–8730	8,730	58/UD	58/UD	58/UD
RNA2							
5′ UTR	1–92	92	1–66	66	36/UD	36/UD	36/UD
ORF1 (p15)	93–485	393	67–459	393	40/14	40/14	40/14
ORF2 (p7)	645–848	204	Absent	UD	Absent	Absent	Absent
ORF3 (p61)	1493–3127	1,635	1590–3203	1,614	48/30	48/30	48/30
ORF4 (p32)	3160–4038	879	3228–4121	894	55/51	55/51	54/49
ORF5 (p24)	4019–4639	621	4093–4737	645	62/60	62/60	62/60
3′ UTR	4640–4989	350	4738–4975	238	41/UD	40/UD	40/UD
Full sequence	1–4989	4,989	1–4975	4,975	50/UD	50/UD	50/UD

[a] Nucleotide positions (Position) are based on GenBank accession numbers DQ157466 for RNA1 and DQ157465 for RNA2. Size: nt = nucleotides.

[b] GenBank accessions are listed after country name: Br-66 = Brazil DQ157465-66, Br-95 = Brazil DQ352194-95, and Pa-13 = Panama DQ388512-13; UD indicates undetermined.

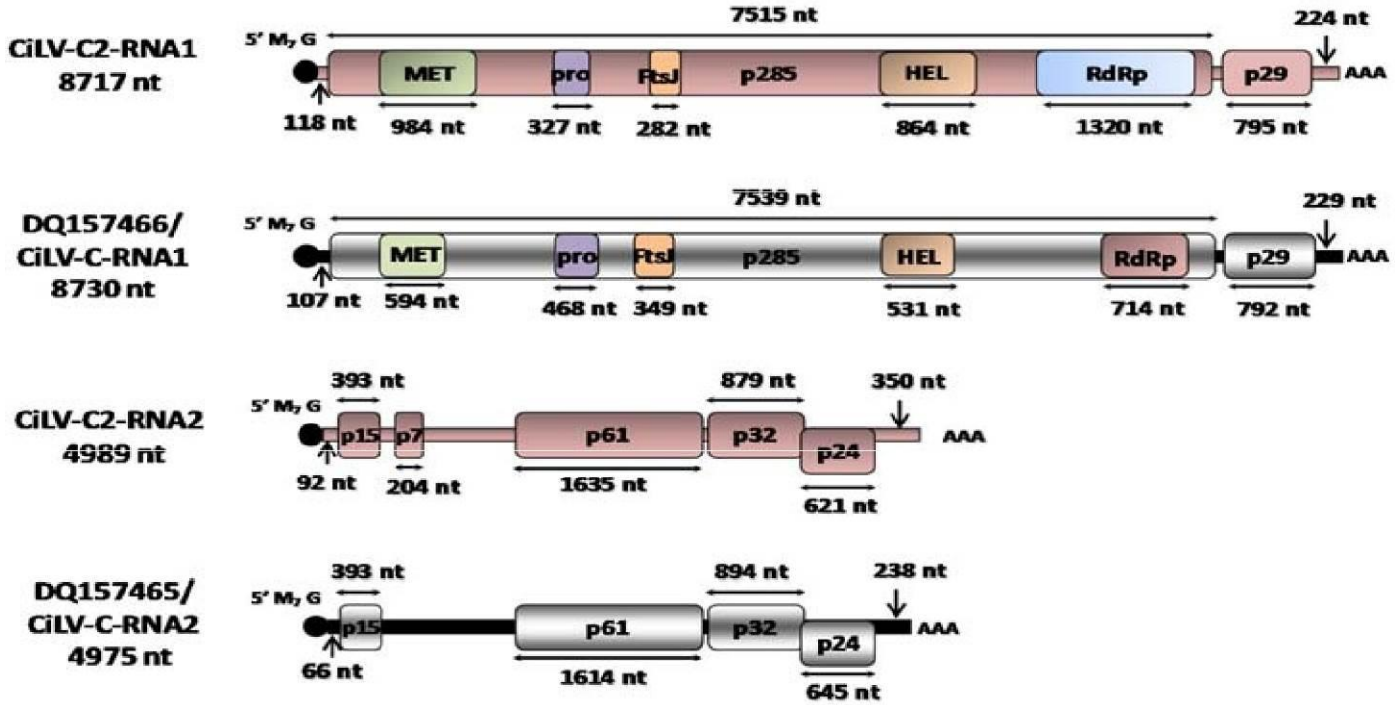


Fig. 4. Schematic comparison of the genome organization of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) with cytoplasmic *Citrus leprosis virus* (CiLV-C), the type member of the genus *Cilevirus*. The representation of the CiLV-C genome is based on GenBank accessions DQ157465–66; nt = nucleotides.

proteins from CiLV-C2 was similar to the predicted protein masses for CiLV-C. RNA2 of CiLV-C2 also contains sequences of a small hypothetical protein (p7) not found in RNA2 of CiLV-C. Translation of p7 (ORF2-RNA2) originated at nucleotide 645 and contained a putative trans-membrane domain at nucleotide positions 762 to 830. The genome of CiLV-C did not contain an ORF corresponding to this protein. Translation of ORF2 of RNA2 of CiLV-C started at nucleotide 1,590 after a long (943 nt) inter-vening UTR. The transcript of 1,614 nt encoded a large hypo-thetical protein (p61) of RNA2. After an intervening UTR of 643 nt, translation of ORF3 of CiLV-C2 originated at nucleotide 1,493 and also encoded a 61-kDa protein (Table 3). A signal peptide cleavage site was found in the ORF3 amino acid sequence at nucleotides 1493 to 1546. In addition, a putative trans-membrane domain also was identified at nucleotides 2903 to 2971. The total length of ORF4 is 879 nt compared with the 840 or 895 nt found in CiLV-C isolates from Panama and Brazil, respectively (Table 3). ORF4 is the only ORF in RNA2 that has a conserved MP domain similar to the 3A/RNA2 superfamily of MPs of various positive-sense ssRNA viruses. ORF5 of RNA2 of CiLV-C2 contained 621 nt and encoded a 24-kDa (p24) protein transcribed in a different frame (+2) than ORF1, -2 (+3), and -4 (+1). ORF5 contained four putative trans-membrane domains at nucleotide positions 4148 to 4201, 4259 to 4327, 4346 to 4405, and 4463 to 4522. ORF1, -3, -4, and -5 of RNA2 had maximum amino acid sequence identities of 14, 30, 49 to 51, and 60%, respectively, with three other completed CiLV-C sequences (Table 3).

Methylated cap-like structures found in the gRNAs of CiLV-C were also observed in the 5′ UTR of both of the CiLV-C2 RNAs. Both CiLV-C2 5′ UTRs were longer than those of the CiLV-C isolates (Table 3; Fig. 4). Sequence alignment of the 5′ UTRs of RNA1 and RNA2 did not reveal any conserved sequences of more than 4 nt. Nucleotide sequences were more similar in the 3′ UTRs between RNA1 and RNA2. Excluding the poly(A) tail, the 3′ UTRs of RNA1 and RNA2 were 224 and 350 nt long. The sequence alignment of the 3′ UTRs of the CiLV-C2 RNA1 began at the 1st nucleotide, which corresponds to the 121st nt of RNA2, and showed a very high (75%) nucleotide identity (data not shown). This is much higher than the overall nucleotide identity of only 52 to 54 and 40 to 41% observed between CiLV-C and CiLV-C2 RNA1 and RNA2, respectively (Table 3). The 3′ UTR nucleotide sequence identity of CiLV-C2 RNA1 and RNA2 in-creased from 75 to 86.5% when only the last 126 nt were aligned. A similar pattern of conserved nucleotide sequence identity was also observed between CiLV-C RNA1 and RNA2 (37).

Northern blot hybridization. Northern blot analyses were performed on total RNA to confirm the length and the number of subgenomic RNA (sgRNA) from citrus-leprosis-affected plants in Colombia. DIG-labeled positive-stranded RNA-specific probes of pCiLV-C2-p29 (nucleotides 7699 to 8493) and pCiLV-C2-p24 (nucleotides 4180 to 4716) complementary to 3′-terminal regions of the RNA1 and RNA2, respectively, were used for hybridi-zation. The pCiLV-C2-p29-specific probe hybridized with a gRNA1 molecule with an estimated size of ≈9 kb. In addition, the same probe also hybridized with an sgRNA1 of ≈1.0 kb, cor-responding to a transcript that may serve as a template for the expression of p29 (Fig. 5). Furthermore, a 3′ end-labeled RNA2-specific riboprobe documented two sgRNAs with estimated sizes of ≈3.1 and ≈1.0 kb along with the full-size gRNA2 of ≈5.0 kb (Fig. 5). No hybridization signals were observed corresponding to the genomic and sgRNAs of CiLV-C. RNA from healthy citrus also did not hybridize with CiLV-C2-specific riboprobes.

Phylogenetic analyses. Four phylogenetic trees were con-structed using the amino acid sequences of the three conserved domains (MTR, Hel, and RdRp) of p285 in RNA1 and the MP of RNA2. In all, 20 to 26 members of six to eight closely related virus genera belonging to *Bromo-*, *Cile-*, *Clostero-*, *Cucumo-*, *Furo-*, *Higre-*, *Hordei-*, *Ilar-*, *Pomo-*, *Tobamo-*, and *Tobravirus* were included in the phylogenetic analysis of p285. The MTR and Hel domains of CiLV-C2 had 77 and 62% amino acid sequence identity, respectively, with the MTR and Hel domains of *Cilevirus* (CiLV-C), followed by a 36 to 40% amino acid sequence identity with the HGSV. Thus, CiLV-C2 clustered with CiLV-C in the dendrogram, consistent with it being a second member of the genus *Cilevirus* (Fig. 6A and B). The RdRp domain of *Ligustrum ringspot virus* (LigRSV) (ADM47770), another *Brevipalpus* mite-associated virus, showed the greatest (85%) amino acid sequence identity whereas the RdRp domain of CiLV-C had a 75 to 77% sequence identity with the RdRp domain of CiLV-C2. Phylo-genetic analysis using deduced protein sequences of the RdRp domain confirmed the relatedness of CiLV-C2 to the genus *Cilevirus* and LigRSV mite-transmitted viruses (Fig. 6C).

The MP of CiLV-C2 shared a 73% amino acid sequence identity and nearest phylogenetic relationship with the *Passion fruit green spot virus* (PFGSV) (ADY38390), which is also trans-mitted by *Brevipalpus* mites. Other mite-transmitted viruses such as CiLV-C and LigRSV (ADM47769) shared the same clade in the dendrogram but had only 54 to 55 and 39% amino acid identity, respectively, with CiLV-C2 (Fig. 6D). Partial amino acid sequences of the MP domain of the above-mentioned mite-associated viruses were aligned and conserved amino acid se-

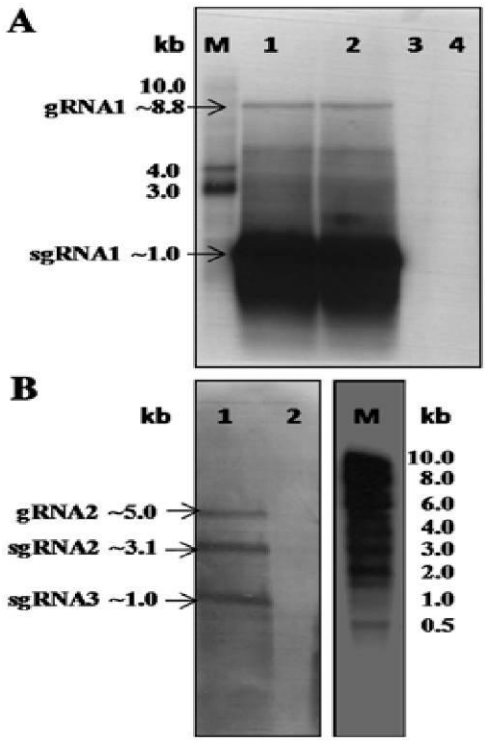
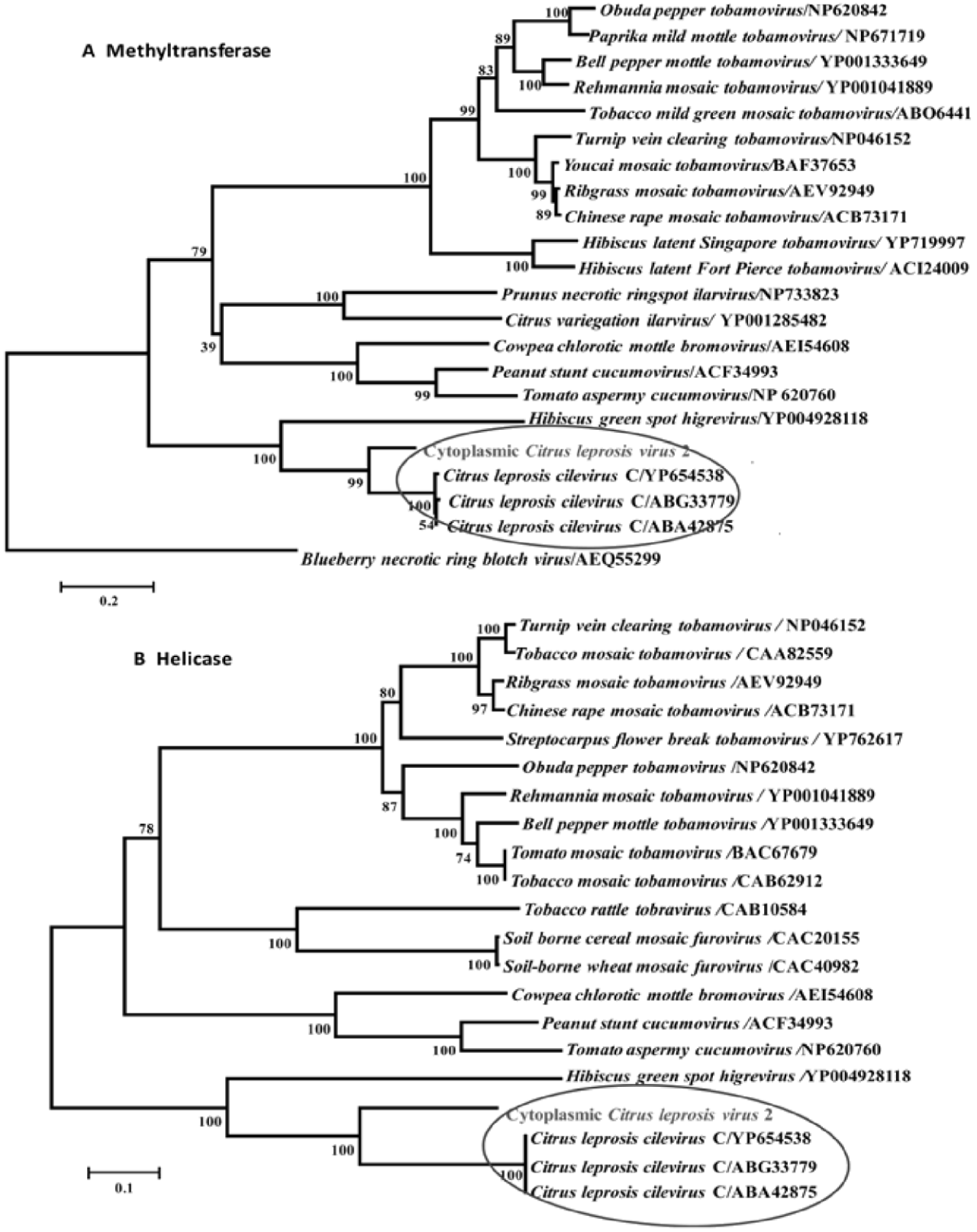


Fig. 5. Northern blots hybridization signals of *Citrus leprosis virus* cyto-plasmic type 2 (CiLV-C2) obtained using specific probes for CiLV-C2-RNA1 and -RNA 2. **A,** Positive-sense probes pCiLV-C2-p29 for RNA1 were pre-pared from open reading frame (ORF)2 that encodes the putative coat protein gene (nucleotides 7699 to 8493) (lanes 1 and 2) and **B,** pCiLV-C2-p24 that encodes for RNA2 prepared from 3′ terminal of ORF p24 (nucleotides 4180 to 4716) (lane 1). M: 0.5- to 10-kb RNA ladder (Life Technologies, Carlsbad, CA). Healthy citrus leaves (lane A3) and CiLV-C (lanes A4 and B2) were used as negative controls. Both the probes gave no signal with total RNA from healthy and CiLV cytoplasmic type samples.



(*Continued on next page*)

Fig. 6. Phylogenetic relationships among *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) and other related virus genera based on the domains **A,** methyltransferase; **B,** helicase; **C,** RNA-dependent RNA polymerase from RNA1, and **D,** conserved movement protein from RNA2. All of the virus names and their genera are shown in italics following their GenBank accession numbers (A to D) and the vector associated with virus transmission (D only). The tree was constructed using the MEGA5 program and the neighbor-joining method. Phylogenetic groups were supported by 1,000 bootstrap replicates. Branch lengths are proportional to the genetic distances. CiLV-C2 is circled with the other members of the genus *Cilevirus.*

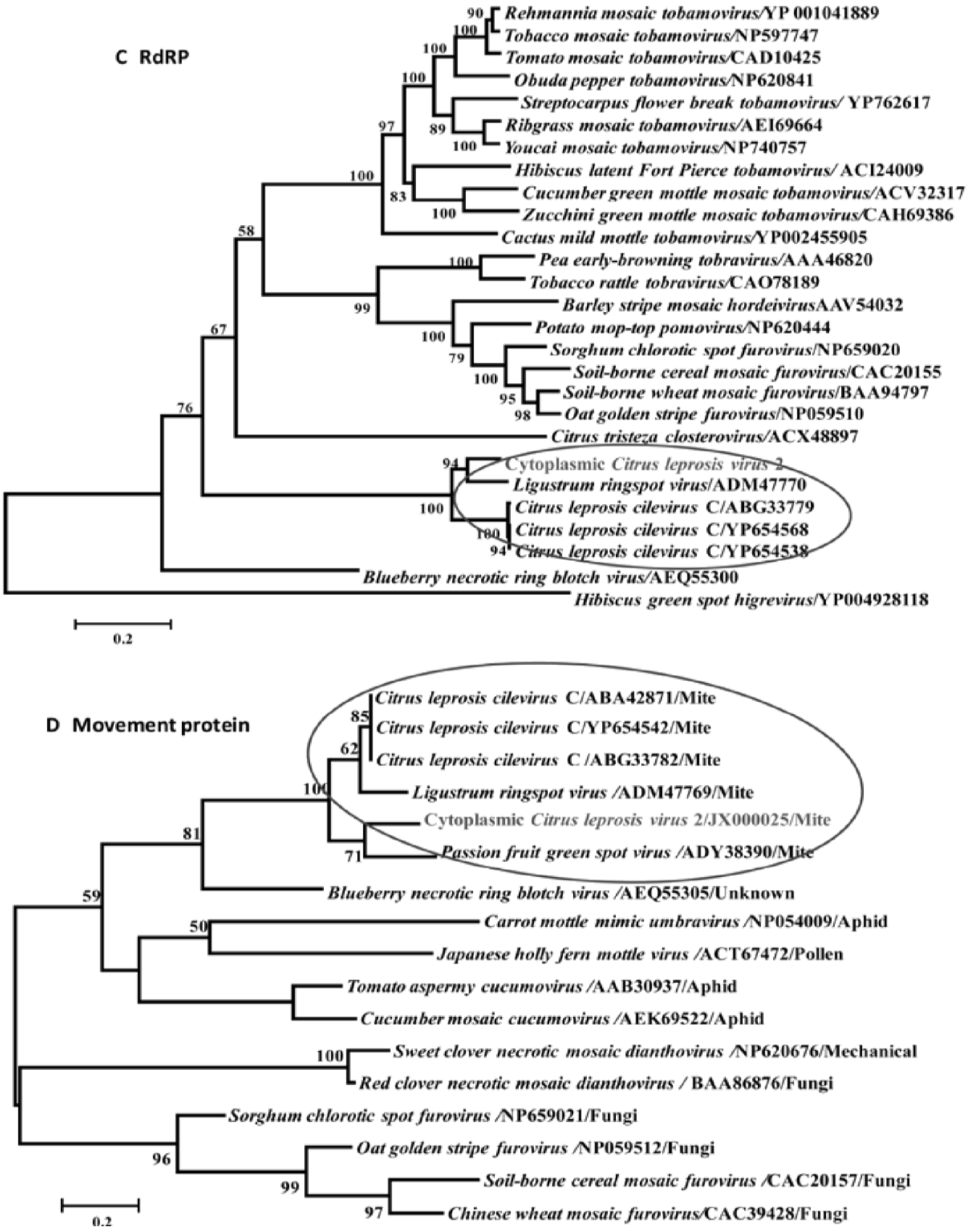


Fig. 6. (*Continued from previous page*)

quences at positions 161 to 165 (HRRLG) and 191 to 196 (LWREAF) of CiLV-C2 (accession number JX000025) were detected (Fig. 7).

Detection of CiLV-C2 from Colombian citrus-leprosis-affected samples. Thirty-two citrus plants were tested to determine whether CiLV-C2 was consistently associated with citrus-leprosis-like symptoms in Colombia. Samples from Mandarin orange (*C. reticulata*, Blanco) and four commercial cultivars of sweet orange were collected from commercial citrus groves in the states of Meta and Casanare. CiLV-C- and HGSV-specific primer pairs were used to test citrus-leprosis-affected leaf, fruit, and twig samples by RT-PCR (27,31). No amplicons typical for CiLV-C or HGSV were produced by RT-PCR from any of the samples. The newly developed primer set CiLV-C2-CPG-F and CiLV-C2-CPG-R successfully amplified the CPG (795 bp) amplicon from RNA of 32 Colombian citrus leprosis samples and 10 *B. phoenicis*-transmitted Valencia sweet orange seedlings but not from RNA prepared from a reference CiLV-C or healthy sweet orange leaf samples (Fig. 8). Sequencing of the 795-bp RT-PCR amplicon showed 98 to 99% nucleotide sequence identity with the reference sequence L147V1 (JX000024) and other positive samples of CiLV-C2 from Colombia.

DISCUSSION

In this study, a novel citrus virus, CiLV-C2, associated with citrus-leprosis-like symptoms in Colombia was characterized utilizing sRDS and a newly developed RT-PCR assay based on the CPG of CiLV-C2 and applied to distinguish CiLV-C2 from CiLV-C.

Leprosis-affected samples from Casanare and Meta states in Colombia were tested for CiLV-C and HGSV using RT-PCR and all samples were negative. In addition, negative DAS-ELISA results were also obtained for CiLV-C. However, TEM results confirmed the presence of CiLV-C2 virions in the cytoplasm but not in the nuclei of the infected tissues. The CiLV-like virion size was similar to that found with CiLV-C and their location in the cytoplasm also ruled out the possibility of CiLV-N and HGSV infections (Fig. 2). Therefore an attempt to identify a new virus present in these symptomatic samples was done using sRDS, and a new bipartite, positive-sense ssRNA virus (CiLV-C2) was discovered. The results suggest that only CiLV-C2 was associated with the Colombian citrus-leprosis-symptomatic tested samples from the states of Meta and Casanare and that the symptoms of CiLV-C2 were similar to those of CiLV-C. CiLV-C2 was detected from citrus-leprosis-affected Mandarin and cultivars of sweet orange previously identified as susceptible hosts for CiLV-C (40). CiLV-C2 was transmitted by the tenuipalpid false spider mite, *B. phoenicis*, from CiLV-C2-infected citrus to the healthy Valen-cia sweet orange seedlings and reproduced the disease symptoms of CiLV-C2. The newly developed RT-PCR assay successfully identified CiLV-C2 from sweet orange leaves inoculated with *B. phoenicis*. CiLV-C, HGSV, LigRSV, and PFGSV are related to CiLV-C2 and are also transmitted by *Brevipalpus* spp. (19,20,40–42). The newly developed RT-PCR assay should be useful to determine whether *Brevipalpus* spp.-transmitted citrus-leprosis-like symptoms producing citrus zonate chlorosis disease (8,43) is caused by CiLV-C2.

Previously, sRDS has been used to identify known and unknown viruses associated with either symptomatic or asymp-tomatic tissues without any prior knowledge of the pathogen (12,21,36,54). Both the assembly of sRDS reads and reassembly of de novo Sanger sequences indicated that CiLV-C2 was a novel virus in the Colombian leprosis-affected samples. The assembly of 21- to 22-nt sRNA sequence reads recovered ≈33 and ≈55% of the total lengths of CiLV-C2 RNA1 and RNA2, respectively, and those regions are significant in terms of the accumulation of sRNAs derived from the CiLV-C2 associated with the leprosis-like symptoms. In all, ≈1,350 nt from the 5′ UTR RNA2 and several intergenic regions of RNA1 were not obtained from sRDS, perhaps indicating that those sequences were not targeted by DCL2 endonuclease. Genome sequences of CTV, CEVd, and CDVd sequences were also identified by sRDS from the leprosis samples. The CTV sequence was more prevalent than CiLV-C2 in

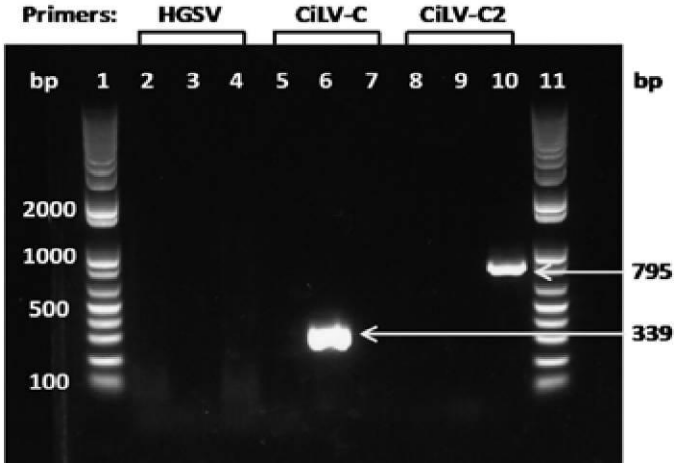


Fig. 8. Specific detection of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) by reverse-transcription polymerase chain reaction using primers specific for the CiLV-C2 coat protein gene. Lanes 1 and 11: 1-kb-plus DNA ladder (Life Technologies, Carlsbad, CA). Source of RNA templates as follows: healthy citrus (lanes 2, 5, and 8); CiLV cytoplasmic type (CiLV-C)-infected citrus (lanes 3, 6, and 9); and CiLV-C2-infected citrus (lanes 4, 7, and 10). Primers used were specific for *Hibiscus green spot virus* (HGSV) (lanes 2 to 4), CiLV-C (lanes 5 to 7), and CiLV-C2 (lanes 8 to 10).

```
AA Position :  160                  180                  205
CiLV-C2     : GNETHRRLGISYEIEHSENLGGGHITFFTLTLLWREAFSLRPSFYKV
PFGSV       : GNESHRRLGLSYEIEHSENISGGHITTFALTLLWREAFYFQPSNFKV
LigRSV      : ----HRRLGIFYQVD-CDDISG-EVTTFAITLLWREAFSFKPSFYQV
CiLV-C1&2   : GSEVHRRLGIQYQVD-CDNISG-RVTTFSITALWREAFSFRPSFYKV
CiLV-C3     : GSEVHRRLGIQYQVD-CDNISG-RVTTFSITALWREAFSFRPSFYKV
Consensus   : GSEVHRRLGIQYQVDHCDNISGGRVTTFSITALWREAFSFRPSFYKV
```

Fig. 7. Comparison of the amino acid sequences of the movement proteins (MPs) of *Brevipalpus* mite-transmitted viruses: *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type 2 (CiLV-C2), *Passion fruit green spot virus* (PFGSV), *Ligustrum ringspot virus* (LigRSV), and *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type (CiLV-C). CiLV-C$^{1\&2}$ and CiLV-C^{3} designate sequences from Brazil (ABA42871 and YP654542) and Panama (ABG33782), respectively. Amino acid (AA) positions are based on CiLV-C2 MP sequence (JX000025). Dashes (–) indicate gaps introduced to optimize the alignment. Highlighted sequences are conserved in the MP domain. Amino acid HRRLG letters code for histidine, arginine, arginine, leucine, and glycine whereas LWREAF letters code for leucine, tryptophan, arginine, glutamic acid, alanine, and phenylalanine.

both libraries, perhaps because CTV infection is systemic rather than local and induces abundant dsRNA (14) that can be pro-cessed as substrate for DCL2 to produce siRNA (51).

The nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 of CiLV-C2 were determined and comparisons of CiLV-C2 with CiLV-C and HGSV provided important information for taxonomic classifica-tion. The organization of the complete CiLV-C2 genome indicated that it is structurally similar to the bipartite CiLV-C genome but not with the tripartite HGSV genome. The genomes of both CiLV-C and CiLV-C2 consist of two replicons with a methylated cap structure at the 5′ and 3′ UTR with a poly(A) tail.

ORF2 of RNA1 of CiLV-C2 encoded a putative CPG (p29) without significant amino acid identity among those of ssRNA positive-sense viruses in the GenBank. The polyclonal antiserum CREC-13 was raised against the p29 of CiLV-C and was used in DAS-ELISA with citrus-leprosis-like samples collected in Colombia. CREC-13 antibodies failed to detect CiLV-C in citrus-leprosis-affected samples that were later identified by RT-PCR to be caused by CiLV-C2. This is likely due to the low amino acid identity (≈33%) between CPGs of CiLV-C and CiLV-C2.

Instead of the four ORFs found in RNA2 of CiLV-C, (28,37), five ORFs were identified in RNA2 of CiLV-C2. The predicted molecular mass of the four shared ORFs was similar. However ORF2 encodes an additional protein of 67 aa (p7), with a putative trans-membrane domain in CiLV-C2. A similar region also was present in the CiLV-C genome spanning 156 nt (491 to 646 nt, DQ157465) but these amino acid sequences did not have any trans-membrane domain. The presence of the long intervening UTRs between ORF1 and ORF2 in CiLV-C and CiLV-C2 may prevent the transcription of more than two to three sgRNAs. Many positive-sense RNA viruses express their internal genes via synthesis of 3′-coterminal sgRNAs (7,32). One 3′-coterminal sgRNA from RNA1 and two from RNA2 were found, which suggest that CiLV-C2 could express the putative CP from RNA1 and hypothetical proteins p61 and p24 from the 3′ sgRNAs of RNA2. CiLV-C translated four sgRNAs (37).

The MP domain of RNA2 is similar to the 3A/RNA2 super-family of MPs (Pfam accession PF00803) found in CiLV-C and other ssRNA positive-sense viruses (Fig. 6D). A similar MP domain was not found in the HGSV genome. The complete MP sequences of CiLV-C and CiLV-C2 share 54 to 55% sequence identity. Partial MP sequences from other *Brevipalpus*-transmitted viruses such as PFGSV and LigRSV available in the database had a 73 and 39% identity, respectively, with CiLV-C2. Because the comparison is based on only partial sequence data for the other mite-transmitted viruses, complete MP sequences associated with *Brevipalpus* mite-transmitted viruses will be necessary to obtain a definitive result.

Phylogenetic analyses of the three conserved domains (MTR, Hel, and RdRp) of RNA1 and the MP domain of RNA2 con-sistently placed CiLV-C and CiLV-C2 into the same cluster in phylogenetic trees. The conserved MTR and Hel domains of CiLV-C2-RNA1 were distinct and showed more similarity toward members of the genera *Cilevirus* than *Higrevirus* (Fig. 6A and B). A phylogeny generated from the RdRp amino acid sequences showed that CiLV-C2 was closely related to other *Brevipalpus* mite-transmitted viruses such as CiLV-C and LigRSV (Fig. 6C). Phylogenetic analysis with the MP gene sequences from closely related aphid-, fungal-, and mite-transmitted viruses and several viruses with unknown vectors (Fig. 6D) was used to correlate MP sequences with virus–vector relationships. *Brevipalpus* mite-transmitted viruses such as CiLV-C, CiLV-C2, LigRSV, and PFGSV shared a single clade. Thus, the taxa might have a mono-phyletic relationship. Alignment of the partial MP sequences revealed two conserved regions among the *Brevipalpus* mite-transmitted viruses (Fig. 7). These conserved protein sequences might play a role in mite transmission but experimental con-firmation is necessary to verify this. All experimental results strongly support the unequivocal classification of CiLV-C2 as a second member of the genus *Cilevirus*.

CiLV-C was first reported from Colombia in 2004, and it was noted that some of the citrus-leprosis-symptomatic leaves con-tained CiLV-C particles when viewed in TEM but failed to produce amplicons using CiLV-C-specific RT-PCR (24). We have shown that symptoms and TEM could not be used to distinguish between CiLV-C and CiLV-C2. Based on previous publications (24,25) and the present study, we believe that CiLV-C and CiLV-C2 were probably present in Colombia prior to 2004 but the absence of appropriate detection tools prevented the identification of CiLV-C2. Both CiLV-C- and CiLV-C2-specific primers can now be utilized to better understand the distribution and potential impact of these two viruses on Colombian citrus. Unexpectedly, only CiLV-C2 was found in several locations in the states of Meta and Casanare, Colombia. This suggests that previously reported CiLV-C has been reduced or restricted to specific locations in Colombia and may indicate that CiLV-C2 has a selective advan-tage. Steps should be taken to prevent the dissemination of CiLV-C2 and to determine interactions with CiLV-C.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support for this research was from the USDA-APHIS-PPQ cooperative agreement 11-8130-1246, and Citrus Research & Development Foundation grant 405. We thank W. Schneider, USDA Agricultural Research Service, Fort Detrick, MD and S. Gowda, University of Florida/IFAS, CREC, Lake Alfred for providing useful comments and suggestion on the manuscript; and A. S. Guerra for the samples of CiLV-C from Panama.

LITERATURE CITED

1. Al Rwahnih, M. A., Daubert, S., Golino, D., and Rowhani, A. 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. Virology 387:395-401.
2. Al Rwahnih, M. A., Daubert, S., Urbez-Torres, J. R., Cordero, F., and Rowhani, A. 2011. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. Arch. Virol. 156:397-403.
3. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
4. Bastianel, M., Freitas-Astúa, J., Nicolini, F., Segatti, N., Novelli, V., Rodrigues, V., Medina, C. L., and Machado, M. A. 2008. Response of mandarin cultivars and hybrids to *Citrus leprosis virus*. J. Plant Pathol. 90:305-310.
5. Bastianel, M., Noveli, V.M., Kubo, K. S., Kitajima, E. W., Bassanezi, R., Machado, M. A., and Freitas-Astúa, J. 2010. Citrus leprosis: Centennial of an unusual mite–virus pathosystem Plant Dis. 94:284-292.
6. Bitancourt, A. A. 1955. Estudos sobre a leprose dos citros. I-Distribuição geográfica e sintomatologia. Arq. Inst. Biol. 22:161-184.
7. Buck, K. W. 1996. Comparisons of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. Adv. Virus Res. 47:159-251.
8. Chagas, C. M. 2000. Leprosis and zonate chlorosis. Pages 57-58 in: Compendium of Citrus Diseases, Second Edition. L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
9. Childers, C. C., Rodrigues, J. C. V., Derrick, K. S., Achor, D. S., French, J. C., Welbourn, W. C., Ochoa, R., and Kitajima, E. W. 2003. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: Past and present. Exp. Appl. Acarol. 30:181-202.
10. Choudhary, N., Roy, A., Leon, G.A., Levy, L., and Brlansky, R. H. 2011. Detection of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type utilizing the polyclonal antibodies specific to the movement and coat proteins. (Abstr.) Phytopathology 101:S36.
11. Clark, M. F., Lister, R. M., and Bar-Joseph, M. 1986. ELISA techniques. Methods Enzymol. 118:742-766.
12. Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., and Burger, J. T. 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. Virology 400:157-163.
13. Colariccio, A., Lovisolo, O., Chagas, C. M., Galletti, S. R., Rossetti, V., and Kitajima, E. W. 1995. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. Fitopatol. Bras. 20:208-213.
14. Dodds, J. A., and Bar-Joseph, M. 1983. Double-stranded RNA from

plants infected with closteroviruses. Phytopathology 73:419-423.
15. Iracheta-Cardenas, M. M., Metheney, P., Polek, M. L., Manjunath, K. L., Lee, R. F., and Rocha-Pena, M. A. 2009. Serological detection of *Citrus tristeza virus* with antibodies developed to the recombinant coat protein. Plant Dis. 93:11-16.
16. Hartung, J. S., Paul, C., Achor, D., and Brlansky, R. H. 2010. Colonization of dodder, *Cuscuta indecora*, by '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' and '*Ca*. L. americanus'. Phytopathology 100:756-762.
17. Hull, R. 2009. Replication of plus sense single stranded RNA viruses. Pages 140-151 in: Comparative Plant Virology, section II, chapter 8. Elsevier Academic Press, London.
18. Kashif, M., Pietilä, S., Artola, K., Jones, R., Tugume, A. K., Mäkinen, V., and Valkonen, J. 2012. Detection of viruses in sweet potatoes from Honduras and Guatemala augmented by deep-sequencing of small-RNAs. Plant Dis. 96:1430-1437.
19. Kitajima, E. W., Chagas, C. M., and Rodrigues, J. C. V. 2003. Brevipalpus-transmitted plant virus and virus-like diseases: Cytopathology and some recent cases. Exp. Appl. Acarol. 30:135-160.
20. Kitajima, E. W., Rodrigues, J. C. V., and Freitas-Astua, J. 2010. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. Sci. Agric. 67:348-371.
21. Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., and Simon, R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. Virology 388:1-7.
22. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S. L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol. 10:R25. Online. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25
23. León, G. A., Becerra, C. H., Freitas-Astúa, J., Salaroli, R. B., and Kitajima, E. W. 2008. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the cytoplasmic type (CiLV-C) in Colombia. Plant Dis. 92:364-1364.
24. León, G. A., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E. W., and Meza, N. C. 2006. Detection of the cytoplasmic *Citrus leprosis virus* in the eastern plains of Colombia. Rev. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropec. 7:67-72.
25. León, G. A., Realpe, C. E., Garzon, P. A., Rodriguez, J. A., Moreno, M. G., Childers, C. C., Achor, D., Freitas-Astúa, J., Antonioli-Luizon, R., Salaroli, S. B., Cobo, N. C. M., and Kitajima, E. W. 2006. Occur-rence of *Citrus leprosis virus* in Llanos Orientales, Colombia. Plant Dis. 90:682.
26. Llave, C. 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant– virus interactions. Trends Plant Sci. 15:701-707.
27. Locali, E. C., Freitas-Astúa, J., Souza, A. A., Takita, M. A. J., Antonioli, R., Kitajima, E. W., and Machado, M. A. 2003. Development of molecular tool for the diagnosis of leprosis a major threat to citrus production in the Americas. Plant Dis. 87:1317-1321.
28. Locali-Fabris, E. C., Freitas-Astu, J., Souza, A. A., Takita, M. A., Astua-Monge, G., Antonioli-Luizon, R., Rodrigues, V., Targon M. L. P. N., and Machado, M. A. 2006. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type. J. Gen. Virol. 87:2721-2729.
29. Loconsole, G., Onelge, N., Potere, O., Giampetruzzi, A., Bozan, O., Satar, S., De Stradis, A., Savino, V. N., Yokomi, R. K., and Saponari, M. 2012. Identification and characterization of *Citrus yellow vein clearing virus*, a putative new member of the genus *Mandarivirus*. Phytopathology 102:1168-1175.
30. Loconsole, G., Saldarelli, P., Doddapaneni, H., Savino, V., Martelli, G. P., and Saponari, M. 2012. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family *Geminiviridae*. Virology 432:162-172.
31. Melzer, M. J., Sether, D. M., Borth, W. B., and Hu, J. S. 2012. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. Phytopathology 102:122-127.
32. Miller, W. A., and Koev, G. 2000. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. Virology 273:1-8.
33. Nicholas, K. B., and Nicholas, H. B., Jr. 1997. GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. www.psc.edu/biomed/genedoc
34. Nunes, M. A., Oliveira, C. A. L., Oliveira, M. L., Kitajima, E. W. Hilf, M. E., Gottwald, T., and Freitas-Astúa, J. 2012. Transmission of *Citrus leprosis virus C* by *Brevipalpus phoenicis* 1 (Geijskes) to alternative host plants found in citrus orchards. Plant Dis. 96:968-972.
35. Pallett, D. W., Ho, T., Cooper, I., and Wang, H. 2010. Detection of *Cereal yellow dwarf virus* using small interfering RNAs and enhanced infection rate with *Cocksfoot streak virus* in wild cocksfoot grass (*Dactylis glomerata*). J. Virol. Methods 168:223-227.
36. Pantaleo, V., Saldarelli P., Miozzi, L., Giampetruzzi, A., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., and Burgyan, J. 2010. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. Virology 408:49-56.
37. Pascon, R. C., Kitajima, J. P., Breton, M. C., Assumpcao, L., Greggio, C., Zanca, A. S., Okura, V. K., Alegria, M. C., Camargo, M. E., Silva, G. G. C., Cardozo, J. C., Vallim, M. A., Franco, S. F., Silva, V. H., Junior, H. J., Oliveira, F., Giachetto, P. F., Ferrari, F., Aguilar-Vildoso, C. I., Franchiscini, F. J. B., Silva, J. M. F., Arruda, P., Ferro, J. A., Reinach, F., and Silva, A. C. R. 2006. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus leprosis associated virus, cytoplasmatic type (CiLV-C). Virus Genes 32:289-298.
38. Quan, P., Briese, T., Palacios, G., and Lipkin, W. I. 2008. Rapid sequence-based diagnosis of viral infection. Antiviral Res. 79:1-5.
39. Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron dense stain for electron microscopy. J. Cell Biol. 17:08-212.
40. Rodrigues, J. C. V., Kitajima, E. W., Childers, C. C., and Chagas, C. M. 2003. *Citrus leprosis virus* vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. Exp. Appl. Acarol. 30:161-179.
41. Rodrigues, J. C. V., Machado, M. A., Kitajima, E. W., and Müller, G. W. 2000. Transmission of *Citrus leprosis virus* by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). Pages 174-178 in: Proc. 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol. J. V. da Graca, R. F. Lee, and R. K. Yokomi, eds. IOCV, Riverside, CA.
42. Rodrigues, J. C. V., Nogueira, N. L., and Freitas, D. S. 1995. Ringspot on *Ligistrum lucidum* Aiton, a new disease transmitted by *Brevipalpus phoenicis* G. (Acari: Tenupalpidae), in Brazil. Fitopatol. Bras. 20:292.
43. Rossetti, V., Lasca, C. C., and Negretti, S. 1969. New developments regarding leprosis and zonate chlorosis of citrus. Pages 1453-1456 in: Proc. 1st Int. Citrus Symp. University of California, Riverside.
44. Roy, A., and Brlansky, R. H. 2010. Genome analysis of an orange stem pitting *Citrus tristeza virus* isolate reveals a novel recombinant genotype. Virus Res. 151:118-130.
45. Sambrook, J., Fritsch, E. M., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
46. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:5857-5864.
47. Schulz, M. H., Zerbino, D. R., Vingron, M., and Birney, E. 2012. Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. Bioinf. Adv. Access 28:1-7.
48. Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26:31-43.
49. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739.
50. Thompson, J., Gibson, T, Plewniak, F., and Higgins, D. 1997. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:876-4882.
51. Vazquez, F., Legrand, S., and Windels, D. 2010. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. Trends Plant Sci. 15:37-345.
52. Wu, Q., Luo, Y., Lu, R., Lau, N., Lai, E. C. Li, W., and Ding, S. 2010. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:1606-1611.
53. Zerbino, D.R., and Birney, E. 2008. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Res. 18:821-829.
54. Zhang, Y., Singh, K., Kaur, R., and Qiu, W. 2011. Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. Phytopathology 101:1081-1090.

B. Anexo: Artículo publicado Revista Agronomía Colombiana

"Current status of the citrus leprosis virus (CiLV-C) and its vector Brevipalpus phoenicis (Geijskes)"

Revista Agronomia Colombiana

Mayo - Agosto de 2012. Vol XXX (242 -250)

Aceptado para publicación 29 de junio de 2012.

Autor: Leon M. Guillermo

Current status of the *Citrus leprosis virus* (CiLV-C) and its vector *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)

Situación actual del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) y su vector *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)

Guillermo León M.[1]

ABSTRACT

The *Citrus leprosis virus* CiLV-C is a quarantine disease of economic importance. Over the past 15 years, this disease has spread to several countries of Central and South America. Colombia has about 45,000 hectares of citrus planted with an annual production of 750,000 tonnes. The CiLV-C has only been detected in the departments of Meta, Casanare and recently Tolima. Meta has 4,300 hectares representing 10% of the national cultivated area, and Casanare, where CiLV- C appeared in 2004, has no more than 500 ha planted with citrus. The presence of the citrus leprosis virus in Colombia could affect the international market for citrus, other crops and ornamental plants with the United States and other countries without the disease. The false spider mite *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) is the main vector of the CiLV-C. Disease management is based on control programs of the vector and diminishing host plants. Chemical mite control is expensive, wasteful and generates resistance to different acaricides. This paper provides basic information on CiLV-C and its vector, advances in diagnosis and methods to control the disease and prevention of its spread.

Source photographs: Figs. 1-4: León M., G.

Key words: diagnosis, leprosis, vector mite, control.

RESUMEN

La leprosis de los cítricos CiLV-C es una enfermedad de importancia económica y cuarentenaria. Durante los últimos 15 años se ha comprobado su dispersión por varios países del Centro y Sur América. Colombia posee aproximadamente 45.000 hectáreas cultivadas en cítricos, con una producción anual de 750.000 toneladas. La CiLV-C únicamente ha sido detectada en los departamentos del Meta, Casanare y recientemente en Tolima. El Meta, con 4.300 hectáreas representa el 10% del área nacional cultivada y Casanare, en donde se confirmó la presencia del CiLV-C en el año 2004, no posee más de 500 ha sembradas con cítricos. La presencia de la leprosis de los cítricos en Colombia, puede afectar el mercado internacional, así como el de otros productos agrícolas y plantas ornamentales con Estados Unidos y otros países que no poseen la enfermedad. El ácaro rojo plano *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenu-ipalpidae) es el principal transmisor del CiLV-C. El manejo de la enfermedad, se basa en programas de control del vector y la disminución de plantas hospederas. El control químico del ácaro, es costoso, dispendioso y genera resistencia. El presente trabajo provee información básica sobre CiLV- C y su vector, avances en diagnóstico, métodos para control y prevención de diseminación de la enfermedad.

Palabras clave: diagnóstico, leprosis, ácaro vector, control.

Introduction

The *Citrus leprosis virus* (CiLV-C) is a quarantine and economically important disease, which represents mil-lions of dollars in damage to citrus crops in countries where it has been established, affecting mainly the orange and mandarin and is reported only in South America and Central America. During the past 15 years, it has caused economic losses in Argentina, Brazil, Paraguay, Uruguay, Venezuela, Costa Rica, Panama and Honduras. The disease was recently reported in Guatemala, Peru, Bolivia and Colombia (Locali *et al*., 2003; Saavedra *et al*., 2001; Mejía *et al*., 2005; Gómez *et al*., 2005; León *et al*., 2006).

According to Rodrigues *et al* . (2001) and Freitas *et al*. (2004), CiLV-C is considered the most important viral disease in the Brazilian citrus industry because the costs of controlling the mite vector reach about $100 million dollars per year. Besides the importance of the disease to the Brazilian citrus industry, its global importance has grown in recent years due to the spread of the virus to other countries in Central and South America (Kitajima *et al*., 2004; Freitas *et al*., 2005).

The importance of CiLV-C is that the disease severely affects production and is considered a quarantine disease, there-fore there are restrictions for international marketing of some agricultural products, especially in countries of North America, Europe and Asia which do not have the disease.

Colombia has about 45,000 ha planted with citrus with an annual production of 750,000 t. The citrus leprosis virus

Received for publication: 5 February, 2010. Accepted for publication: 29 June, 2012.

[1] La Libertad Research Center, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Villavicencio (Colombia). gleon@corpoica.org.co

was detected in 2003 in Yopal, Casanare; by 2005 the dis-ease spread to all of Meta and Casanare (Leon *et al*., 2006; Becerra *et al*., 2007). The CiLVC has only been reported in Meta and Casanare. The citrus area planted in Meta is approximately 4,300 ha, which represents 10% of the na-tional cultivated area. Casanare, where CiLV-C appeared in 2004, has no more than 500 ha planted with citrus. The estimated production for Meta is $180.000 million pesos per year, providing reason to develop control programs (MADR, 2002).

Knowing the importance of the disease to Colombia, the objective of this study is to publish research advances concerning the virus and its vector, as a basis for future research and control methods striving for economic impact prevention as well as reduction in the spread of the disease in Colombia.

History and distribution of the disease

Childers *et al*. (2003) and the USDA, 2004 say that the disease was first reported in Florida, United States in 1901 and was called "scale bark". The disease almost destroyed the citrus industry in Florida before 1925, but has not reappeared since 1968, possibly due to the use of sulfur to control mites, frequent freezes and hurricanes that devas-tated large areas planted in orchards. In South America, it was first identified in 1920 in Paraguay (Spegazzini, 1920), where it was called "lepra explosiva". In a short period, the disease was observed in Argentina; and in Sao Paulo, Brazil, it was reported in 1931 on leaves of the 'Bahiana' variety orange and then in several sweet oranges (Bastianel *et al*., 2006).

During the 1930s and 1940s, it was suggested that leprosis could be caused by a virus. However, the etiology of the dis-ease was confirmed by electron microscopy just after 1972 with the observation of virions in the symptomatic tissue (Kitajima *et al*., 1972), and transmissions to alternate hosts through mechanical inoculations (Colariccio *et al*., 1995). Kitajima (1972), described the leprosis virions in citrus leaves and determined that this virus may be cytoplasmic (CiLV- C) or nuclear (CiLV-N). The cytoplasmic virus is widely distributed in affected countries, unlike the nuclear virus which is uncommon in citrus groves (Kitajima *et al*., 2004; Kitajima, 2005).

The citrus leprosis is restricted to countries in Central and South America (Rodrigues *et al*., 2001), in Mexico, the presence of the disease was confirmed in Chiapas in July 2005 (NAPPO, 2005). Citrus leprosis was reported in Costa Rica by Araya (2000), in Panama by Saavedra *et al*. (2001), in Guatemala by Mejía *et al*. (2005) and in Bolivia by Gómez *et al*. (2005).

In Colombia, the citrus leprosis disease was observed in 2003 in Yopal, Casanare, and identification was officially confirmed in 2004 (León *et al*., 2006). During 2004 and 2005, leprosis was observed in several citrus orchards in Meta and Casanare. ICA has found the citrus leprosis disease in Ibague, Tolima, but this record has not been published (Bastianel *et al*., 2010). Although the red flat mite *B. phoenicis* has been registered in several areas of the country for more than three decades, the virus had not been recorded previously in Colombia (León *et al*., 2005).

Characteristics and disease diagnosis

Kitajima *et al*. (1972) reported the occurrence of viral particles in the tissues of leprosis symptomatic leaves but particles in the surrounding asymptomatic areas were not found. This indicates that the virus does not spread systemically in the host, which was confirmed by RT-PCR tests (Locali *et al*., 2004). The dispersion of the disease in the plant occurs through movement of viruliferous mites within the plantation and is a consequence of their feeding habits (Rodrigues *et al*., 2001).

The citrus leprosis virus is able to cause symptomatic injury in leaves, branches and fruits of citrus. The sweet orange trees are the most susceptible; tangerines and grapefruits have a medium susceptibility to the disease. Acid oranges, acid limes, lemons and tangelos show signs of lower suscep-tibility to the citrus leprosis virus (Rodrigues *et al*., 2001; Locali *et al*., 2004).

Symptoms on leaves

Leaf lesions are superficial and visible on both sides, but extremely variable, rounded or oval, often circular with a 5 to 12 mm diameter. Initially, lesions are present as light green spots surrounded by a yellow ring (Fig. 1). Typical lesions are chlorotic or necrotic; vary in color from light yellow to dark brown when they are fresh or when the injury is old respectively.

In older lesions, it is possible to observe a central dark spot with concentric halos which over time become dry. Circular spots may occur with the dry centers or stains of different sizes and shapes that extend, invading most of the leaf. Affected leaves eventually fall off.

Symptoms in branches

Injuries are located preferentially in young stems of fruiting branches. The first symptoms are yellowing circular spots, pale green or brown, with sizes varying from 0.5 to 1.0 cm. that look chlorotic, small lesions at the branch surface. Then spots grow to about 1.5 cm and take on a dark reddish color (Fig. 2), and sometimes are bulky due to the fact that the injury induces the formation of gum below the affected epidermis. As the lesion progresses, cracks occur and the tissue begins to detach from the crust. Older lesions may be joined together and involve considerable damage to the branches.

Fruit symptoms

The lesions are rounded, 0.2 to 1.2 cm in diameter, often dark and cause depressions in the rind; when the fruit is green, spots are pale green in the center with a yellow halo; subsequently, as the fruit matures, the center of the lesion becomes dark brown (Fig. 3). Fruits affected by leprosis will prematurely ripen, causing its fall.

Leprosis lesions only affect the rind of the fruit but not the internal condition. In Brazil and other countries where the disease is reported, it is very common to see more than 30 lesions per fruit (Zúñiga and Ramirez, 2002). These symptoms are associated with premature fruit drop and significant production losses. The diseased fruits change color, fade and are susceptible to decay.

The CiLV- C virus has been successfully transmitted mechanically to the sweet orange and from the sweet orange to the herbaceous hosts *Chenopodium amaranticolor, C. quinoa* and *Gomphrena globosa,* used as indicator plants (Colariccio *et al*., 1995).

According to its morphology, CiLV has been considered part of the family Rhabdoviridae. However, Localli *et al.* (2005) suggest that the virus is an RNA with a bipartite ge-nome, unlike the typical monopartite rhabdovirus genome. Recently, this information was confirmed by the complete CiLV- C genome sequence and phylogenetic analysis (Bas-tianel *et al*., 2006; Pascon *et al*., 2006). The complete CiLV-C nucleotide sequence confirms that the virus has a bipartite RNA; RNA 1 contains two open reading frames (ORFs) corresponding to 286 and 29 kDa, and RNA 2 contains four ORFs corresponding to 15, 61, 32 and 24 kDa. Phylogenetic analysissuggests that the citrus leprosis virus belongs to the Rhabdoviridae family and should be considered a type of the *Cilevirus* genus (Locali *et al*., 2006).

Locali *et al*. (2003) developed the first specific method for the molecular diagnosis of the disease through RT-PCR, which allows rapid and efficient virus detection. This tech-nique has been useful in detecting CiLV-C in Brazil and other countries where the disease needs to be diagnosed for the first time (Freitas *et al*., 2003 and 2005, Gómez *et al*., 2005; Bastianel *et al*., 2006).

The detection of the virus in Colombia, by electron microscopy studies, was conducted by Kitajima, who confirms the presence of bacilliform particles contained in the endoplasmic reticulum of vascular parenchymal mesophyll cells, and an irregular shaped viroplasm in the cytoplasm. These observations ensure that the citrus leprosis virus in Colombia is a cytoplasmic type CiLV-C (León *et al*., 2006). Molecular RT-PCR tests for the *Citrus leprosis virus* in Colombia initially showed positive results for some samples from Meta and Casanare using MPF (5'-CGTATTG-GCGTTGGATTTCTGAC-3') and MPR (5'-TGTATAC-CAAGCCGCCTGTGAACT-3') primers. In those studies, RNA fragments were amplified for samples collected in Meta, and one of the amplicons was sequenced and registered in the NCBI- GenBank as accession DQ272491. The obtained sequence showed 98% identity with the Brazilian nucleotide sequence isolated by CiLV-C from Brazil (NCBI-GenBank Accession AY289190.1), which allowed the first report of the occurrence of the CiLV-C in Colombia (León *et al*., 2006).

Afterward, Lenis and Angel (2010) tested, by RT-PCR, 15 different pairs of primers for CiLV-C detection, and found that only LCL1/MP4 was able to detect the virus in samples from Colombia, but results were not reproducible. This result confirms that leprosis virus detection in Colombia by RT-PCR techniques has no specificity for molecular amplification of different regions of the genome, suggesting that CiLV- C in Colombia shows differences from previous sequences reported in the NCBI-GenBank, so the virus should be sequenced to determine the variability among isolates.

Epidemiology

Symptoms of infection appear 15-60 d after mite transmission. Mite larvae transmit the disease with 48.3% efficiency but nymphs and adults are less efficient at transmission (Chiavegato, 1996). Only mites that have had access to lesions can transmit leprosis and an access period of 2 d is enough to acquire the virus. The virus is a lifetime-circulative type inside the mite body and transmission is possible once the mite acquires it (Chagas *et al*., 1983). According to recent studies, the virus is not systemic, which

FIGURE 1. Typical initial leprosis symptoms in orange leaves. Meta and Casanare, Colombia.

FIGURE 2. Symptoms of leprosis in Valencia orange branches. Meta and Casanare, Colombia. Left: initial state. Right: advanced.

means it does not spread through the plant (Kitajima *et al*., 2003). When the inoculum and virus vector are present in the fi eld and there is no control, the entire cultivation could be contaminated in two or three years Rodrigues *et al*. (2001). Th erefore, most leprosis control studies are focused on vector management (Alves *et al*., 2005). Lesions grow 5 to 7 mm in diameter every 15-20 d. When the severity is greater than 30%, aff ected leaf drop occurs on average 70 d aft er onset of the fi rst lesion (León *et al*. 2006).

Th e Instituto Colombiano Colombiano (ICA) reports 3768 ha for citrus production in Meta on 1,084 farms, of which 48.5% were positive for leprosis. In Casanare, there are 529 ha planted with citrus on 275 farms, of which 52% were positive for the disease (Becerra *et al*., 2007).

FIGURE 3. Symptoms of leprosis in 'Valencia' orange fruit. Meta, Colombia. Left: initial state. Right: advanced symptoms.

The mite vector *B. phoenicis*

The red flat mite *B. phoenicis* is the main vector of the CiLV- C. The mite belongs to the Tenuipalpidae family and is recognized as the most damaging species in citrus-producing areas where the virus has been reported. It is a polyphagous specie, distributed in many tropical and subtropical regions of the world.

The *Brevipalpus* genus has more than 300 species, but only *B. phoenicis*, *B. obovatus* and *B. californicus* are registered as CiLV-C vectors. These three species have been reported in all continents; they are polyphagous and therefore are considered of great importance to agriculture (Carvalho, 2008; Chagas, 1983; Childers *et al*., 2003; Maia and Oliveira, 2002; Myers 2010). *B. phoenicis* is the main vector and is widely dispersed in the world. In the USA, *B. phoenicis* is present and distributed from south Florida to throughout the subtropical area (Childers *et al*., 2003).

In Colombia, the mite *B. phoenicis* is found throughout all regions of the country. It is recognized as the main vector of the citrus leprosis virus in the country and is included as a pest present in most citrus growing regions.

Description of *B. phoenicis*

The B. phoenicis mite passes through egg, larva, protonymph, deutonymph and adult stages. The larva, nymph and adult stages have dormant and feeding phases. The mite is able to reproduce asexually by parthenogenesis thelyotoky; sexual reproduction is less common (Chiavegato, 1996).

The *B. phoenicis* mite is about 0.3 mm long, with an oval, flattened and reddish body, with its front wider than the rear, with little spots that are clearer on the back of the body. They are located on the underside of leaves and fruits; in the nymph and adult stages, they have 8 legs but in the larval stage, they have 6 legs and (Fig. 4). Adults are 0.1 mm and their movements are slow. The eggs are rounded, reddish and individually placed in fruits or undersides of leaves and shoots (Chiavegato, 1996; León *et al*., 2006).

Life cycle of *B. phoenicis*

The longevity of the *Brevipalpus* species is two or three ti-mes longer than several Tetranychid mites. Under favorable environmental conditions (25°C; 65-70% RH), the complete cycle of *B. phoenicis* is 25 d (Haramoto, 1969). Each female lays one to four eggs per day for 20 d, which may produce several generations per year.

The *B. phoenicis* mite is associated with the *Elsinoë fawcetii* scab for protection against rain (Kitajima and Muller, 1972). When *B. phoenicis* colonizes affected fruits with scab le-sions, the development is better than in healthy leaves and their immature stages are completed in less time; 14.4 d on fruits and 17.6 d on "Pera Rio" orange leaves; the fertility was higher in fruits than leaves with 39.2 and 8.6 eggs per female on average, respectively (Chiavegato, 1996).

The development of *B. phoenicis* in *Citrus lemon* is in-fluenced by temperature and relative humidity. With 25 to 30°C temperatures and 70% relative humidity, the red flat mite's development time is shorter, with the longest oviposition period and better fecundity and egg viability (Sadana and Kumari, 1991).

The life cycle of *B. phoenicis* at 27.6±0.7°C and 69±7.9% relative humidity is: egg 4-6 d; larva 3 -4 d; protonymph 5 -7 d; deutonymph 6 to 8 d and adults 21 to 24 d. According to

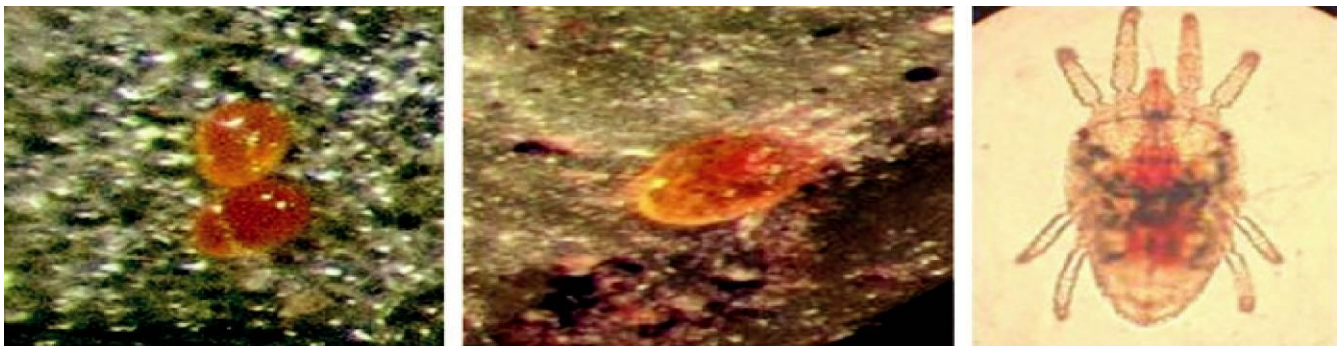


Figure 4. Development stages of red flat mite *B. phoenicis*. Left: eggs; center: nymph; right: adult.

these data, the life cycle from egg to adult is 18 to 25 d and the average adult stage is more than 21 d (León *et al*., 2006).

Habits, hosts and characteristics of *B. phoenicis*

The red flat mite *B. phoenicis* injects toxins into fruits, leaves, branches and other tissues of many plants and its importance is highly associated with the ability to transmit the virus. The virus multiplies in the vector and once acquired, the mite can transmit it during its entire lifetime (Chagas *et al*., 1983; Kitajima *et al*., 2003).

B. phoenicis is able to live and multiply in several plants. Childers *et al*. (2003) reported 486 host plants besides citrus. Among cultivated plants, they mention cashew (*Anacardium occidentale*), mango (*Mangifera indica*), papaya (*Carica papaya*), cassava (*Manihot esculenta*), cotton (*Gossypium* sp.), guava (*Psidium guajava*), pas-sion fruit (*Passiflora edulis*), coffee (*Coffea arabica*), cacao (*Theobroma cacao*), and grape (*Vitis vinifera*). In Brazilian citrus orchards, there are important weeds such as sabia (*Mimosa caesalpiniaefolia*), mallow (*Malvaviscus arboreus*), bala (*Sida cordifolia*), dayflower (*Commelina benghalensis*), goatweed (*Ageratum conyzoides*) and marigold spanish needle (*Bidens pilosa*) which are common hosts of the red flat mite (Maia and Oliveira, 2002).

Ulian and Oliveira (2002) found that *B. phoenicis* lives in citrus windbreaks and so recommended that *Hibiscus* sp. and *Bixa orellana* should not be used as living barriers because they favor survival of the mite.

León *et al*. (2006) recorded several weed hosts of the mite in citrus orchards such as verbena (*Stachytarpheta cayennensis*) yerbamora (*Lantana camara*) and escobo (*Sida* spp.). Natural infection of CiLV-C and mite presence in the *Swinglea glutinosa* plant, used in Colombia as a living fence, have also been reported (León *et al*., 2008).

Population dynamics of the mite *B. phoenicis*

The dispersion of *B. phoenicis* is relatively limited; mites move less than 1 cm d^{-1}; with 3% reach distances of 40 to 50 cm; wind speeds of 30 to 40 km h^{-1} spread only less than 1% of the mite population located in fruits. The dispersion of *B. phoenicis* is very restricted compared to other species of citrus mites and this low dispersion requires considerable attention to the management of acaricide resistance (Alves *et al*., 2005).

The *B. phoenicis* mite could be present in all aerial organs of orchards. The leaves are considered the prevalent reservoir, but the largest number of mites lives on the fruits. In southeastern Brazil, during the rainy season (October to March), the number of mites tends to decrease (Oliveira, 1996; Rodrigues *et al*., 2001).

In Colombia, the *B. phoenicis* mite is able to infest citrus orchards throughout the year, with population increases when the rains fall and during the beginning of fruit growth. When precipitation increases, there are decreases in the mite population. Populations remain throughout the year and present slight increases during July, August and October in the Eastern Plains due to rainfall decreases. During these months, fruits are in formation and growth, which could encourage the spread of the disease (León *et al*., 2006).

Control

According to Childers *et al* . (2003), when citrus leprosis is detected in a region, one has to prevent the spread to other areas free of the disease, while developing a control program. The program begins with the identification of the disease and the determination of the affected area. The subsequent steps are based on legislative actions and quarantine of the affected region. It also requires training in monitoring and controlling the mite vector and disease. To be successful, the program must achieve mite control and eradication of the disease in the affected region.

Rodrigues *et al*. (2001) emphasize that one orchard could be quickly infected when the virus inoculum is present in the field and there is no control of the mite vector. Therefore, control measures should be targeted to reduce the mite population and reduce the host plants of the virus. Chemi-cal control of the mite should be performed technically, based on mite monitoring and using different chemical groups of acaricides to avoid resistance.

Focus control of *B. phoenicis* is also a strategy for manage-ment of CiLV-C because it is an economical and efficient strategy of vector control; and reduces the regular use of chemicals and the possibility of resistance development (Alves *et al*., 2005). Other factors to be considered in an integrated control of the leprosis virus - vector program are discussed below:

Chemical control of *B. phoenicis*

The costs of acaricides for control of the CiLV-C vector *B. phoenicis* in orange plantations of Brazil are about $100 million dollars and this represents about 25% of total production costs. In Sao Paulo in 1995, over 60% of citrus

orchards had leprosis, which explains why chemical vector control is widely used (Rodrigues *et al*., 2001). After achie-ving an effective control of the mite, it takes two to three years to fully recover for a severely affected tree (Ferreira *et al*., 2003; Rodrigues *et al*., 2003).

Childers (1990) found that agricultural oils in combination with pyridaben, fenbutatin-oxide, dicofol or high doses of sulfur give mite control of 35 d; ethion carbaryl is less effective and did not control *B. phoenicis*.

There are several reports of pest resistance to organoestanic acaricides (cyhexatin, fenbutatin oxide, azocyclotin) in Brazil. Mite resistance has already been detected and characterized to dicofol, propargite and hexythiazos acaricides (Omoto *et al*., 2000). In addition, reduced mite susceptibility was found to enxofre pyrethroid acaricides, lime sulfur, as well as abamectin. In Brazil, the intense use of abamectin and enxofre for citrus rust mite control has already ended in critical points of resistance levels. The management strategy of pest agrochemical resistance is therefore essential in managing the leprosis mite (Omoto and Alves, 2004).

To determine the control of *B. phoenicis*, Corpoica tested 12 different acaricides, acrinathrin, tetradifon, sulfur, propargite, clofentezine, abamectin, tetradifon / propagite, milbecmectin, mineral oil, fenpyroximate, clorfenapyr and amitraz; all products result in satisfactory control. Seven products give a control above 80% and only five of the 12 treatments (abamectin, amitraz, acrinathrin, sulfur and tetradifon) show efficacy below 80% after 15 to 30 d of application. Therefore, in Colombia, there is an availability of specific acaricides to control the leprosis mite *B. phoenicis* with over 80% efficiency (León *et al*., 2006).

Biological control

Among the natural enemies of the *B. phoenicis* mite are the predatory mites of the Phytoseidae family and the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii*. Carvalho *et al*. (2008) studied the population dynamics of *B. phoenicis* and predatory mites (Phytoseidae and Stigmaeidae) in coffee plantations in Sao Paulo, Brazil; they found higher mites populations of *B. phoenicis* during dry periods of the year. The predatory mites *Euseius citrifolius* and *E. concordis* were the most frequent.

Biological alternatives for control of the citrus leprosis virus are a good choice for part of the integrated control of *B. phoenicis*. Predatory mites are considered the most efficient natural enemies of phytophagous mites. Citrus mite predators are frequently found in Colombia; mites of the Phytoseidae family such as *Euseius* sp., *Iphiseiodes zuluagai*, *Amblyseius* sp. and *Phytoseiulus* spp. are the most important natural enemies of the mite vector in citrus orchards (León, 2001).

Alternatively, control includes the use of entomopathogenic fungi; *H. thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* have been recorded as very promising natural enemies for *B. phoenicis* mite control (Magalhaes and Rodriguez, 2005). Rossi *et al*. (2006) recorded *H. thompsonii* as the most virulent entomopathogenic for red flat mite control.

Other control alternatives

Recently, it was shown that a bacterial endosymbiont of the genus *Cardinium* blocks production of androgenic hormones in the early stages of mite development, resulting in feminization of haploids males (Novelli *et al* ., 2004). As a consequence, it is commonly found that less than 1% of the population is male. Cobalt 60 irradiation to treat the bacteria *Cardinium* sp. influences the oviposition period and the number of eggs laid by irradiated females (Novelli *et al*., 2008).

Tangor Murcot is the most Tangor variety produced in Brazil, it can host the CiLV-C and be asymptomatic (Bastianel *et al*., 2004). Genetic improvement shows that the segregation of the disease phenotype in a population obtained by crossing the F1 sweet orange variety Pera and Tangor Murcot, pathogen susceptible and resistant respectively, suggests that some genes are involved in resistance to the citrus leprosis virus (Salvo, 1977; Bastianel *et al*., 2006).

Similarly, the progress achieved with the molecular genome decoding of the CiLV- C virus may result in the creation of transgenic plants with virus resistance. Researchers believe that the use of these transgenic plants in the near future will result in the suspension of acaricide applicationss to control the vector of the leprosis virus (Pascon *et al.*, 2006).

Conclusions and recommendations

The citrus leprosis virus CiLV-C is an economic and important disease representing losses for the citrus industry in the countries where it has been established.

The disease was first observed in Colombia during 2003, in the Eastern Plains region. After detection of the disease, a phytosanitary alert and prevention campaign, quarantines and research plans looking for the solution to the problem were launched. Currently, due to the presence of the disease in Colombia, one should expect major restrictions for the

international marketing of citrus and other agricultural exports.

Given that the virus diagnostic of leprosis citrus in Colombia with the RT-PCR molecular technique has not been reproducible, unspecific amplifications and therefore detection are unreliable; it is suggested that the CiLV-C virus in Colombia should be sequenced again to determine the variability of genomic isolates registered in the NCBI-GenBank; and subsequently, the RT-PCR molecular test has to be standardize with the new genomic isolates that are obtained.

Even though methods and technologies for the control of the mite vector and the citrus leprosis virus in Colombia are available, in order to eradicate the disease from the country, control programs require further investigation on the aspects of the mite vector and virus -plant relation-ship; and also on the biological control of the vector and genetic management of the disease to determine the most effective control methods applicable to the circumstances of the country.

Literature cited

Alves, E., N. Casarin, and C. Omoto. 2005. Dispersal mechanisms of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) in citrus groves. Neotrop. Entomol. 34(1), 89-96.

Araya, G. 2000. Informe sobre la prospección de la "leprosis de los cítricos" en la zona fronteriza (Costa Rica - Panamá). Minis-terio de Agricultura y Ganadería, Panamá.

Bastianel, M., J. Freitas, J. Rodrigues, F. Arrivabem, L. Antonioli, and M. Machado 2004. Resposta do tangor ´Murcott´ à inoculação do vírus da leprose dos citros em campo e em casa de vegetação. Laranja 2, 337-348.

Bastianel, M., J. Freitas, E. Kitajima, and M. Machado. 2006. The citrus leprosis pathosystem. Summa Phytophatol. 32(3), 211-220.

Bastianel, M., R. Bassanezi, J. Freitas, E. Kitajima, K. Kubo, and M. Machado. 2010. Citrus leprosis centennial of an unusual mite – vírus pathosystem. Plant Dis. 94(3), 284-293.

Becerra, H., V. López, H. Matheus, and A. Batidas. 2007. Monitoreo de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) vector de La leprosis de los cítricos en el Meta y Casanare. p. 142. In: Resumenes XXXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Socolen, Cartagena, Colombia.

Carvalho, M., L. Jéferson, M. Sato, A. Raga, and V. Arthur. 2008. Population dynamics of phytophagous and predaceous mites on coffee in Brazil, with emphasis on *Brevipalpus phoenicis*. Exp. Appl. Acarol. 44(4), 277-291.

Chagas, M., V. Rosseti, and L. Chiavegato. 1983. Influence of the biological cycle of *Brevipalpus phoenicis* on leprosis transmission. p. 69. In: Annals IX Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA.

Chiavegato, L. 1996. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes em citros. Laranja 17(1), 229-235.

Childers, C. 1990. Feeding injury to "Robinson" tangerine leaves by Brevipalpus mites (Acari: Tenuipalpidae) in Florida and evaluation of chemical control on citrus. Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred, FL.

Childers, C., J. Rodriguez, and W. Wellbourn. 2003. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites Expt. Appl. Acarol. 30, 29-105.

Childers, C., J. Rodrigues, K. Derrick, D. Achor, J. French, W. Wel-bourn, R. Ochoa, and E. Kitajima. 2003. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. Exp. Appl. Acarol. 30(1-3), 181-202.

Colariccio, A., O. Lovisolo, C. Chagas, S. Galetti, V. Rossetti, and E. Kitajima. 1995. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. Fitopatol. Bras. 20, 208-213.

Ferreira, P., A. Freitas, J. Rodrigues, and E. Kitajima. 2003. Dados preliminares mecânica e por ácaros de alguns dos vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Fitopatol. Bras. 28, S250.

Freitas, A, E. Locali, R. Antonioli, V. Rodrigues, E. Kitajima, and M. Machado. 2003. Detection of *Citrus leprosis virus* in citrus stems, fruits and the mite vector. Virus Rev. Res. 8(1), S196.

Freitas, A., M. Cavalcante, E. Locali, R. Antonioli, A. Domingues, and M. Machado. 2004. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. Virus Rev. Res. 9(1), 246-247.

Freitas, A., E. Kitajima, E. Locali, L. Antonioli, M. Bastianel, and M. Machado. 2005. Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different vi-ruses. p. 93. In: Annals XLV Annual Meeting of the American Phytopathological Society (APS). Caribbean Division, San Jose.

Gómez, E., R. Vargas, Rivadameira, E. Locali, A. Freitas, G. Astúa, J. Rodrigues, C. Mesa, and E. Kitajima. 2005. First report of *Citrus leprosis virus* on citrus in Santa Cruz, Bolivia. Plant Dis. 89(6), S686.

Haramoto, P. 1969. Biology and control of *Brevipalpus phoenicis*. Hawaii Agricultural Experimental Station, Tech. Bul. 68, 1-63.

Kitajima, E., G. Müller, A. Costa, and W. Yuki. 1972. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. Virology 50, 254-258.

Kitajima, E., C. Chagas, and J. Rodrigues. 2003. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. Exp. Appl. Acarol. 30(1-5), 135-160.

Kitajima, E., P. Ferreira, A. Freitas, and M. Machado. 2004. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. Summa Phytopathol. 30, 68.

Lenis, B. and J. Angel. 2010. Evaluación de iniciadores para la detec-ción del vírus de la leprosis de los cítricos mediante la técnica transmisión reversa reacción en cadena de la polimerasa. Undergraduate thesis. Faculty of Agricultural and Environ-mental Sciences, Universidad Francisco de Paula Santander, Cucuta, Colombia.

León, G. 2001. Insectos de los cítricos. Guía ilustrada de plagas y benéficos con técnicas para el manejo de los insectos dañinos. Produmedios, Bogota.

León, G., O. Realpe, M. Carreño, B. Garzón, and P. Campos. 2005. La Leprosis de los cítricos. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Corpoica, Villavicencio, Colombia.

León, G., E. Kitajima, A. Freitas, C. Childers, D. Achor, R. Salarolli, and C. Mesa. 2006. Occurrence of *Citrus leprosis virus* in Lla-nos Orientales, Colombia. Plant Dis. 90(5), 682.

León, G. 2006. Diagnóstico y recomendaciones de manejo para la leprosis de los cítricos. Tech. Bul. No. 47. Corpoica; MADR, Villavicencio, Colombia.

León, G., E. Kitajima, A. Freitas, M. Machado, and N. Meza. 2006. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplas-mático en los Llanos Orientales de Colombia. Rev. Corpoica 7(2), 67-72.

León, G., H. Becerra, R. Salarolli, and E. Kitajima. 2008. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the *Citrus leprosis virus* Cytoplasmatic Type (CiLV-C) in Colombia. Plant Dis. 92(9), 1364.

Locali, E.C., A. Freitas, A. Souza, M. Takita, G. Astúa, R. Anto-nioli, E. Kitajima, and M. Machado. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to *Citrus* production in the Americas. Plant Dis. 87(11), 1317-1321.

Locali, C., A. Freitas, and M. Machado. 2004. Leprose dos citros: biologia e diagnóstico. Laranja 25(1), 53-68.

Locali, C., A. Freitas, A. Souza, M. Takita, M. Astúa, L. Antonioli, V. Rodrigues, M. Targon, and M. Machado. 2005. Sequenciamento completo do genoma do vírus da leprose dos citros (CiLV-C). Fitopatol. Bras. 30, 191.

Locali, C. A. Freitas, A. Souza, A. Takita, A. Astua-Monge, R. Antonioli-Luizon, V. Rodrigues, M. Targon, and M. Machado. 2006. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type. J. Gen. Virol. 87, 2721-2729.

Magalhaes, B. and J. Rodrigues. 2005. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* Var. *Acridum* to the false spider mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). Fla. Entomol. 88(2), 195-198.

Maia, O. and C. Oliveira. 2002. Capacidade de colonização de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) em cercas vivas, quebra-ventos e plantas daninhas. p. 249. In: Resumenes XIX Congreso Brasilero de Entomología. Gramado, Brazil

Mejia, L., A. Paniagua, N. Cruz, M. Porras, and M. Palmieri. 2005. Citrus leprosis, disease that endangers plantations in Guatemala. pp. 17-19. In: Annals Annual Meeting of American Phytopathological Society, Caribbean Division, San Jose.

MADR, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural; Asohofrucol. 2002. Acuerdo de competitividad de la cadena productiva de los cítricos. Bogota.

Myers, M. 2010. Citrus leprosis, a major threat to production of oranges. In: http://www.cedaf.org.do/eventos/cfcs_2010/presentaciones/03_martes/tstar09p.pdf; consulted: March, 2012.

NAPPO, North American Plant Protection Organization. 2005. Sistema de aletra fitosanitaria. Detección de la leprosis en el estado de Chiapas, México. In: http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=165; consulted: July, 2012.

Novelli, V., A. Freitas, M. Astúa, S. Carvalho, E. Locali, V. Rodrigues, M. Hilf, T. Gottwald, and M. Machado. 2004. Widespread occurrence of an endosymbiont bacterium in *Brevipalpus phoenicis* populations in the Southeastern region of Brazil. p. 188. In: Annals XVI Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Monterrey, Mexico.

Novelli, V., A. Freitas N. Segatti, J. Mineiro, V. Arthur, M. Bastaniel, and M. Machado. 2008. Effects of radiation (Cobalt-60) on the elimination of *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) *Cardinium* endosymbiont. Exp. Appl. Acarol. 45(3-4), 147-153.

Oliveira, C. 1996. Ácaro vetor da leprose dos citros: aspectos biológicos. Laranja 17(1), 229-295.

Omoto, C., E. Alves, and P. Ribeiro. 2000. Detecção e monitoramento da resistência de Brev*ipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao dicofol. An. Soc. Entomol. Bras. 29(4), 757-764.

Omoto, C. and E. Alves. 2004. A resistência dos ácaros a acaricidas em citros. Visao Agrícola 2, 82-86.

Pascon, R., J. Kitajima, M. Breton, L. Assumção, C. Greggio, A. Zanca, V. Okura, M. Alegria, M. Camargo, G. Silva, J. Cardozo, M. Vallim, S. Franco, V. Silva, H. Jordão Jr., F. Oliveira, P. Giachetto, F. Ferrari, C. Aguillar, F. Franchisini, J. Silva, J. Ferri, F. Reinach, and A. Silva. 2006. The complete sequence and genomic organization of *Citrus leprosis virus* associated virus, Cytoplasmatic type (CiLV). Virus Genes 32, 289-298.

Rodrigues, J., C. Childers, E. Kitajima, M. Machado, and N. Nogueira. 2001. Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. Laranja 22(2), 412- 423.

Rodrigues, J., E. Kitajima, C. Childers, and C. Chagas. 2003. Cit-rus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. Exp. Appl. Acarol. 30(1-3), 161-179.

Rossi, Z., S. Luciana, and S. Alves. 2006. Susceptibility of *Brevipalpus phoenicis* to entomopathogenic fungi. Exp. Appl. Acarol. 40(1), 37-47.

Saavedra, F.S., A. Bernal, C. Childers, and E. Kitajima, 2001. First report of citrus leprosis on Panama. Plant Dis. 85(2), 228.

Sadana, G. and M. Kumari. 1991. Effect of temperature and relative humidity on the development of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari:Tenuipalpidae). Department of Zoology, Punjab Agricultural Unicersity, Ludhiana, India.

Salvo, F. 1997. Notas sobre o tratamento fitossanitário em citros. Laranja 18, 155-163.

Spegazzini, C. 1920. Sobre enfermedades y hongos que afectan las plantas de agrios en el Paraguay. An. Soc. Cient. Argent. 90, 155-188.

Ulian, L.F. and C. Oliveira. 2002. Leprosis citrus mite *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, behavior on different plants species, used as wind-break in citrus orchards. Rev. Agric. 77(1), 103-112.

USDA. 2004. Targeting a threat to U.S. citrus mite-borne disease already has foothold in South America. In: http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/mar04/citrus0304.htm; consulted: July, 2012.

Zúñiga, C. and P. Ramírez. 2002. Los virus, patógenos de importancia mundial. Man. Int. Plagas Agroecol. 64, 25-33.

C. Anexo

Análisis de regresión logística para el efecto del período de adquisición sobre la probabilidad de aparición de síntomas de CiLV

Análisis de estimación de Maxima verosimilitud para el modelo de regresion logística.

Parametro	DF	Estimado	Error	Chi^2	Pr > Chi^2
Intercepto	1	0.2068	0.4461	0.2150	0.6429
TIEMPO	1	0.000039	0.000235	0.0272	0.8690

D. Anexo

Análisis de regresión logística para el efecto del período de transmisión sobre la probabilidad de aparición de síntomas de CiLV

Anexo D-1: Análisis de estimación de Maxima verosimilitud para el modelo de regresion logística de la variable probabilidad de aparición de síntomas en función del periodo de transmisión:

Parametro	DF	Estimado	Error	Chi^2	Pr > Chi^2
Intercepto	1	-0.2781	0.2227	1.5599	0.2117
TIEMPO	1	0.000723	0.000416	3.0241	0.0820

Modelo de regresión logística ajustado (α = 0.082):

$$P = 1 / 1 + e^{(0.278 - 0.0007\ t)}$$

En donde:
P = Probabilidad de aparición de síntomas
t = Período de transmisión.

Anexo D-2: Análisis de la probabilidad de aparición de síntomas en función de los días de aparición:

Variable Dependiente: DIAS APARICION DE SÍNTOMAS

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Tiempo	6	321.232143	53.538690	1.36	0.2768
Error	21	827.953125	39.426339		
Total corregido	27	1149.185268			
C.V. (%)	59.04722				

Prueba de Tukey para los períodos de transmisión sobre la variable dependiente días de aparición de síntomas. (α = 0.05)

Grupo Tukey *	Promedio	N	TIEMPO
A	15.250	4	360
A			
A	12.625	4	1440
A			
A	12.438	4	120
A			
A	12.063	4	60
A			
A	10.625	4	30
A			
A	6.563	4	10
A			
A	4.875	4	20

* Promedios con la misma letra no presentan diferencias significativas.

E. Anexo

Anexo E-1

Protocolo TRIzol® Reagent para extracción de ARN total

1- Pulverizar la muestra (50-100 mg) y homogenizarla en 1 ml de TRIzol® usando vortex.

2- Separación de fases. Incubar la muestra homogenizada por 5 minutos a temperatura entre 15 a 30ºC, adicionar 200 µl de cloroformo por 1 µl de TRIzol®. Agitar los tubos vigorosamente con la mano por 15 segundos e incubar los viales de 15 a 30ºC, durante 2 a 3 minutos. Centrifugar las muestras no más de 12.000 x *g* por 15 minutos de 2 a 8ºC. Después de la centrifugación la muestra se separa en una fase inferior roja, fenolcloroformo, una interfase y una fase superior acuosa incolora. El RNA permanece exclusivamente en la fase acuosa, el volumen de esta fase es aproximadamente 60% del volumen de TRIzol®.

3- Precipitación de ARN. Transferir la fase acuosa a un tubo estéril nuevo. Precipitar el RNA de la fase acuosa con mezcla de Alcohol Isopropílico (500 µL) por 1 ml de TRIzol®. Incubar las muestras de 15 a 30ºC por 10 minutos y centrifugar no más de 12.000 x *g* durante 10 minutos de 2 a 8ºC. El ARN precipitado después de la centrifugación a menudo es invisible, o forma un pequeño gel de color blanquesino (pellet) en el fondo del tubo.

4- Lavado del ARN. Se remueve el sobrenadante y se lava el pellet una sola vez con etanol al 75%, adicionando como mínimo 1 ml de etanol por cada 1 ml de TRIzol® utilizado en la homogenización. Mezclar la muestra con vortex y centrifugar a 7.500 x *g* durante 5 minutos a temperatura de 2 a 8 ºC.

Resuspensión del ARN. Al final del procedimiento seque el pellet de ARN. Es importante no dejar secar el completamente. Resuspenda el RNA en agua libre de Rnasas, incube por 10 minutos a 55-60°C. El ARN puede también ser resuspendido en formamido 100% (deshionizado) y almacenado a -80°C.

Resumen protocolo SUPERSCRIPT III First-strand ®

1. Mezclar en un tubo ependorf que debe estar en hielo:

2 X RT mix	10 µl
RT Mix Enzima	2 µl
RNA más de 1 µg	4 µl
Agua DEPC hasta	20 µl

2. Mezclar e incubar a 25ºC por 10 minutos.

3. Incubar a 50ºC por 30 minutos.

4. Terminar la reacción a 85ºC por 5 minutos y poner en hielo.

5. Agregar 1 µl de E. coliRNase H e incubar a 37ºC por 20 minutos.

6. Guardar a -20ºC.

Anexo E-2

Protocolo de extracción de ARN de acaros con Buffer CTAB:

Por cada 10 ácaros agregar 50 µl de buffer CTAB

1. Macerar con pistilo fuertemente
2. Mezclar e incubar a 55°C por 15 minutos.
3. Agregar 115 µl de cloroformo:isoamyl alcohol (24:1) (110,4 µl de cloroformo y 4,6 µl de alcohol isoamilico)
4. Mezclar con vortex y centrifugar a 12000 rpm a 4°C por 10 min
5. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio
6. Repetir los pasos 4, 5 y 6
7. Agregar 1/10 volúmenes de $Ac.NH_4$ 7,5 M y 1 volumen de isopropanol
8. Mezclar por inversión y guardar a -20°C por 15 min
9. Centrifugar a 12000 rpm a 4°C por 5 min y descartar el sobrenadante
10. Agregar 150 µl de etanol 70% preparado con agua DEPC
11. Descartar el sobrenadante y dejar secar
12. Resuspender en 5 µl de agua DEPC
13. Guardar a -80°C o Procesar RT-PCR

Preparación Buffer CTAB:

2% (w/v) CetyltrimethylAmmoniumBromide
1,4 M NaCl
0,1M Tris HCl pH 8.0
0,5 % β-mercaptoethanol

Anexo E-3

Resumen protocolo pcr con cebadores CPG-F y CPG-R para deteccion de CiLV-C2

Reactivo	Cantidad
Buffer PCR 5X	10 µl
$MgCl_2$	3 µl
dNTPs	1 µl
Primer A	1 µl
Primer B	1 µl
Taq polimerasa	0.4 µl
Agua ultrapura	32.6 µl
cDNA	1 µl

Programa de termociclado PCR:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94	2 min.	1
Denaturación	94	15 seg.	35
Anillamiento	55	30 seg.	
Extensión	68	1 min.	
Extensión final	72	5 min	1
Conservación final	4	1 min	1