UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA DETECCIÓN Y DISCRIMINACIÓN DE CiLV-C Y CiLV-C2 EN COLOMBIA

WALTHER TURIZO ÁLVAREZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA-SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
2014

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA DETECCIÓN Y DISCRIMINACIÓN DE CiLV-C Y CiLV-C2 EN COLOMBIA

WALTHER TURIZO ÁLVAREZ

Tesis presentada como requisito para optar al título de
Magíster en Ciencias Agrarias - Línea de Investigación Fitopatología

Director
Ph.D. Oscar Arturo Oliveros Garay

Codirector
Ph.D. Francisco M. Ochoa Corona

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA-SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS – LÍNEA DE INVESTIGACIÓN EN FITOPATOLOGÍA
No. 548

En Bogotá a los 06 días del mes de octubre de 2014, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los profesores ORLANDO ACOSTA LOSADA, NUBIA Y. VELÁSQUEZ VELÁSQUEZ, ADRIANA GONZÁLEZ ALMARIO.

PRESIDENTE	DR. (A) ORLANDO ACOSTA LOSADA
JURADO	DR. (A) NUBIA Y. VELASQUEZ VELASQUEZ
JURADO	DR. (A) ADRIANA GONZALEZ ALMARIO

Para calificar la Tesis de:

WALTHER TURIZO ÁLVAREZ

Titulada:

"Desarrollo de un sistema para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 en Colombia" bajo la dirección de Oscar Arturo Oliveros.

Después de oír el informe del jurado y haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA ☒
REPROBADA ☐

ORLANDO ACOSTA LOSADA

NUBIA Y. VELASQUEZ VELASQUEZ

ADRIANA GONZALEZ ALMARIO

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS, Edificio 500 Piso 3º, Oficina 338
Teléfono directo (57-1) 316 5443 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 19063 - 19091
Correo electrónico: escpostgr_fabog@unal.edu.co
"Educando e innovando por un campo mejor"
Bogotá, Colombia, Sur América

Bogotá D.C., Octubre 6 de 2014

DEDICATORIA

A mi familia, en especial a mi novia María Fernanda Paz Ochoa, por su apoyo, paciencia y por sus inconmensurables muestras de amor día a día.

AGRADECIMIENTOS

A mis amigos Adriana Rugeles y Alexander Arrieta por su apoyo incondicional, por su cariño y por estar ahí siempre.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá por convertirse en mi segundo hogar y al proyecto de la Unidad de Gestión de Investigación-UGI (Res. No. 096-2012) por la financiación parcial de la investigación.

Al Dr. Oscar Arturo Oliveros Garay, profesor de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, director de la tesis, por abrirme las puertas del laboratorio, acogerme en su grupo de investigación y por generar un espacio de discusión sano en donde los argumentos, el respeto, la prudencia y la autonomía son las mejores herramientas de trabajo.

Al Dr. Francisco Ochoa Corona, profesor de Oklahoma State University, codirector de la tesis, por indicarnos la luz al final del túnel, por sus valiosas horas de trabajo a nuestro lado y sobre todo por ser un ejemplo de amistad, sabiduría, sencillez y sensatez.

A la Dra. Juliana Freitas-Astúa, investigadora del Centro de Citricultura Sylvio Moreira-Brasil, por el suministro de los controles positivos, por todos sus aportes con relación al estado del conocimiento de la leprosis de los cítricos y por su colaboración durante todos estos años de amistad.

A Shefali Dobhal y Arif Mohammad, investigadores Post-Doctorales del National Institute for Microbial Forensics & Food and Agricultural Biosecurity (NIMFFAB) por sus aportes, colaboración y participación en la investigación.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Oscar Fuentes Murillo, Ángela Vargas Verdugo, Catalina Botero Larrarte, Javier Martínez Alava y Everth Ebratt Ravelo, por todas sus enseñanzas y aportes en mi formación como fitopatólogo.

A los profesores Oscar Oliveros y Adriana González de la Facultad de Ciencias Agrarias, Favio González y Martha Calderón del Instituto de Ciencias Naturales, Camilo López y Luis F. García, del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia por contribuir en mi formación profesional y personal, pero sobre todo por su entrega y amor a la docencia, mil gracias.

A Heberth Velásquez y Álvaro Camargo, funcionarios de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, por su colaboración en el envío de las muestras de tejido vegetal.

A mis amigos Wadith de León, Jesús Alberto León y Rubén Darío Cruz por sus consejos, colaboración, buena disposición y ayuda constante en el laboratorio.

A mis compañeros del Grupo Nacional de Cuarentena Vegetal del Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, en especial a su Coordinador Dr. Wilkien Ramírez Espinosa por sus aportes y apoyo incondicional para poder culminar la investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias por su acompañamiento y colaboración.

CONTENIDO

pág

INTRODUCCIÓN 20

1. OBJETIVOS 24

1.1 OBJETIVO GENERAL 24

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24

2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO DE LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS 25

2.1 ANTECEDENTES DE LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS 25

2.2 AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS 27

2.2.1 *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) 27

2.2.2 Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) 34

2.2.3 Citrus leprosis virus nuclear type (CiLV-N) 38

2.2.4 Hibiscus green spot virus 2 (HGSV 2) 42

2.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VIRUS ASOCIADOS A LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS 45

2.3.1 Pruebas inmunoenzimáticas para detección de CiLV-C 45

2.3.2 Pruebas para detección de agentes etiológicos de la leprosis de los cítricos mediante RT-PCR 46

3. MATERIALES Y MÉTODOS 50

3.1 UBICACIÓN Y TIEMPO 50

3.2 METODOLOGÍA 50

3.2.1 Diseño de iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 50

3.2.2 Recolección de muestras de tejido vegetal 52

3.2.3 Extracción de RNA total 55

3.2.4 Estandarización de la metodología de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) convencional para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 55

3.2.5 Secuenciación de productos amplificados 57

3.2.6 Documentación, interpretación y análisis de resultados 57

3.2.7 Inferencia de la historia evolutiva de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2 58

3.2.7.1 Inferencia Bayesiana 58

3.2.7.2 Máxima Parsimonia 59

3.2.8 Ajustes de la metodología de transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 59

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 61

4.1 RESULTADOS 61

4.1.1 Diseño de iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 61

4.1.2 Recolección de muestras de tejido vegetal 65

4.1.3 Extracción de RNA total 69

4.1.4 Estandarización de la metodología de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) convencional para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 69

4.1.5 Secuenciación de productos amplificados 76

4.1.6 Inferencia de la historia evolutiva de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2 78

4.1.6.1 Inferencia Bayesiana 78

4.1.6.2 Máxima Parsimonia 81

4.1.7 Ajustes de la metodología de transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 82

4.2 DISCUSIÓN 84

4.2.1 Diseño de iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 84

4.2.2 Características de muestras de tejido vegetal sintomático a leprosis de los cítricos. 85

4.2.3 Estandarización de la metodología de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) convencional para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 86

4.2.4 Secuenciación de productos amplificados 93

4.2.5 Inferencia de la historia evolutiva de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2 93

4.2.6 Ajustes de la metodología de transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 96

5. CONCLUSIONES 98

6. RECOMENDACIONES 99

7. BIBLIOGRAFÍA 100

ANEXOS 110

LISTA DE TABLAS

pág

Tabla 1. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del gen *MP* de CiLV-C 47

Tabla 2. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del gen *Rep* de CiLV-C 47

Tabla 3. Secuencia de iniciadores diseñados para amplificar el gen *CP* de CiLV-C2 48

Tabla 4. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del gen N de CiLV-N 48

Tabla 5. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del gen M de CiLV-N 49

Tabla 6. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del dominio RdRp del RNA 1 de HGSV 2 49

Tabla 7. Georeferenciación de los sitios muestreados 53

Tabla 8. Secuencia de iniciadores universales *Nad*5 como controles internos de RT-PCR 55

Tabla 9. Secuencia de iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 62

Tabla 10. Parámetros termodinámicos y posibles estructuras secundarias de los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R 62

Tabla 11. Concentración y pureza del RNA total extraído 69

Tabla 12. Alineamiento y análisis Blastn® de secuencias diagnósticas amplificadas con los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R 76

Tabla 13. Alineamiento y análisis Blastn® de secuencias diagnósticas amplificadas con los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R 77

Tabla 14. Alineamiento y análisis Blastn® de secuencias diagnósticas amplificadas, a partir de los controles positivos Brasileros, con los iniciadores CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R 77

Tabla 15. Representación esquemática de la propuesta para la detección simultánea y discriminación mediante RT-mPCR utilizando los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R 82

LISTA DE FIGURAS

pág

Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de células infectadas con CiLV-C 27

Figura 2. Esquema de la estructura y organización del genoma de CiLV-C 28

Figura 3. Lesiones foliares ocasionadas por CiLV-C en naranja dulce 30

Figura 4. Morfo-anatomía de lesiones ocasionadas por CiLV-C 31

Figura 5. Acumulación de compuestos lipídicos en células de foliolos afectados con CiLV-C 31

Figura 6. Lesiones en fruto de naranja dulce ocasionadas por CiLV-C 32

Figura 7. Acumulación de lípidos y proteínas en células de frutos afectados por CiLV-C 33

Figura 8. Lesiones en ramas de naranja dulce ocasionadas por CiLV-C 33

Figura 9. Esquema comparativo de la estructura y organización del genoma de CiLV-C2 y CiLV-C 37

Figura 10. Lesiones en foliolos y ramas ocasionadas por CiLV-C2 37

Figura 11. Lesiones en fruto ocasionadas por CiLV-C2 38

Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de células infectadas con CiLV-N 39

Figura 13. Esquema de la estructura y organización genómica del RNA 1 de CiLV-N 40

Figura 14. Esquema de la estructura y organización genómica del RNA 2 de CiLV-N 40

Figura 15. Lesiones foliares ocasionadas por CiLV-N en naranja dulce 41

Figura 16. Detalle de una lesión ocasionada por CiLV-N en fruto 42

Figura 17. Microscopía electrónica de transmisión de células infectadas con HGSV 2 43

Figura 18. Esquema de la estructura y organización del genoma de HGSV 2 43

Figura 19. Lesiones ocasionadas por HGSV 2 en ramas y foliolos de *Citrus volkameriana* 45

Figura 20. Diagrama de las fases de la investigación 51

Figura 21. Formato para recolección de muestras 53

Figura 22. Mapa de los puntos de recolección de muestras en los departamentos de Meta y Casanare 54

Figura 23. Valor de energía óptimo del iniciador p24-T2-F calculado y representado mediante mfold® 63

Figura 24. Valor de energía óptimo del iniciador p24-T2-R calculado y representado mediante mfold® 64

Figura 25. Valor de energía óptimo del iniciador CiL-p32-F calculado y representado mediante mfold® 64

Figura 26. Valor de energía óptimo del iniciador CiL-p32-R calculado y representado mediante mfold® 65

Figura 27. Muestras colectadas en Villavicencio (C.I. La Libertad-Corpoica) Meta 66

Figura 28. Muestras colectadas en Guamal-Meta 66

Figura 29. Muestras colectadas en Puerto López (C.I. Taluma-Corpoica) Meta 67

Figura 30. Muestras colectadas en Yopal-Casanare (Coordenadas 5.219861,-72.395667) 67

Figura 31. Muestras de epidermis de fruto y ramas colectadas en Yopal-Casanare (Coordenadas 5.391444,-72.426056) 68

Figura 32. Muestras colectadas en Yopal-Casanare (Coordenadas 5.438167,-72.282917) 68

Figura 33. Muestras amplificadas con los iniciadores *nad*5-sentido y *nad*5-antisentido 70

Figura 34. Muestras amplificadas con los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R 71

Figura 35. Muestras amplificadas con los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R 72

Figura 36. Análisis realizado con los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R 73

Figura 37. Ensayo de detección mínima con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R 74

Figura 38. Amplificación en gradiente de temperatura con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R 75

Figura 39. Árbol de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2 construido mediante inferencia bayesiana 79

Figura 40. Diagnóstico de convergencia del análisis bayesiano evaluado con el programa Tracer® v1.5 80

Figura 41. Zona de descarte y zona de convergencia del análisis visualizadas en la ventana *Trace* del programa Tracer® v1.5 80

Figura 42. Árbol de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2 construido mediante máxima parsimonia 81

Figura 43. Análisis RT-mPCR con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R en muestras de los departamentos de Meta y Casanare 83

LISTA DE ANEXOS

pág

Anexo A. Extracción de RNA total con el protocolo TRIZOL® Reagent 111

Anexo B. Protocolo de purificación a partir de producto de PCR 113

Anexo C. Protocolo de precipitación y conservación de RNA total y cDNA a - 80 ºC 115

Anexo D. Secuencias de las regiones diagnósticas y controles positivos amplificados 116

RESUMEN

La leprosis de los cítricos es ocasionada por diversos agentes etiológicos dentro de los cuales se encuentran *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), Citrus leprosis virus nuclear type (CiLV-N), Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) e Hibiscus green spot virus 2 (HGSV 2). En Colombia se confirmó la presencia de CiLV-C en cultivos de los Llanos Orientales mediante transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en el año 2005. El reporte de 2013 de CiLV-C2 en muestras de cítricos sintomáticas colectadas en Colombia mediante la secuenciación de fragmentos pequeños de RNA (*Illumina GA IIX*) ha despertado interrogantes sobre la distribución de estas dos especies del género *Cilevirus* y si existen coinfecciones de CiLV-C y CiLV-C2 en plantaciones de cítricos en Colombia. La detección de CiLV-C en plantas hospedantes no es posible actualmente en el país mediante pruebas inmunoenzimáticas y RT-PCR con iniciadores específicos. Esta investigación desarrolla y propone un sistema de análisis molecular simultáneo mediante transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) para la detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 que permita determinar de manera específica, sensible y rápida la presencia o ausencia de coinfecciones de estas dos especies.

Palabras clave: CiLV-C2, CiLV-C, RT-mPCR, leprosis, detección, discriminación.

ABSTRACT

Citrus leprosis disease is caused by diverse etiological agents such as *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), Citrus leprosis virus nuclear type (CiLV-N), Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) and Hibiscus green spot virus 2 (HGSV 2). The presence of CiLV-C in the western plains of Colombia was confirmed in 2005 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). A published report from 2013 of CiLV-C2 in symptomatic citrus samples in Colombia sequenced from small RNA fragments (Illumina GA IIX) had raised questions about the distribution and presence of co-infections of both CiLV-C and CiLV-C2 in citrus groves in Colombia. Detection of CiLV-C in host plants is not possible in Colombia using commercially available immunoenzymatic assays nor RT-PCR using specific primers. This study developed a molecular assay for detection analysis and discrimination of CiLV-C and CiLV-C2 by reverse transcription multiplex PCR, resulting in a fast, sensitive and specific determination of presence or absence of co-infections of these two species.

Keywords: CiLV-C2, CiLV-C, RT-mPCR, leprosis, detection, discrimination.

INTRODUCCIÓN

La leprosis de los cítricos (*Citrus leprosis* - CiL), es una enfermedad que afecta especies del género *Citrus* spp. principalmente la naranja dulce (*Citrus sinensis*) y, con menor impacto, las mandarinas (*Citrus reticulata, C. reshni, C. deliciosa*). De acuerdo con el estado actual del conocimiento, los síntomas de la leprosis de los cítricos pueden ser ocasionados por diversos agentes etiológicos dentro de los cuales se encuentran *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) (Rodrigues *et al*., 2000, 2003; Locali *et al*., 2003, Locali-Fabris *et al*., 2006) Citrus leprosis virus nuclear type (CiLV-N) (Kitajima *et al*., 1972, 2011; Bastianel *et al*., 2010, Roy *et al*., 2013a, Roy *et al*., 2014), Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2) (Roy *et al*., 2013c) e Hibiscus green spot virus 2 (HGSV 2) (Melzer *et al*., 2012, 2013), el cual fue reportado sobre *Citrus volkameriana* en Hawaii causando síntomas similares a los de leprosis de los cítricos*.* Estos virus son transmitidos por especies de ácaros *Brevipalpus* spp. (Acari: Tenuipalpidae), principalmente *B. phoenicis* (Rodrigues *et al*., 2003). El control de la leprosis de los cítricos es realizado mediante el manejo de *Brevipalpus* spp. y los costos de acaricidas representan alrededor de 80 a 100 millones de dólares por año en Brasil (Rodrigues *et al*., 2003; Bastianel *et al*., 2010).

Una de las características de la leprosis de los cítricos y de otras enfermedades causadas por virus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTBr) es la infección local sobre tejidos inoculados como son hojas, tallos y frutos, que difieren de los síntomas sistémicos de la mayoría de enfermedades virales de plantas. Algunas de estas afecciones están constituidas por cambios anatómicos inducidos, por ejemplo en el caso de CiLV-C, alteraciones como hipertrofia en células del parénquima, hiperplasia y acumulación de compuestos lipídicos, en donde se encuentran diferencias significativas entre las lesiones generadas por CiLV-C y CiLV-N (Marques *et al*., 2010).

Los síntomas de esta enfermedad exhiben un patrón común. Los daños en las hojas son a menudo superficiales. Las lesiones características en hojas están constituidas por áreas cloróticas o necróticas, variando en color de amarillo claro a marrón oscuro y son a menudo circulares con diámetros que van desde 5 a 12 mm. Ocasionalmente es posible observar un punto central más oscuro en lesiones más avanzadas y pueden presentarse manchas concéntricas-anulares. Los síntomas aparecen a menudo como pequeñas lesiones superficiales de color marrón oscuro o rojizo en tallos o ramas jóvenes. Eventualmente, las lesiones más longevas se pueden unir formando lesiones largas sobre ramas maduras bien desarrolladas. En frutos es muy frecuente contabilizar hasta 30 lesiones, cubriendo una parte significativa del exocarpo, estas lesiones son por lo general depresiones oscuras que afectan únicamente la parte externa del fruto y no el mesocarpio o albedo (Bastianel *et al*., 2006). Sin embargo, la leprosis de los cítricos reduce directamente la producción y la vida útil de las plantas, debido que en infecciones severas, donde las plantas no se han tratado, se observa caída prematura de foliolos y frutos, al igual que marchitamiento severo, seguido por muerte de las plantas (Rodrigues *et al*., 2003; Calegario *et al*., 2013).

La leprosis de los cítricos ha sido reportada en Sur, Centro y Norte América, particularmente en Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Bolivia, Venezuela, Colombia, Panamá, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Guatemala, Costa Rica, México y Belice (Bastianel *et al*., 2010; Rodrigues y Childers, 2013; CABI, 2014). Hasta hace pocos años sólo se conocían dos virus asociados a la leprosis de los cítricos, CiLV-C la especie más prevalente y distribuida en Sur y Centro América y CiLV-N el cual se ha reportado únicamente en los Estados de São Paulo, Rio Grande do Sul y Minas Gerais en Brasil, en el Distrito de Boquete-Panamá, en el Estado de Querétaro-México y recientemente reportado en Colombia (Roy *et al*., 2013c, Roy *et al*., 2014). En el país se confirmó la presencia de CiLV-C en cultivos de los Llanos Orientales mediante la técnica RT-PCR (transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa) por parte de investigadores del Instituto

Colombiano Agropecuario-ICA y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, en colaboración con el Centro de Citricultura Sylvio Moreira de Brasil (Moreno y Ángel, 2005; León *et al*., 2006, 2008). En Colombia la detección de CiLV-C en plantas sintomáticas de naranja dulce (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr (León *et al*., 2008) no fue posible mediante pruebas inmunoenzimáticas (ELISA) utilizando el anticuerpo policlonal CREC13-IgG (Choudhary *et al*., 2013) y RT-PCR con iniciadores específicos diseñados por Locali *et al*., 2003. Estos iniciadores amplifican regiones parciales que codifican la proteína de movimiento-MP y la poliproteína de la replicasa de CiLV-C (Roy *et al*., 2013a). De igual forma, ensayos de RT-PCR utilizando iniciadores específicos (Melzer *et al*., 2012) para detección de HGSV 2 en muestras con síntomas de leprosis de los cítricos de los departamentos de Meta y Casanare en Colombia resultaron negativos (Roy *et al*., 2013a).

La secuenciación de fragmentos pequeños de RNA (*small* RNA - sRNA) extraídos de lesiones típicas de leprosis de los cítricos en plantas provenientes de los departamentos de Meta y Casanare, Colombia, mediante el uso de la nueva generación de secuenciación *Illumina GA* IIX, conjugado con análisis bioinformático (Roy *et al*., 2013b) determinó que el agente etiológico asociado es un nuevo virus denominado CiLV-C2 (Roy *et al*., 2013a). Teniendo en cuenta los antecedentes de la enfermedad se puede afirmar que los agentes etiológicos asociados a la leprosis de los cítricos en Colombia más prevalentes y destructivos son CiLV-C y CiLV-C2, siendo este último, posiblemente, el más prevalente en la actualidad (Roy *et al*., 2013a). CiLV-C fue reportado en el año 2005 como el agente causal de la leprosis de los cítricos en el país (Moreno y Ángel, 2005; León *et al*., 2006, 2008). Dando continuidad al orden anterior de ideas, en Colombia no se conoce con claridad la distribución de estas dos especies del género *Cilevirus*; y de igual manera, se desconoce si existen coinfecciones de estos dos virus en las plantaciones de cítricos del país. Así mismo, es importante destacar que el

diagnóstico de la leprosis de los cítricos carece, hoy en día, de herramientas de análisis molecular simultáneo que permitan detectar y discriminar los distintos agentes causales asociados a un hospedante. Esta investigación tuvo como objetivo el desarrollo de un sistema de análisis molecular simultáneo, el cual hace uso de iniciadores específicos, para la detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 mediante transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) que permite determinar de manera específica, sensible y rápida la presencia o ausencia de coinfecciones de CiLV-C y CiLV-C2. Esta estrategia constituye una herramienta útil, viable y económica, que tiene aplicación en bioseguridad agrícola, microbiología forense, programas de mejoramiento genético, regulación y certificación fitosanitaria.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 de utilidad en bioseguridad agrícola.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y evaluar iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 mediante transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR).

- Determinar la presencia o ausencia de coinfecciones de CiLV-C y CiLV-C2 en naranja dulce (*Citrus sinensis*) en Colombia.

- Inferir sobre la historia evolutiva de las regiones diagnósticas p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2.

2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO DE LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS

2.1 ANTECEDENTES DE LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS

El primer reporte de leprosis de los cítricos se remonta a 1860 (Knorr, 1959). La enfermedad fue descrita en una planta de naranja dulce sembrada en una granja situada en *Old Tampa Bay*, lo que tiempo después se convirtió en el parque público Phillippi Hammock, en el condado de Pinellas-Florida en los Estados Unidos de Norte América. Esta planta de naranja dulce presentó síntomas típicos de leprosis sobre hojas, ramas y frutos maduros (Lovisolo, 2001). La enfermedad originalmente llamada *Nailhead Rust* o “cabeza de clavo oxidado” por los síntomas ocasionados en el fruto y *Florida Scaly Bark* o “descortezamiento de las ramas en Florida” por los síntomas presentes en las ramas, fue inicialmente estudiada por Fawcett, 1911. En 1926, la enfermedad fue llamada leprosis por Fawcett y Lee (Bitancourt, 1955). No obstante, en los Estados Unidos de Norte América no se reporta esta enfermedad desde 1960 (Bastianel *et al*., 2010), la cual se cree que desapareció o fue erradicada debido a los programas intensivos de manejo en contra del ácaro vector (Childers *et al*., 2003), algunos autores han sugerido sin evidencias fuertes, que posiblemente el agente etiológico de la leprosis de los cítricos en Florida-USA fue CiLV-N (Kitajima *et al*., 2011).

En Sur América, el primer reporte de leprosis de los cítricos fue realizado en Paraguay (Spegazzini, 1920) en donde fue llamada en sus inicios “lepra explosiva”. En los años 1930s, se relacionó a esta enfermedad del Paraguay con la misma ocurrida en Florida-USA. Poco tiempo después de su primer reporte en Paraguay la leprosis fue observada en Argentina y Uruguay (Zeman, 1932; Bitancourt, 1940). En Brasil la leprosis de los cítricos ha sido reportada desde 1931. La enfermedad fue inicialmente encontrada en Sorocaba, São Paulo

asociada a naranja dulce Navel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (Bitancourt, 1934). Los síntomas observados en Brasil, abundantes lesiones foliares, fueron distintos a los observados en Florida-USA, donde las lesiones en hojas fueron raramente observadas, esta diferencia fenotípica condujo a una demora en la identificación de la enfermedad, la cual fue denominada “Variola”. Dos años más tarde, se concluyó que esta enfermedad era la misma conocida con el nombre de leprosis en Florida-USA (Bitancourt, 1955; Bastianel *et al*., 2010).

En relación a las islas del caribe, estas aún están libres de leprosis de los cítricos y los reportes realizados sobre presencia en otros continentes fueron hechos sobre la base de síntomas y requieren de validación mediante pruebas de diagnóstico (Bastianel *et al*., 2010).

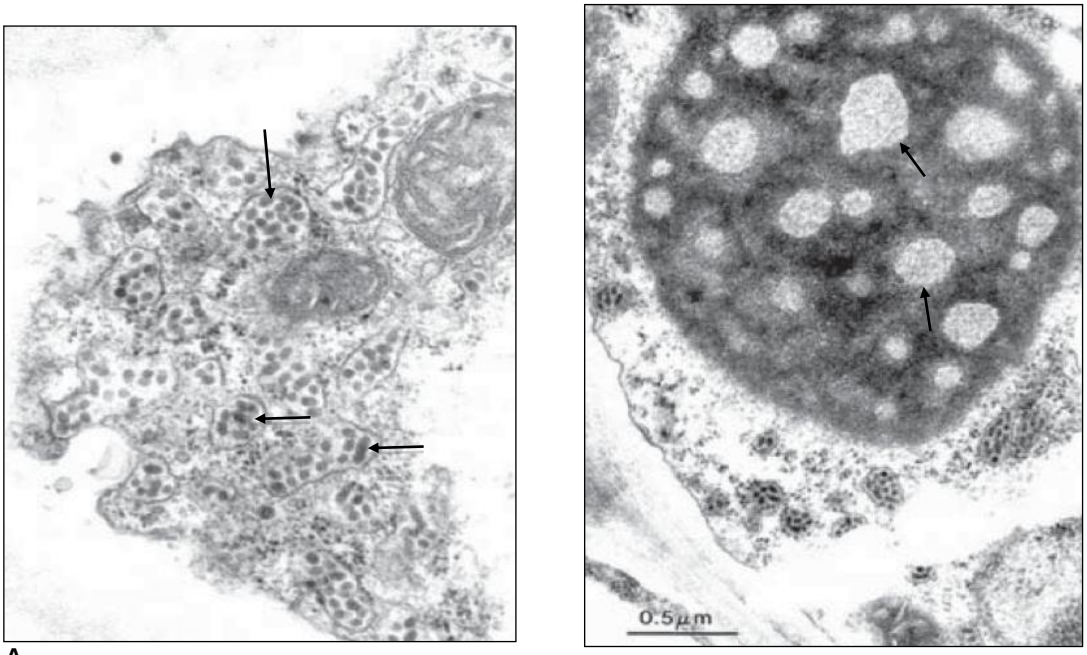
En sus inicios la etiología de la leprosis de los cítricos fue controversial debido que esta se asoció con fitopatógenos como hongos e incluso con toxinas presentes en la saliva de *Brevipalpus* spp. Sin embargo, la presencia de partículas baciliformes asociadas a lesiones de leprosis de los cítricos observadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), permitió reforzar la hipótesis de un virus como agente etiológico de esta enfermedad (Kitajima *et al*., 1972). Posteriormente, síntomas característicos de leprosis fueron reproducidos a través de inoculación mecánica de savia en plantas del mismo género y otras plantas herbáceas (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn.*, C. quinoa* Willd., y *Gomphrena globosa* L.) (Colariccio *et al*., 1995). De esta manera se sumó evidencia para determinar que un agente viral fue la causa de la enfermedad (Bastianel *et al*., 2010).

2.2 AGENTES ETIOLÓGICOS DE LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS

2.2.1 *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C).

CiLV-C es la especie tipo del recién creado género *Cilevirus* (Carstens, 2010; Locali-Fabris *et al*., 2012) el cual aún permanece sin una familia asignada. CiLV-C es un virus baciliforme de 120–130 nm de longitud y 50–55 nm de ancho, rodeado por una membrana. Las partículas virales se ubican en el lumen del retículo endoplasmático, como se observa en la figura 1A y producen alteraciones en el citoplasma de células infectadas que incluye masas densas vacuoladas, denominadas viroplasmas (Colariccio *et al*., 1995), como se evidencia en la figura 1B.

Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de células infectadas con CiLV-C

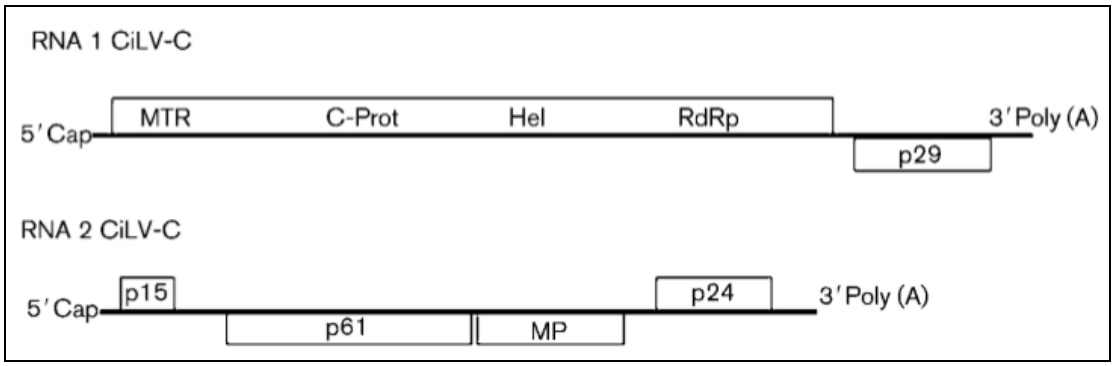


A **B**

Fig. 1. A: Viriones en el lumen del retículo endoplasmático. B: Viroplasmas en el citoplasma.
Fuente: Bastianel *et al*., 2006. *Summa Phytopathologica.* V.32, n.3, p.211- 220.

La secuenciación del genoma de CiLV-C (Locali-Fabris *et al*., 2006; Pascon *et al*., 2006) evidenció que éste es un virus que posee un RNA bipartita de cadena sencilla con sentido positivo, (+)ssRNA, de ~14 kb. El RNA 1 tiene una longitud de 8745 nucleótidos (nt), excluyendo la cola poli (A) en el extremo terminal 3' y está compuesto por dos *Open Reading Frames* - ORF o marcos abiertos de lectura, mientras que el RNA 2 tiene una longitud de 4986 nt, excluyendo la cola poli (A) y está compuesto por cuatro ORFs, como se observa en la figura 2.

Figura 2. Esquema de la estructura y organización del genoma de CiLV-C



Fuente: Locali-Fabris *et al*., 2006. Journal of General Virology. 87, 2721–2729

El ORF 1 del RNA 1 inicia en el codón AUG en la posición del nucleótido (nt) 109 y finaliza en el codón UAA en la posición del nt 7647 y codifica un largo polipéptido con 2512 aminoácidos (aa) (286 kDa). Análisis de esta poliproteína traducida revela cuatro dominios conservados: Metiltransferasa (MTR; aa 126–528), Cisteína proteasa (C-Prot; aa 689–797), Helicasa (Hel; aa 1558–1841) y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp; aa 2055–2494) como se ilustra en la figura 2. Aunque cabe resaltar que Roy *et al*., 2013a en el esquema de comparación de la organización del genoma entre CiLV-C2 y CiLV-C incluyen un dominio adicional denominado FtsJ-MTR entre los dominios C-Prot y Hel de CiLV-C a diferencia de lo que plantean Locali-Fabris *et al*., 2006 y Pascon *et al*., 2006. Esta diferencia se puede apreciar en la figura 9 correspondiente al numeral 2.2.2

Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2). El ORF 2 del RNA 1 inicia en el codón AUG en la posición del nt 7710 y finaliza en el codón UAG en la posición del nt 8501 y codifica la proteína putativa de la cápside (CP) de 263 aa (29 kDa). Este ORF 2 es seguido por una región 3' no traducible (NTR) de 228 nt y una cola poli (A) de longitud indeterminada, como se representa en la figura 2.

El ORF 1 del RNA 2 inicia con el codón AUG en la posición del nt 67 y finaliza con el codón de parada UAA en la posición del nt 459, este codifica una proteína con 130 aa (15 kDa). El ORF 2 codifica la proteína más larga del RNA 2, esta proteína tiene 537 aa de longitud (61 kDa), la cual inicia con el codón AUG en la posición del nt 1590 y finaliza con el codón UAA en la posición del nt 3203. El ORF 3 codifica una proteína con dominio conservado de movimiento viral-MP, esta proteína inicia con el codón AUG en la posición del nt 3228 y finaliza con el codón UAA en la posición del nt 4121 y está compuesta por 297 aa (32 kDa). El ORF 4, en el RNA 2, inicia con el codón AUG en la posición del nt 4093 y finaliza con el codón de parada UGA en la posición del nt 4737 y codifica una proteína con 214 aa (24 kDa). Ninguna de las proteínas codificadas por los ORFs 1, 2 y 4 del RNA 2 presentan dominios conservados o similares a otras secuencias registradas en bases de datos. El ORF 4 del RNA 2 es seguido por una región 3' no traducible (NTR) de 232 nt y una cola poli (A) de longitud indeterminada. Una secuencia conservada (GAUAAAUCU) ha sido reportada en el extremo terminal 5' de ambos RNAs de CiLV-C (Locali-Fabris *et al*., 2006).

Las alteraciones morfo-anatómicas inducidas por CiLV-C sobre los distintos tejidos como foliolos, frutos y ramas, incluye hipertrofia de células del parénquima, hiperplasia y acumulación de compuestos lipídicos. Las lesiones causadas por CiLV-C en foliolos de naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) tienden a crecer en forma alargada, por lo general, con un color verde pálido y presentan uno o más anillos concéntricos de color marrón que en algunos casos contienen un material de textura gomosa. La característica general de estas lesiones son áreas

con halos necróticos, sucesivos o coalescentes, ligeramente cóncavos formando manchas necróticas que alternan con regiones cloróticas como se muestra en la figura 3. También es posible observar que los síntomas en foliolos presenten un halo clorótico más externo en el borde de la lesión siendo más evidente en lesiones ocasionadas por CiLV-N (Marques *et al*., 2010).

Figura 3. Lesiones foliares ocasionadas por CiLV-C en naranja dulce

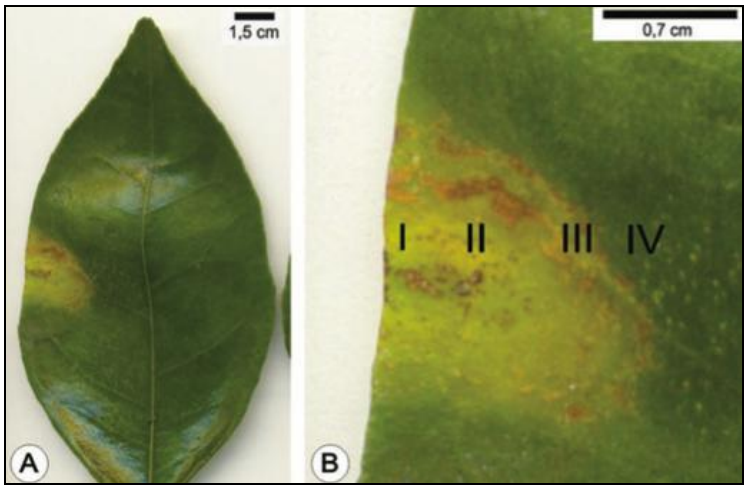
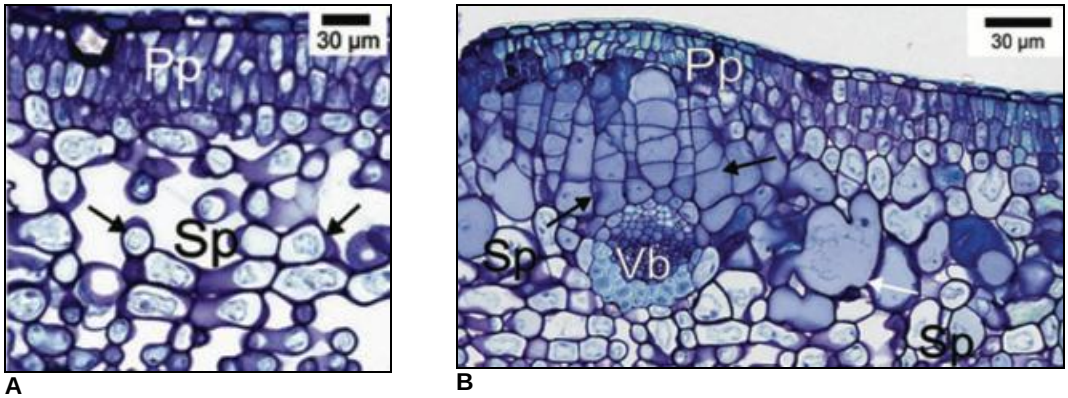


Fig. 3. A: Lesión de foliar ocasionada por CiLV-C. B: Detalle de la lesión observada en la figura 3A en donde se muestran sus distintas áreas o niveles. Fuente: Marques *et al*., 2010. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 82(2): 501-511.

En el borde de una lesión madura, en el halo clorótico más externo, las células del mesófilo se observan plasmolizadas como se muestra en la figura 4A. La lesión causada por CiLV-C aumenta el grosor de la lámina foliar debido a una intensa actividad de hiperplasia e hipertrofia de células del parénquima esponjoso, como se indica en la figura 4B mediante flechas negras y blancas, respectivamente. La imagen consignada en la figura 4B corresponden a la sección II de la figura 3B (Marques *et al*., 2010).

Figura 4. Morfo-anatomía de lesiones ocasionadas por CiLV-C

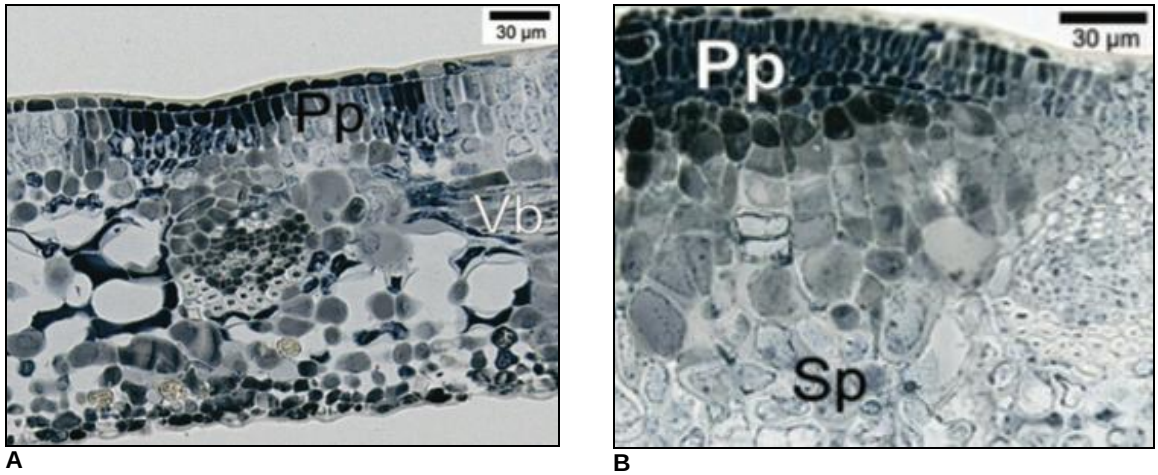


A B

Fig. 4. A: Células del mesófilo plasmolizadas. B: Hiperplasia (flechas negras) e hipertrofia (flechas blancas) del parénquima esponjoso. Pp: Parénquima en empalizada; Sp: Parénquima esponjoso; Vb: Haz vascular. Fuente: Marques *et al.*, 2010. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 82(2): 501-511.

La figura 5 muestra la acumulación de compuestos lipídicos en células del mesófilo infectadas con CiLV-C.

Figura 5. Acumulación de compuestos lipídicos en células de foliolos afectados con CiLV-C



A B

Fig. 5. A y B: El contenido de lípidos se puede apreciar en la región negra. Pp: Parénquima en empalizada; Sp: Parénquima esponjoso; Vb: Haz vascular. Fuente: Marques *et al.*, 2010. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 82(2): 501-511.

Las lesiones en frutos ocasionadas por CiLV-C inician como una mancha rojiza en el pericarpio, rodeada por un halo clorótico moderado. A medida que la lesión progresa cambia. En el estado inicial se observa un centro necrótico seguido de un halo intermedio de color verde pálido rodeado por un halo necrótico, que a su vez es rodeado por un halo clorótico, figura 6. En lesiones causadas por CiLV-C se presenta un halo adicional lo cual da como resultado lesiones de mayor tamaño. Las lesiones más longevas presentan una depresión o área cóncava en la región central sobre la superficie de la fruta. Así mismo, análisis histológicos de estados avanzados de este tipo de lesión, han indicado que alteraciones en el epicarpio y mesocarpio ocurren en infecciones causadas por CiLV-C (Marques *et al*., 2010).

Figura 6. Lesiones en fruto de naranja dulce ocasionadas por CiLV-C

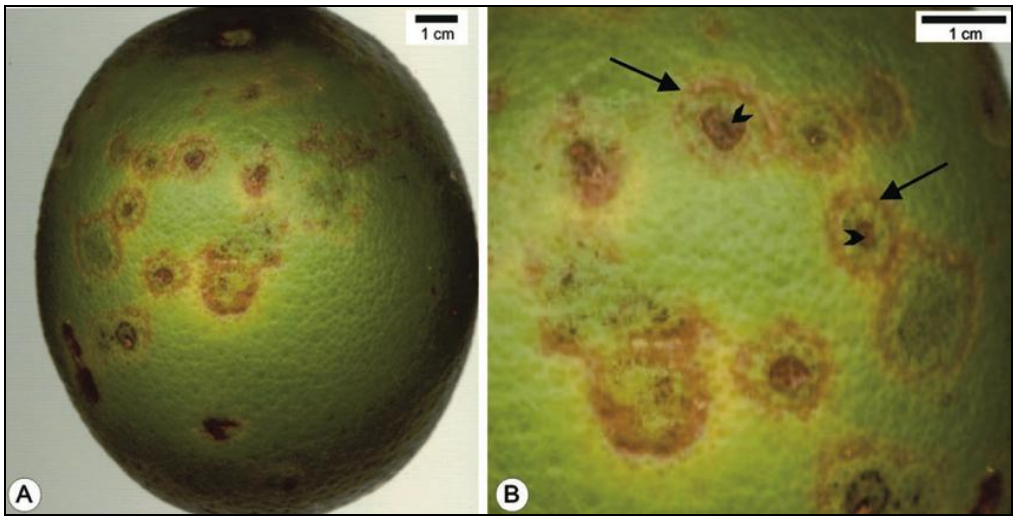
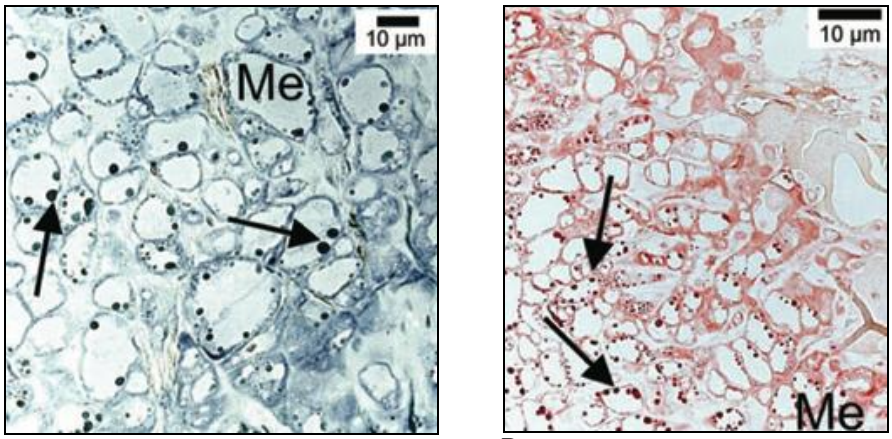


Fig. 6. A: Fruto de naranja con lesiones múltiples ocasionadas por CiLV-C. B: Detalle de la lesión en donde se observa un área cóncava en la región central (cabeza de flechas) y un halo necrótico externo (flechas). Fuente: Marques *et al*., 2010. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 82(2): 501-511.

A nivel histológico se observa que en el centro de las lesiones en frutos hay células que acumulan compuestos lipídicos que están rodeadas por una capa de células que acumulan pequeñas cantidades de lípidos y proteínas como se muestra en la figura 7 (Marques *et al*., 2010).

Figura 7. Acumulación de lípidos y proteínas en células de frutos afectados por CiLV-C

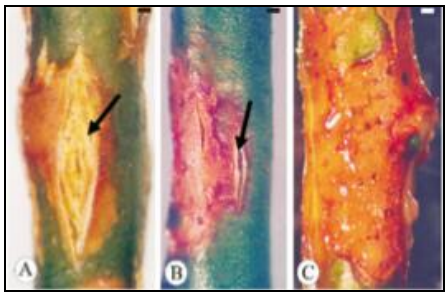


A B

Fig. 7. A: Gotas de lípidos. B: Gotas de proteínas. Me: Mesocarpio. Fuente: Marques *et al*., 2010. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 82(2): 501-511.

En ramas se observan dos tipos principales de lesión producidas por CiLV-C: necróticas, formando pústulas con aberturas longitudinales en la corteza de las ramas, como se puede apreciar en la figura 8A, necróticas cóncavas que pueden presentarse con aberturas (hendiduras) o sin estas, como se muestra en las figuras 8B y 8C, respectivamente (Marques *et al*., 2007).

Figura 8. Lesiones en ramas de naranja dulce ocasionadas por CiLV-C



Fuente: Marques *et al*., 2007 Pesq. agropec. bras., Brasília, v.42, n.11, p.1531-1536.

Las lesiones tipo pústula con aberturas longitudinales son, en general, las más frecuentes. Estas lesiones presentan una coloración marrón oscura y las regiones adyacentes pueden ser clorofiladas y de color verde pálido. Cuando estas regiones coalescen con otras del mismo tipo o cuando estas lesiones adquieren un tamaño mayor, acaban por circundar todo el perímetro de la rama (Marques *et al*., 2007).

La transmisión experimental exitosa de CiLV-C a plantas herbáceas se logró mediante inoculación mecánica a *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., *C. quinoa* Willd. y *Gomphrena globosa* L. (Colariccio *et al*., 1995) y la transmisión por ácaros fue realizada en *Solanum violaefolium* Schott. y *Phaseolus vulgaris* L., (Groot *et al*., 2006; Rodrigues *et al*., 2005) e *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Malvaviscus arboreus* Cav., *Grevillea robusta* A. Cunn., y *Bixa orellana* (Nunes *et al*., 2012) bajo condiciones experimentales. El primer reporte de infección natural de CiLV-C fue realizado en Colombia sobre *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. (León *et al*., 2008). Esta planta es utilizada como cerca viva aledaña a cultivos de cítricos. Todos los estados activos de *Brevipalpus* spp*.*, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto, pueden adquirir e inocular el virus de manera circulativa no propagativa, el cual no es transmitido por vía transovárica (Chagas *et al*., 1984; Novelli *et al*., 2005; Bastianel *et al*., 2010).

2.2.2 Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2).

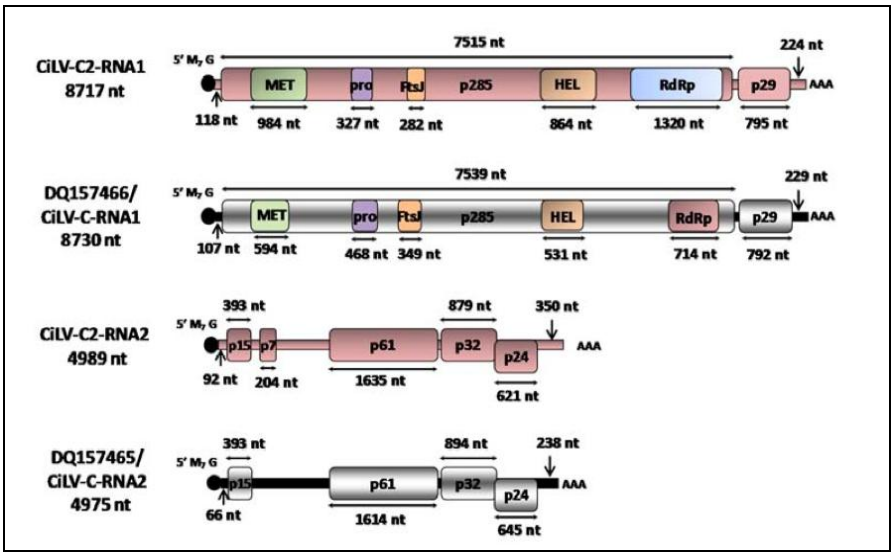
CiLV-C2 es un miembro del género *Cilevirus* con características morfológicas y estructurales similares a las de CiLV-C. El genoma CiLV-C2 tiene 13706 nt de longitud, es bipartita y está compuesto por un RNA 1 de 8717 nt y un RNA 2 de 4989 nt. Ambos RNAs tienen en el extremo terminal 3’ una cola poli (A) (Roy *et al*., 2013a). De igual forma, la organización del genoma de CiLV-C2 es similar a la de CiLV-C, el RNA 1 de CiLV-C2 tiene dos ORFs, mientras que el RNA 2 contiene cinco ORFs.

El ORF 1 del RNA 1 inicia en la posición nucleotídica 119 y termina en la posición 7633, esta región codifica una poliproteína larga (p285) con cinco dominios o regiones. El primer dominio denominado MTR, va del nucleótido 503 al 1486 (328 aa), y el tercer dominio nombrado rRNA FtsJ-MTR, del nucleótido 2975 al 3256 (94 aa), estos dominios están involucrados en el *mRNA capping* en CiLV-C y otros géneros de virus RNA de cadena sencilla con sentido positivo. El segundo dominio de la p285 es similar a una cisteína proteasa (C-Pro), nucleótidos 2174 al 2500 (109 aa). El cuarto y quinto dominio del ORF 1, son una Helicasa (Hel) viral de la súper familia 1, nucleótidos 4757 al 5620 (288 aa) y una RNA polimerasa dependiente del RNA (RdRp), nucleótidos 6257 al 7576 (440 aa) miembro de la súper familia RdRp_2, las cuales desempeñan múltiples funciones en las distintas etapas de la replicación del virus (Hull, 2009; Roy *et al*., 2013a). El ORF 1 de CiLV-C2 tiene un máximo de identidad de nucleótidos y de aminoácidos de ~60% con relación al ORF 1 de aislamientos de CiLV-C. Los dominios conservados MTR, C-Pro, FtsJ-MTR, Hel, y RdRp, tienen porcentajes de identidad de secuencias de aminoácidos del 73, 68, 55, 61, y 75 al 77%, respectivamente, con relación a secuencias de CiLV-C de Brasil y Panamá. El ORF 2 del RNA 1 de CiLV-C2 codifica una proteína putativa de la cápside o cubierta proteica (CP) de 264 aa (p29); es decir, 1 aa más larga que la correspondiente proteína de CiLV-C. El gen putativo de la cubierta proteica-CPG de CiLV-C2 tiene sólo 47 al 48% de identidad de secuencia de nucleótidos y 33% de identidad de secuencia de aminoácidos con relación al CPG de aislamientos de CiLV-C (Roy *et al*., 2013a).

Los cinco ORFs del RNA 2 de CiLV-C2 codifican cinco proteínas hipotéticas con masas moleculares de 15, 7, 61, 32, y 24 kDa, respectivamente, similares a las codificadas por CiLV-C. No obstante, el pequeño ORF que codifica para la proteína hipotética (p7) no se encuentra presente en el RNA 2 de CiLV-C. La traducción de p7, ORF 2 RNA 2 de CiLV-C2, se origina en el nucleótido 645 y contiene un dominio transmembranal putativo entre los nucleótidos 762 y 830. Después de una región no traducible (UTR) intermedia de 643 nt, se inicia la

traducción del ORF 3 del RNA 2 de CiLV-C2 específicamente en el nucleótido 1493, el cual codifica una proteína de 61 kDa. Una señal de clivaje de péptidos fue encontrado en la secuencia de aminoácidos del ORF 3 entre los nucleótidos 1493 al 1546; además, también fue identificado un dominio transmembranal putativo entre los nucleótidos 2903 al 2971. La longitud total del ORF 4 es de 879 nt, el ORF 4 es el único ORF en el RNA 2 que tiene un dominio de movimiento (MP) conservado similar al de la súper familia 3A/RNA2 de MPs de varios virus RNA de cadena sencilla con sentido positivo. El ORF 5 contiene 621 nt y codifica una proteína de 24 kDa (p24), contiene además cuatro dominios transmembranales putativos en los nucleótidos 4148 al 4201, 4259 - 4327, 4346 - 4405 y 4463 al 4522. Los ORFs 1, 3, 4 y 5 del RNA 2 de CiLV-C2 tienen porcentajes máximos de identidad de secuencia de aminoácidos del 14, 30, 49 al 51, y 60%, respectivamente, con relación a secuencias de CiLV-C. Ambas regiones no traducibles (UTRs) en el 5' de CiLV-C2 fueron más largas que las regiones (UTRs) del 5' de aislamientos de CiLV-C. Alineamiento de secuencias de las regiones (UTRs) 5' del RNA 1 y del RNA 2 de CiLV-C2 no presentaron ninguna secuencia conservada de más de cuatro nucleótidos. Sin embargo, las secuencias de nucleótidos del RNA 1 y el RNA 2 de CiLV-C2 en el extremo no traducible (UTRs) 3' fueron similares entre sí. La región no codificante del RNA 1 tiene una longitud de 224 nt y la del RNA 2 350 nt (Roy *et al*., 2013a). La comparación entre la estructura y organización de los genomas de CiLV-C2 y CiLV-C se muestra en la figura 9.

Figura 9. Esquema comparativo de la estructura y organización del genoma de CiLV-C2 y CiLV-C



Fuente: Roy *et al*., 2013a. Phytopathology Vol. 103, No. 5:488-500.

Los síntomas y alteraciones morfo-anatómicas producidas por CiLV-C2 son similares a las causadas por CiLV-C. Las lesiones ocasionadas por CiLV-C2 sobre los distintos tejidos se pueden observar en las figuras 10 y 11.

Figura 10. Lesiones en foliolos y ramas ocasionadas por CiLV-C2

A

B

Fig. 10. A: Lesiones en foliolos ocasionadas por CiLV-C2. B: Lesiones en ramas ocasionadas por CiLV-C2. Fuente: Roy *et al*., 2013a. Phytopathology Vol. 103, No. 5:488-500.

Figura 11. Lesiones en fruto ocasionadas por CiLV-C2

Fuente: Roy *et al*., 2013a. Phytopathology Vol. 103, No. 5:488-500.

CiLV-C2 es transmitido por ácaros del género *Brevipalpus*, principalmente por *B. phoenicis* (Geijkes). CiLV-C2 es un nuevo miembro del género *Cilevirus* y en la actualidad está únicamente reportado en Colombia infectando especies del género *Citrus* y la especie *Swinglea glutinosa* (Roy *et al*., 2013a).

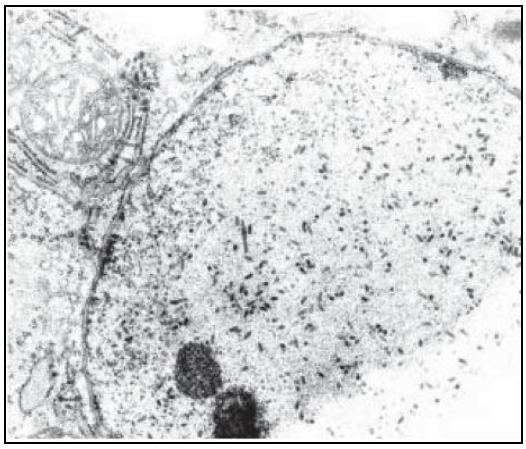
2.2.3 Citrus leprosis virus nuclear type (CiLV-N).

CiLV-N es un posible miembro del género *Dichorhavirus* (*Dichorhabdovirus*) donde Orchid fleck virus (OFV) es la especie tipo (Dietzgen *et al*., 2014; Peng *et al*., 2013; Roy *et al*., 2013c).

CiLV-N es un virus de partículas cortas baciliformes de 40-50 nm de ancho y de 100-110 nm de longitud, desprovistas de membrana. Estas partículas se puede encontrar en el núcleo y el citoplasma usualmente asociadas con membranas (Kitajima *et al*., 1972). En el núcleo de células infectadas se observan viroplasmas o sitios de replicación como se muestra en la figura 12. CiLV-N es transmitido por *Brevipalpus* spp. de manera persistente y propagativa, siendo posiblemente *B.*

californicus Banks, 1904 su principal vector (Dietzgen *et al*., 2014). En el caso de OFV, *B. californicus* requiere de un periodo de acceso para inoculación (IAP) mínimo de 30 minutos para su transmisión. Estos ácaros tienen la capacidad de transmitir OFV después de pasar un periodo de latencia de tres semanas sobre un hospedante resistente al virus (Kondo *et al*., 2003). OFV es transmitido después que los ácaros han mudado, lo cual sugiere que el virus es circulativo, proporcionando evidencia adicional de transmisión persistente. No obstante, los virus baciliformes de tipo nuclear como CiLV-N no son transmitidos mediante vía transovárica (Kubo *et al*., 2011; Dietzgen *et al*., 2014).

Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de células infectadas con CiLV-N

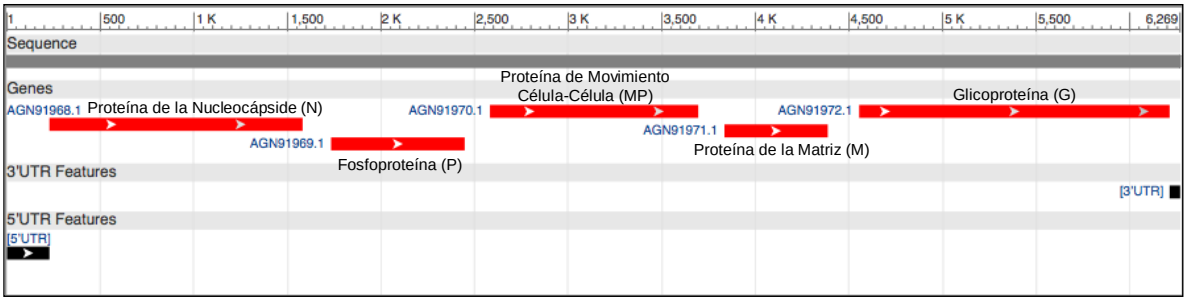


Fuente: Bastianel *et al*., 2006. *Summa Phytopathologica.* V.32, n.3, p.211- 220.

El genoma bipartita de un aislamiento mexicano de CiLV-N fue recientemente secuenciado. El RNA 1 de CiLV-N tiene una longitud de 6268 nt y el RNA 2 de 5847 nt, ambos RNAs tienen en el terminal 3’ una cola poli (A). El RNA 1 contiene cinco ORFs, el ORF 1 codifica la proteína de la nucleocápside (N), mientras que el ORF 5 codifica una glicoproteína (G) (Kondo *et al*., 2006). El ORF 2, ORF 3 y ORF 4 codifican proteínas putativas con funciones conocidas, el ORF 2 codifica una fosfoproteína (P), el ORF 3 codifica una proteína de movimiento célula a célula y el

ORF 4 codifica una proteína de la matriz (M) (Peng *et al*., 2013) como se indica en la figura 13.

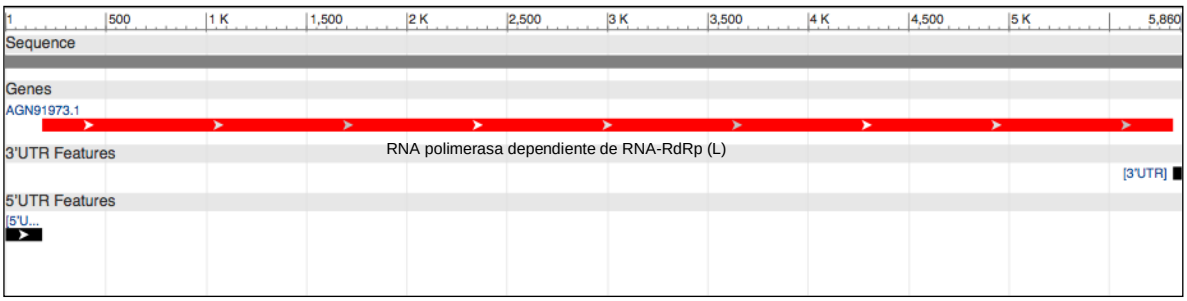
Figura 13. Esquema de la estructura y organización genómica del RNA 1 de CiLV-N



Fuente: GenBank® Graphics (KF209275.2)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF209275.2?report=graph&log$=seqview

El RNA 2 de CiLV-N contiene sólo un ORF, que constituye el módulo de replicación, el cual codifica la RNA polimerasa dependiente de RNA-RdRp (L) (Roy *et al*., 2013c), como se visualiza en la figura 14.

Figura 14. Esquema de la estructura y organización genómica del RNA 2 de CiLV-N

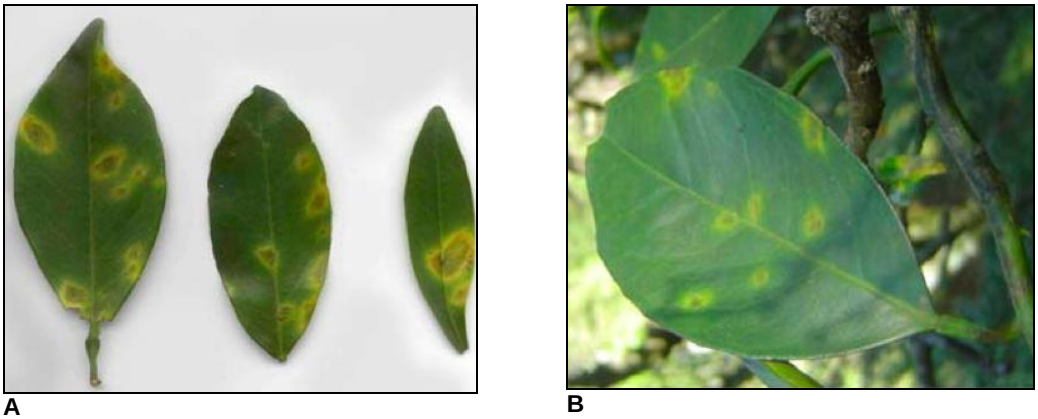


Fuente: GenBank® Graphics (KF209276.1)
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF209276.1?report=graph&log$=seqview

El porcentaje de identidad entre secuencias de los ORFs del RNA 1 y RNA 2 de CiLV-N oscila entre 90% y 91%, nucleótidos, y 93% y 98%, aminoácidos, con relación a las secuencias de OFV GenBank® AB244417 y AB516442, RNA 1, y Genbank® AB244418 y AB516441 para el RNA 2, respectivamente. De acuerdo a lo anterior, CiLV-N es posiblemente una raza o cepa de OFV que infecta cítricos (Roy *et al*., 2013c).

Las alteraciones morfo-anatómicas producidas por CiLV-N sobre los distintos tejidos son similares a las inducidas por CiLV-C. Con la diferencia que las lesiones en foliolos ocasionadas por CiLV-N son aparentemente más pequeñas y se presentan en mayor cantidad en comparación con las lesiones producidas por CiLV-C, tal y como se observa en la figura 15.

Figura 15. Lesiones foliares ocasionadas por CiLV-N en naranja dulce



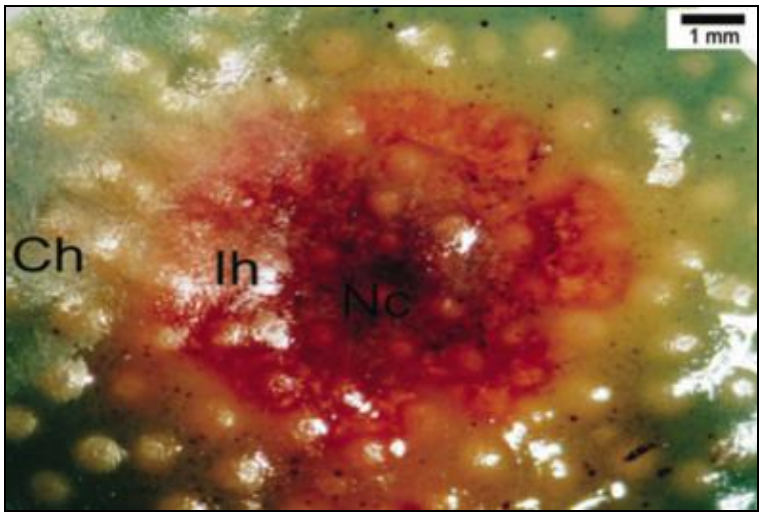
A **B**

Fig. 15. A y B: Lesiones foliares ocasionadas por CiLV-N. Fuente: Bastianel *et al*., 2010. Plant Disease 94 (3):284-292.

De igual manera, tanto en foliolos como frutos, las lesiones causadas por CiLV-N se presentan en mayor número. La estructura de una lesión madura o más longeva ocasionada por CiLV-N es similar en foliolos y frutos, debido que se puede observar la presencia de tres regiones distintas: un centro necrótico, un

halo intermedio de color naranja y un halo clorótico más externo (Marques *et al*., 2010), figura 16.

Figura 16. Detalle de una lesión ocasionada por CiLV-N en fruto

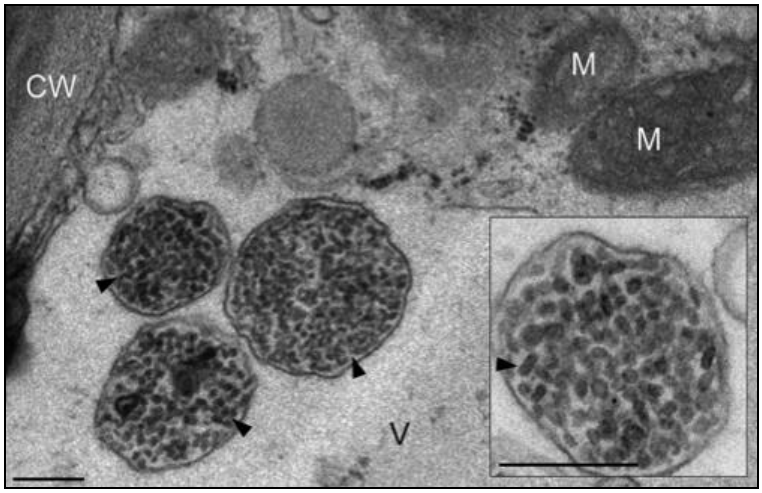


Nc – centro necrótico; Ih – halo intermedio; Ch – halo clorótico. Fuente: Marques *et al*., 2010. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 82(2): 501-511.

2.2.4 Hibiscus green spot virus 2 (HGSV 2).

HGSV 2 es la especie tipo del género *Higrevirus*, el cual se encuentra a la espera de ratificación por el *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (Melzer *et al*., 2012b). HGSV 2 fue aislado de *Citrus volkameriana* en Hawaii causando síntomas similares a los de leprosis de los cítricos sobre foliolos y ramas. Este es un virus de partículas baciliformes cortas de ~30 nm por 50 nm asociadas al citoplasma (Melzer *et al*., 2012a) como se muestra en la figura 17.

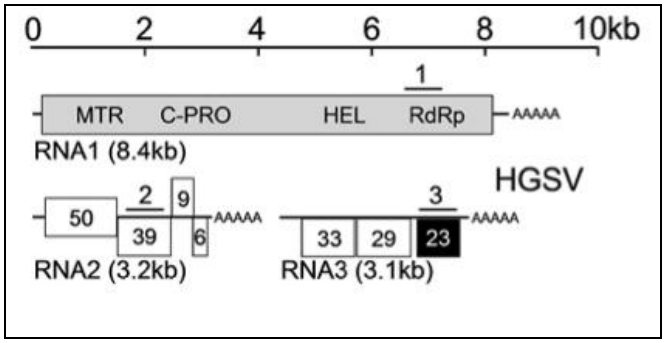
Figura 17. Microscopía electrónica de transmisión de células infectadas con HGSV 2



CW: pared celular; M: mitocondria; V: vacuola. Barra = 250 nm.
Fuente: Melzer *et al.*, 2012. Phytopathology Vol. 102, No. 1. 122-127.

HGSV 2 es un virus tripartita, el RNA 1 tiene una longitud de 8354 nt, excluyendo la cola poli (A), y posee un ORF largo que codifica una proteína de 273 kDa (2645 aa). Esta proteína putativa contiene los dominios metiltransferasa (aa 129 al 533), cisteína proteasa (aa 717 al 829), helicasa (aa 1610 al 1896) y RdRp2 (aa 2126 al 2565) como se visualiza en la figura 18.

Figura 18. Esquema de la estructura y organización del genoma de HGSV 2

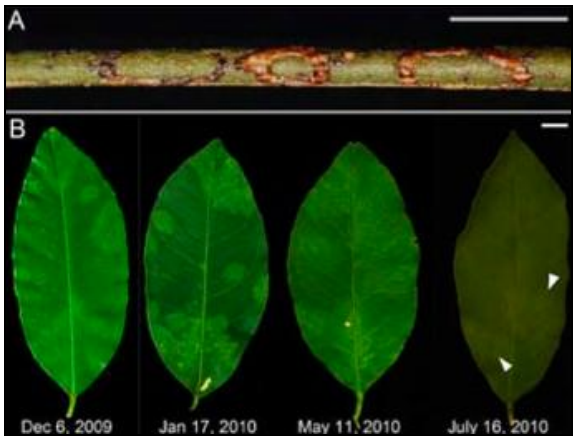


Fuente: Melzer *et al.*, 2012. Phytopathology Vol. 102 No. 1. 122-127

Los dominios metiltransferasa, helicasa y RdRp tienen un 38, 37, y 48% de identidad, respectivamente, con relación a los mismos dominios del CiLV-C. El RNA 2 tiene una longitud de 3169 nt, excluyendo la cola poli (A), y posee cuatro ORFs los cuales, en sentido 5' a 3', codifican proteínas putativas con pesos moleculares de 50, 39, 9, y 6 kDa, como se muestra en la figura 18. La proteína de 50 kDa no está relacionada con otras proteínas presentes en las bases de datos de proteínas y el GenBank®. Sin embargo, las proteínas de 39, 9 y 6 kDa tienen características similares a las del módulo de movimiento en virus de plantas de triple bloque de genes TGBp1, TGBp2 y TGBp3 (Melzer *et al*., 2012). La proteína de 39 kDa posee siete motivos típicos de las helicasas virales, pero carece de la región característica de residuos cargados positivamente encontrados en el extremo N-terminal de algunos otros TGBp1s. La proteína de 9 kDa contiene dos regiones transmembranales hidrofóbicas y algunos residuos señal de TGBp2. La proteína de 6 kDa posee una región única transmembranal hidrofóbica característica de algunos TGBp3s (Melzer *et al*., 2012). El RNA 3 tiene una longitud de 3113 nt y posee tres ORFs, que codifican proteínas putativas de 33, 29 y 23 kDa como se observa en la figura 18. Las proteínas de 33 y 29 kDa presentan baja identidad con relación a otras secuencias depositadas en las bases de datos de proteínas y el GenBank®. No obstante, la proteína de 23 kDa es un ortólogo de la proteína p24 de CiLV-C, las cuales tienen 26% de identidad (Melzer *et al*., 2012).

Las lesiones ocasionadas por HGSV 2 en *Citrus volkameriana* en Hawaii tienen características similares a las producidas por agentes etiológicos de la leprosis de los cítricos. En ramas se observan lesiones circulares u ovaladas que presentan un ligero levantamiento del tejido y en foliolos se presentan manchas cloróticas las cuales son más prominentes durante los meses más fríos y atenuadas en los meses cálidos como se indica mediante las flechas blancas en la figura 19 (Melzer *et al*., 2012).

Figura 19. Lesiones ocasionadas por HGSV 2 en ramas y foliolos de *Citrus volkameriana*



Fuente: Melzer *et al*., 2012. Phytopathology Vol. 102 No. 1. 122-127. Barra= 1cm

2.3 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE VIRUS ASOCIADOS A LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS

2.3.1 Pruebas inmunoenzimáticas para detección de CiLV-C.

Históricamente la leprosis de los cítricos ha sido diagnosticada visualmente por los síntomas característicos ocasionados por CiLV-C sobre sus hospedantes o mediante la realización de microscopía electrónica de transmisión-TEM (Colariccio *et al*., 1995; Kitajima *et al*., 2003). A pesar de presentar síntomas característicos, la leprosis de los cítricos, puede ser difícil de diferenciar del cancro de los cítricos, causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad *et al*., 2006), por inspectores con menos experiencia, debido a la similitud de ambos síntomas.

Los métodos de diagnóstico basados en serología son sensibles, precisos, confiables, económicos y no requieren de equipos muy costosos, servicios especializados y personal altamente capacitado. La naturaleza inestable de CiLV-

C hace que la producción de anticuerpos a partir de virus purificados sea un proceso complicado (Locali *et al*., 2003). Por lo tanto, la expresión recombinante de la proteína de la cápside en *Escherichia coli* y su posterior purificación ha sido un proceso alternativo para el desarrollo de anticuerpos para detección de CiLV-C, considerando que la secuencia del genoma completo de mencionado virus se encuentra disponible en el GenBank® (Locali-Fabris *et al*., 2006; Pascon *et al*., 2006). De tal manera que la expresión *in vitro* de la proteína p29 de CiLV-C seguida por la producción de anticuerpos son utilizados en la actualidad para el diagnóstico de la leprosis de los cítricos ocasionada por CiLV-C mediante técnicas inmunoenzimáticas como: PTA-ELISA (*Plate Trapped Antigen-Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), *Western Blot*, *Tissue Blot*, Inmunolocalización *in situ* (*in situ immunolocalization*) e *immunogold labeling*. A través de la aplicación sistemática de los métodos anteriores se logró desarrollar un anticuerpo policlonal para la detección de la proteína p29 del CiLV-C, el cual es altamente específico, no reacciona inespecíficamente con plantas de cítricos sanas y plantas infectadas con otros virus citoplasmáticos y nucleares del mismo grupo transmitidos por ácaros del género *Brevipalpus* (VTBr) (Calegario *et al*., 2013). De igual manera, Choudhary *et al*., 2013 también utilizaron el gen p29 del genoma de CiLV-C pero optimizado a nivel de la secuencia de aminoácidos (codones) para expresión en *Escherichia coli* y síntesis *in vitro*. El anticuerpo policlonal así generado, CREC-13 IgG, fue empleado exitosamente en la detección de CiLV-C en tejido infectado y sintomático mediante DAS-ELISA (*Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), ELISA indirecta y DBIA (Dot-Blot Immunoassay) (Choudhary *et al*., 2013).

2.3.2 Pruebas para detección de agentes etiológicos de la leprosis de los cítricos mediante RT-PCR.

En el año 2003 parte del genoma de CiLV-C fue secuenciado generando así la primera herramienta de detección molecular para este agente causal de la leprosis de los cítricos (Locali *et al*., 2003). Durante esa investigación se evaluaron

iniciadores específicos diseñados para amplificar regiones genómicas de CiLV-C que codifican la proteína putativa de movimiento (*MP*) y la proteína putativa de la replicasa (*Rep*). En las tablas 1 y 2 se observan las secuencias de los iniciadores inicialmente reportados que fueron diseñados a partir de los genes putativos *MP* y *Rep*, respectivamente, para detección de CiLV-C mediante RT-PCR.

Tabla 1. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del gen *MP* de CiLV-C

Nombre del Iniciador	Secuencia 5' – 3'	Fragmento amplificado
MPF	GCGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC	339 pb
MPR	TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT	

Fuente: Locali *et al*., 2003

Los iniciadores consignados en la tabla 1 amplifican una región de 339 pb del gen putativo de la proteína de movimiento (*MP*) de CiLV-C.

Tabla 2. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del gen *Rep* de CiLV-C

Nombre del iniciador	Secuencia 5' – 3'	Fragmento amplificado
RepF	GATACGGGACGCATAACA	402 pb
RepR	TTCTGGCTCAACATCTGG	

Fuente: Locali *et al*., 2003

Los iniciadores consignados en la tabla 2 amplifican una región de 402 pb del gen putativo de la proteína de la replicasa (*Rep*) de CiLV-C.

La secuenciación completa del genoma de CiLV-C (Locali-Fabris *et al*., 2006; Pascon *et al*., 2006) también permitió diseñar otras parejas de iniciadores específicos a partir de los distintos genes ubicados en el RNA 1 y RNA 2 de CiLV-C.

Luego de la identificación y caracterización de CiLV-C2, a partir de la secuenciación completa de su genoma (Roy *et al*., 2013a) se diseñaron y evaluaron nuevos iniciadores específicos para detección de CiLV-C2. Lo cual ha permitido que una pareja de iniciadores diseñados para amplificar el gen putativo

de la cubierta proteica (*CP*) de CiLV-C2 mediante RT-PCR fuera utilizada para el diagnóstico de la enfermedad en Colombia. Es importante resaltar que en la actualidad Colombia es el único país en el cual se ha reportado CiLV-C2 infectando hospedantes del género *Citrus* y la especie *Swinglea glutinosa* (Roy *et al*., 2013a) y tal vez, este virus sea el principal agente causal de la leprosis de los cítricos en el país. La secuencia de la pareja de iniciadores específicos utilizados para amplificar el gen putativo de la *CP* de CiLV-C2 se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de iniciadores diseñados para amplificar el gen *CP* de CiLV-C2

Nombre del iniciador	Secuencia 5' – 3'	Fragmento amplificado
CiLV-C2-CPG-F	ATGAGTAACATTGTGTCGTTTTCGTTGT	795 pb
CiLV-C2-CPG-R	TCACTCTTCCTGTTCATCAACCTGTT	

Fuente: Roy *et al*., 2013a

Los iniciadores consignados en la tabla 3 generan un producto amplificado de 795 pb del gen putativo de la proteína de la cubierta proteica (*CP*) de CiLV-C2.

Recientemente fue reportado Citrus leprosis virus nuclear type (CiLV-N) en Colombia (Roy *et al*., 2014). Los iniciadores específicos para amplificar una región parcial de 681 pb del gen de la nucleocápside (N) y del gen completo (552 pb) que codifica para la proteína putativa de la matriz (M) de CiLV-N se observan en las tablas 4 y 5, respectivamente.

Tabla 4. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del gen N de CiLV-N

Nombre del iniciador	Secuencia 5' – 3'	Fragmento amplificado
CiLV-N-NPF	ATGGCTAACCCAAGTGAGATCGATTA	681 pb
CiLV-N-NPR	AGTTGCCTTGAGATCATCACATTGGT	

Fuente: Roy *et al*., 2014

Tabla 5. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del gen M de CiLV-N

Nombre del iniciador	Secuencia 5' – 3'	Fragmento amplificado
CiLV-N-MF	ATGTCTAAACAGATTAATATGTGCACTGTG	552 pb
CiLV-N-MR	CTAACCACTGGGTCCCGC	

Fuente: Roy *et al.*, 2014

En forma similar, Hibiscus green spot virus 2 (HGSV 2) el cual infecta *Citrus volkameriana* en Hawaii y ocasiona síntomas similares a los de leprosis de los cítricos sobre foliolos y ramas, es detectable haciendo uso de una pareja de iniciadores denominados 896/897 que tienen como blanco una región de nucleótidos en la posición 4940 a la 5137 nt del dominio de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) RNA 1 del HGSV 2 (Melzer *et al*., 2012a). La secuencia de los iniciadores específicos utilizados para la detección de HGSV 2 mediante RT-PCR se consignan en la tabla 6.

Tabla 6. Secuencia de iniciadores diseñados a partir del dominio RdRp del RNA 1 de HGSV 2

Nombre del iniciador	Secuencia 5' – 3'	Fragmento amplificado
896	GCGACGGGAAAAATACTGAAG	198 pb
897	CGCAGTCACAGACGTAAAC	

Fuente: Melzer *et al.*, 2012a

Los iniciadores consignados en la tabla 6 amplifican una región de 198 pb del dominio RdRp del RNA 1 de HGSV 2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN Y TIEMPO

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias en la Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá, entre los años 2011 y 2014.

3.2 METODOLOGÍA

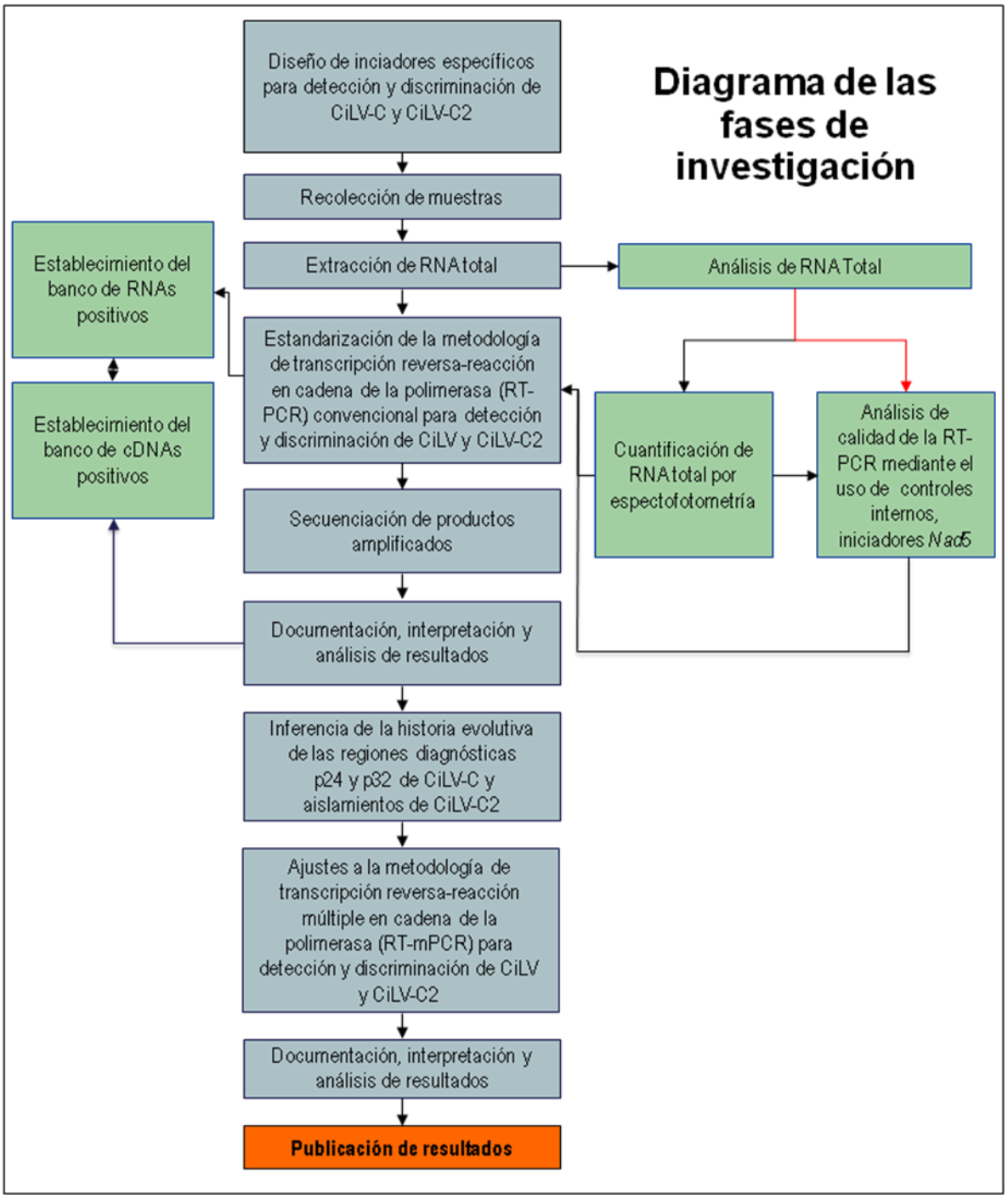
Con el fin de determinar un mecanismo preciso que permitiera la solución del problema planteado se diseñó un esquema de trabajo en donde las distintas fases de la investigación se observan en la figura 20.

3.2.1 Diseño de iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

Dos parejas de iniciadores específicos fueron diseñados, CiL-p32-F/CiL-p32-R y p24-T2-F/p24-T2-R, la primera pareja sobre el gen p32-MP de CiLV-C2 y CiLV-C, y la segunda pareja que abarca la región 3' final del gen p24 y una parte de la región 3' no traducible (UTR) del RNA 2 de CiLV-C2.

Los genes p32-MP y p24 se encuentran ubicados en el RNA 2. Por lo tanto, secuencias identificadas con los códigos de accesión NC_008170.1, DQ388513.1 y DQ157465.1, del RNA 2 de CiLV-C y la secuencia JX000025.1 del RNA 2 de CiLV-C2 fueron descargadas del *GenBank*® del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD) y alineadas con el programa MEGA® 5.2.2 (Tamura *et al*., 2011) mediante el algoritmo MUSCLE® (*Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation*) (Robert, 2004).

Figura 20. Diagrama de las fases de la investigación



Los iniciadores generados en esta investigación fueron diseñados utilizando programas y algoritmos disponibles en la Web: Primer3® (Rozen & Skaletsky, 2000), BLASTn® (Altschul *et al*., 1990), y mfold® (Zuker, 2003). Los valores mínimos, óptimos y máximos de los parámetros usados en el programa Primer3® para selección de los iniciadores óptimos fueron: temperatura de disociación (*melting*) de los iniciadores (PrimerT_m) 57, 60, y 60°C, respectivamente, porcentaje de GC% de los iniciadores 45, 50, y 55%, respectivamente. Se seleccionó el valor más bajo posible para un máximo de auto-complementariedad (*maximun self complementarity*) y un valor de cero (0) para un máximo de auto-complementariedad en el extremo 3' del iniciador (*maximum 3' self complementarity*), el máximo número Poli-X (*maximun poly-X*) fue 3, el resto de los parámetros fueron mantenidos por defecto (Arif y Ochoa-Corona, 2013). Los iniciadores fueron sintetizados por Invitrogen® (Carlsbad, CA, USA) a una escala de 50 nM.

3.2.2 Recolección de muestras de tejido vegetal.

Muestras de foliolos, tallos y frutos de naranja (*Citrus sinensis*) con síntomas de leprosis de los cítricos fueron colectadas en los departamentos de Meta y Casanare, con el apoyo de funcionarios de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica y funcionarios del Instituto Colombiano Agropecuario-ICA de las seccionales de Meta y Casanare. En cada sitio de muestreo se tomaron seis muestras, para un total de 36 muestras en los dos departamentos. La georeferenciación de los puntos muestreados se presenta en la tabla 7.

Las muestras fueron empacadas a temperatura ambiente entre capas de papel periódico al interior de bolsas plásticas perforadas y se diligenciaron los datos

consignados en el formato para recolección de muestras el cual se observa en la figura 21.

Tabla 7. Georeferenciación de los sitios muestreados

Posición geográfica	Ubicación	Departamento	Conversión	Número de muestras
N: 05º 13’ 11.5’’ W: 072º 23’ 44.4’’	Yopal	Casanare	5.219861, -72.395667	6
N: 05º 23’ 29.2’’ W: 072º 25’ 33.8’’	Yopal	Casanare	5.391444, -72.426056	6
N: 05º 26’ 17.4’’ W: 072º 16’ 58.5’’	Yopal	Casanare	5.438167, -72.282917	6
N: 04º 03’ 41.8’’ W: 073º 27’ 47.6’’	C.I. La Libertad (Villavicencio)	Meta	4.061611, -73.463222	6
N: 03º 52’ 53.1’’ W: 073º 45’ 44.7’’	Guamal	Meta	3.881417, -73.762417	6
N: 04º 22’ 28.5’’ W: 072º 13’ 37.7’’	C.I. Taluma (Pto/López)	Meta	4.374583, -72.227139	6

Figura 21. Formato para recolección de muestras

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA DETECCIÓN Y DISCRIMINACIÓN DE CiLV-C Y CiLV-C2 EN COLOMBIA

FORMATO PARA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Fecha: ___ ___ ___
DD/ MM/ AA/

Nombre de la Plantación: _____ Departamento: _____ Muestra No.__ __ __ __

Municipio/Ciudad/Vereda: _____ Tipo de Muestra:

Fruto ☐ Hoja/Foliolo ☐ Corteza ☐

Tamaño de la Muestra (Número de Foliolos, Frutos y/o Corteza -Troncos y/o Ramas-): _____

Época del muestreo: Alta precipitación (Tiempo lluvioso) ___ Baja precipitación (Tiempo seco) ___

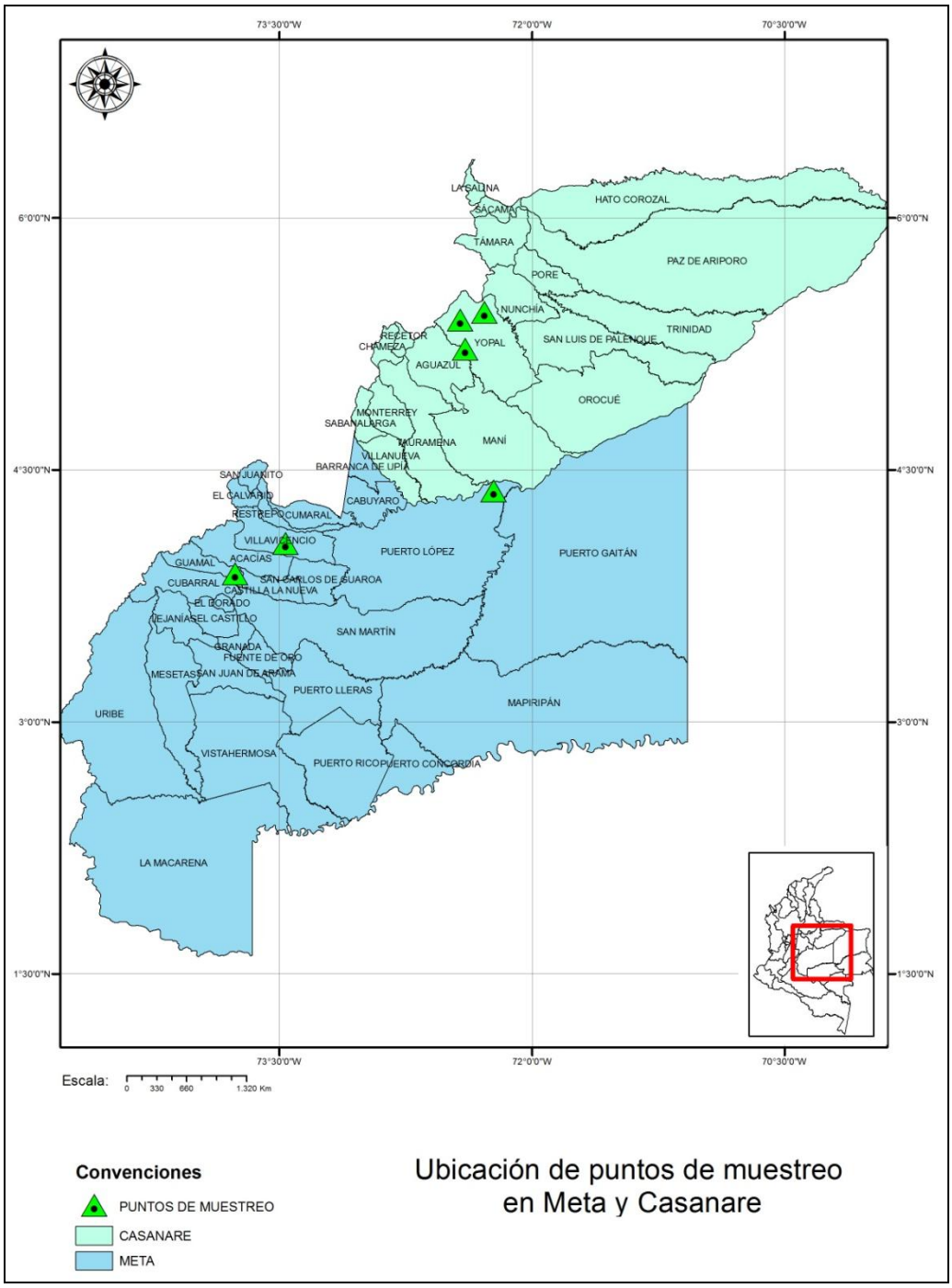
Variedad: _____ Edad del Material: _____

Georeferenciación de la Plantación: _____

Síntomas u Observaciones del Material Recolectado: _____

El mapa con los sitios muestreados en los departamentos de Meta y Casanare se observa en la figura 22.

Figura 22. Mapa de los puntos de recolección de muestras en los departamentos de Meta y Casanare



3.2.3 Extracción de RNA total.

La extracción de RNA total a partir de foliolos, tallos y frutos se realizó con el reactivo TRIzol® Invitrogen® No. Cat. 15596-026, siguiendo las instrucciones de la casa comercial, como se observa en el anexo A. El RNA total extraído de cada muestra se cuantificó por duplicado con el espectofotómetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific Inc., Worcester, MA). La pureza del producto se observó en una relación de absorbancia A260/280, para determinar la contaminación por proteínas durante el proceso de extracción.

3.2.4 Estandarización de la metodología de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) convencional para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

Como control interno de la RT-PCR se amplificó un fragmento de 181 pb que codifica una región de la proteína *NADH dehydrogenase* 5 (*Nad*5) mitocondrial, la secuencia de los iniciadores universales utilizados como controles internos de reacción se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Secuencia de iniciadores universales *Nad*5 como controles internos de RT-PCR

Nombre del iniciador	Secuencia 5' – 3'	Fragmento amplificado
nad5-sentido	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT	181 pb
nad5-antisentido	CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA	

Fuente: Menzel *et al.*, 2002

Se realizó una RT-PCR en dos pasos, la transcripción reversa (RT) fue realizada utilizando 2 μL de RNA total (50 ng/μL), 1,0 μL de iniciador hexameros (*random hexamers*) (50 μM), 1,0 μL de mezcla de dNTPs (100 mM) y agua ultra pura-grado

molecular adicionada hasta un volumen final de 12,5 μL. Las muestras fueron denaturadas a 70 ºC durante 5 minutos y puestas en hielo. Posteriormente una mezcla de 4 μL de tampón (*buffer*) RT 5X (*5X First-Strand Buffer* [250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$]), 2 μL de DTT (0,1 M), 0,5 μL de RNaseOUT™ (40 U/μL) (Invitrogen®), 1,0 μL de enzima M-MLV (200 U/μL) No. Cat. 28025-013 de Invitrogen® fue adicionada a la primera mezcla. La reacción fue incubada a 37 ºC durante 90 minutos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consistió en 2 μL de cDNA, 2,5 μL de tampón (*buffer*) PCR 10X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 0,9 μL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,5 μL de mezcla de dNTPs (100 mM), 0,3 μL de cada iniciador específico (10 μM), 0,2 μL de Taq-DNA polimerasa (5 U/μL) No. Cat. 11615-010 de Invitrogen® y agua ultra pura-grado molecular hasta un volumen de 25 μL. Todas las reacciones con sus ciclos de temperatura y tiempos correspondientes se llevaron a cabo en un termociclador (C1000) Bio-Rad®. El programa de PCR, para todas las parejas de iniciadores evaluados en la investigación, consistió de denaturación inicial a 94 ºC durante 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 ºC por 30 segundos (denaturación), 60 ºC por 30 segundos (hibridación de los iniciadores), 72 ºC durante 40 segundos (temperatura de extensión). Un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72 ºC fue adicionado al programa.

Después de la amplificación, 10 μL de producto PCR de cada reacción fueron expuestos a una migración electroforética, a 60V durante 65 minutos, en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (0,5 μg/mL) en tampón (*buffer*) TAE 1X (Tris acetato-EDTA) y visualizados en un documentador de imágenes Bio-Rad® mediante el programa Quantity One® - 4.6.7. La identificación de la longitud de los fragmentos amplificados se hizo con relación a un marcador de extensión o longitud de 100 pb (TrackIt™ Ref. 10488-058) de la casa comercial Invitrogen®.

3.2.5 Secuenciación de productos amplificados.

Dos muestras de cada punto de muestreo fueron analizadas mediante secuenciación. Los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR fueron purificados y secuenciados directamente con iniciadores sentido y antisentido específicos a partir de las muestras colectadas en los departamentos de Meta y Casanare. La purificación de estos fragmentos amplificados se realizó con el producto comercial *PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit de Invitrogen®* No. Cat. K220001. El protocolo de purificación a partir de producto de PCR se observa en el anexo B.

Los productos amplificados y purificados fueron secuenciados en el Core Facilities del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Estatal de Oklahoma (Stillwater, OK, USA). La secuenciación se realizó mediante "*BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*" usando electroforesis capilar y un secuenciador automático de DNA ABI Modelo 3730, con capacidad de secuenciar 800 pb con 99% de exactitud.

3.2.6 Documentación, interpretación y análisis de resultados.

Las secuencias sentido y antisentido de las respectivas regiones amplificadas fueron editadas en la plataforma Geneious® R6.1.7, a partir de los electroferogramas en formato .ab1, con el fin de obtener las secuencias consenso corregidas. Los parámetros de calidad para edición de las secuencias fueron mantenidos por defecto. Posterior a la edición y obtención de las secuencias consensos de las longitudes esperadas, estas fueron analizadas mediante el algoritmo BLASTn (Altschul *et al*., 1990) del NCBI® con el objetivo de verificar la identidad de las secuencias obtenidas en relación a otras secuencias depositadas en el GenBank®.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se estableció un banco de RNAs y cDNAs positivos de CiLV-C y CiLV-C2 para referencia futura y conservación a –80 ºC. Los RNAs y cDNAs fueron conservados según el protocolo descrito en el anexo C.

3.2.7 Inferencia de la historia evolutiva de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2.

Con el fin de estudiar la historia evolutiva de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32, de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2, amplificadas con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R, se realizó un análisis a partir de los métodos de inferencia bayesiana y máxima parsimonia. Se generó una matriz combinada de 15 taxones y 273 nucleótidos a partir de dos regiones parciales de los genes p24 y p32 de virus del género *Cilevirus*. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MEGA® 5.2.2 (Tamura *et al*., 2011) mediante el algoritmo MUSCLE®, aplicando una penalidad de apertura de gap de 500 (*Gap open*) y una extensión de gap de 50 (*Gap extend*), las dos particiones se alinearon de manera independiente.

3.2.7.1 Inferencia Bayesiana.

El modelo de substitución nucleotídica se seleccionó independientemente para cada partición mediante jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) utilizando el Criterio Bayesiano - BIC (*Bayesian information criterion*). El análisis bayesiano se realizó con el programa MrBayes 3 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). Los parámetros del análisis fueron, 2 particiones (gen p32 y gen p24), 2 corridas, 1 cadena fría y 4 calientes, 10.000.000 de generaciones, una frecuencia de muestreo de los árboles (*samplefreq*) cada 100 generaciones y un número de árboles descartados (*sumt burnin*) del 25%. El resto de condiciones incluidas en el análisis fueron las reportadas por jModelTest. El árbol de las regiones diagnósticas (genes) p24 y

p32 resultado del análisis bayesiano fue visualizado mediante el programa FigTree v1.2.2.

3.2.7.2 Máxima Parsimonia.

Se realizó un análisis de máxima parsimonia con el programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002), con una estrategia de búsqueda heurística y de intercambio de ramas TBR (*tree-bisection-reconnection*), se seleccionó un número máximo de árboles (*set max trees*) con un incremento automático de 100 en 100, con adición de secuencias una a una (*stepwise addition*) y al azar con 10 repeticiones. Las inserciones o deleciones de caracteres (*gaps*) fueron tratados como datos faltantes. Los nucleótidos o caracteres se trataron bajo un criterio de no aditividad y se excluyeron los caracteres no informativos. Para los árboles más parsimoniosos (*most parsimonious trees* - MPT) o árboles fundamentales fue calculada la longitud (L), índice de consistencia (CI) e índice de retención (RI). Cuando más de un árbol parsimonioso fue encontrado se realizó un consenso estricto. El soporte de los clados fue estimado con un *bootstrap* (Felsenstein, 1985) de 10.000 réplicas en PAUP.

3.2.8 Ajustes de la metodología de transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

La RT-mPCR se estandarizó en dos pasos, la transcripción reversa (RT) fue realizada utilizando 3 μL de RNA total (50 ng/μL), 1,0 μL de iniciador hexameros (*random hexamers*) (50 μM), 1,0 μL de mezcla de dNTPs (100 mM) y agua ultra pura-grado molecular adicionada hasta un volumen final de 12,5 μL. Las muestras fueron denaturadas a 70 ºC durante 5 minutos y puestas en hielo. Posteriormente una mezcla de 4 μL de tampón (*buffer*) RT 5X (*5X First-Strand Buffer* [250 mM

Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$]), 2 μL de DTT (0,1 M), 0,5 μL de RNaseOUT™ (40 U/μL) Invitrogen®, 1,0 μL de enzima M-MLV (200 U/μL) No. Cat. 28025-013 de Invitrogen®, fue adicionada a la primera mezcla. La reacción fue incubada a 37 ºC durante 90 minutos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consistió en 3 μL de cDNA, 2,5 μL de tampón (*buffer*) PCR 10X (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 1,5 μL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,5 μL de mezcla de dNTPs (100 mM), 0,4 μL de la mezcla de iniciadores [2 μM de los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R (Ochoa-Corona *et al*., 2009 - secuencias no publicadas) y 4 μM de los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R], 0,3 μL de Taq-DNA polimerasa (5 U/μL) No. Cat. 11615-010 de Invitrogen® y agua ultra pura-grado molecular hasta un volumen de 25 μL. Todas las reacciones con sus ciclos de temperatura y tiempos correspondientes se llevaron a cabo en un termociclador (C1000) Bio-Rad®. El programa de PCR consistió de una temperatura de denaturación inicial de 94 ºC durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 ºC por 30 segundos, 58 ºC por 30 segundos, 72 ºC durante 40 segundos. Un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72 ºC fue adicionado al programa.

Después de la amplificación, 12 μL de producto PCR de cada reacción fueron expuestos a una migración electroforética, a 60V durante 65 minutos, en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (0,5 μg/mL) en tampón (*buffer*) TAE 1X (Tris acetato-EDTA) y visualizados en un documentador de imágenes Bio-Rad® mediante el programa Quantity One® - 4.6.7. La identificación de la longitud de los fragmentos amplificados se hizo con relación a un marcador de extensión o longitud de 100 pb (TrackIt™ Ref. 10488-058) de la casa comercial Invitrogen®.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS

4.1.1 Diseño de iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

Una pareja de iniciadores específicos denominados p24-T2-F y p24-T2-R, se diseñó sobre la región terminal 3' al final del gen p24 y una parte de la región 3' UTR en el RNA 2 la cual amplifica una región de 384 pb exclusiva de CiLV-C2. Otra pareja de iniciadores específicos nombrados CiL-p32-F y CiL-p32-R, fue diseñada a partir del gen p32-MP. Estos iniciadores amplifican una región de ~174 pb común a CiLV-C y/o CiLV-C2. Es decir, que tienen la capacidad de detectar coinfecciones de CiLV-C y CiLV-C2; sin embargo, estos iniciadores no discriminan entre una u otra especie. Debido a lo anterior, fue incorporada una tercera pareja de iniciadores específicos, denominados CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R (Ochoa-Corona *et al*., 2009) (secuencias no publicadas), diseñados sobre el gen p15, que amplifican una región de 278 pb exclusiva de CiLV-C.

La tabla 9 muestra la secuencia nucleotídica de los iniciadores específicos diseñados y utilizados en esta investigación para detectar y discriminar CiLV-C y CiLV-C2 mediante transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR). Además se incluye la secuencia de los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R.

Tabla 9. Secuencia de iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2

Nombre del iniciador	Secuencia 5' – 3'	Producto amplificado	Virus detectado (s)
p24-T2-F p24-T2-R	AAAAGTTCCCACTCATCC CTGATCCCAGCTAGAAGA	384 pb	CiLV-C2
Diseñados en la investigación			
CiL-p32-F CiL-p32-R	CCATTCCGAATGAGGA ACACCTTATAAAAGGATGGTC	~174 pb	CiLV-C y/o CiLV-C2
Diseñados en la investigación			
CiLV-C-p15F CiLV-C-p15R	TTTCTGGCAACAGCACGA CGACCACCTTGAATCTACC	278 pb	CiLV-C

Fuente: Ochoa-Corona *et al.*, 2009 (secuencias no publicadas)

Además de los valores asignados al programa Primer3® durante el diseño de los iniciadores específicos ya descritos en el numeral 3.2.1, el criterio final para la selección de iniciadores óptimos tuvo como fundamento los parámetros termodinámicos generados con el programa mfold®.

Los valores de energía óptimos expresados en ΔG (kcal/mol) de los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R en un gráfico de puntos (*Plot File*) calculados con mfold® tomando como referencia una temperatura de hibridación de 60 ºC. El número de posibles estructuras secundarias y su ΔG (kcal/mol), el %GC, la temperatura de disociación (*T*m) y el *ANY* (puntuación) de las dos parejas de iniciadores, diseñados en la investigación se muestran en la tabla 10.

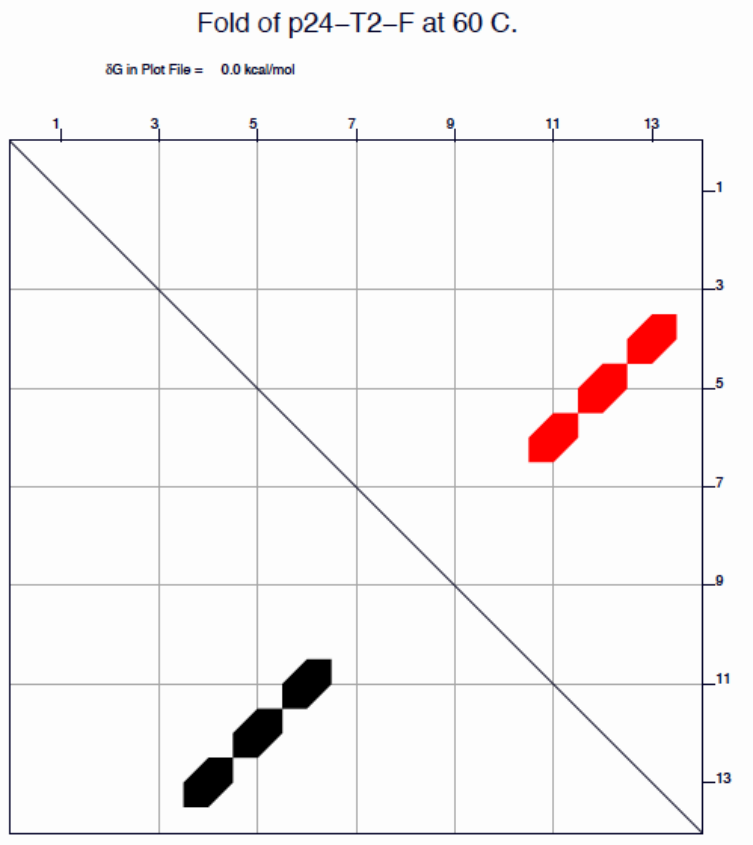
Tabla 10. Parámetros termodinámicos y posibles estructuras secundarias de los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R

Iniciador	ΔG del Iniciador	No. estructuras secundarias	ΔG estructura (s) secundaria (s)	%GC	*T*m ºC	*ANY*	Diferencia en *T*m (ºC) entre los iniciadores
p24-T2-F	0,0 kcal/mol	1	1,3 kcal/mol	44,4	52	3	1
p24-T2-R	0,2 kcal/mol	3	1,9 a 2,1 kcal/mol	50,0	51	4	
CiL-p32-F	1,0 kcal/mol	7	1,3 a 2,3 kcal/mol	50,0	53	9	1
CiL-p32-R	0,0 kcal/mol	1	0,2 kcal/mol	38,1	52	8	

Los iniciadores fueron seleccionados de acuerdo a sus plegamientos óptimos. Se entiende por plegamiento óptimo de las pares de bases como la formación de estructuras secundarias menos probables durante la reacción.

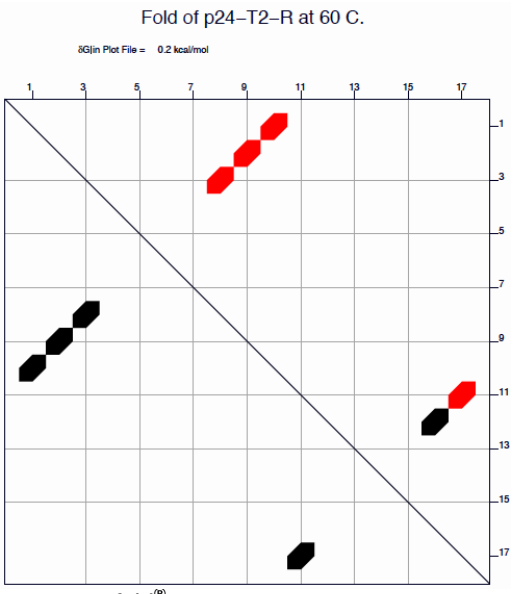
En las figuras 23 a la 26 se muestran los valores de energía óptimos (ΔG - kcal/mol) a una temperatura de hibridación de 60 ºC y las estructuras secundarias, poco probables, de cada uno de los iniciadores representados en el gráfico de puntos (*Plot File*) utilizando mfold®.

Figura 23. Valor de energía óptimo del iniciador p24-T2-F calculado y representado mediante mfold®



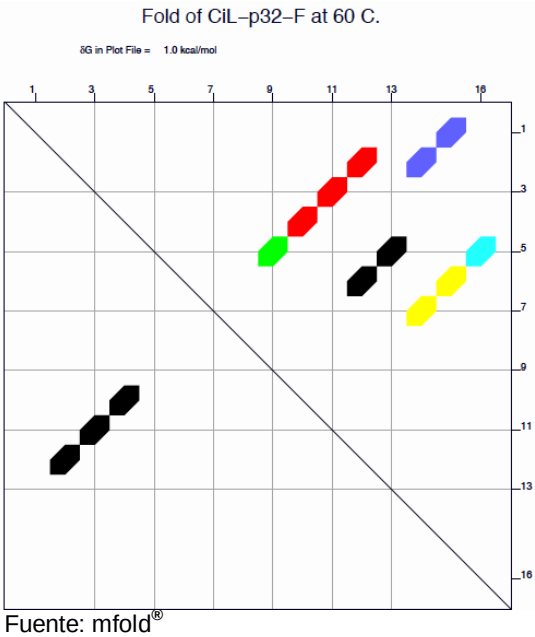
Fuente: mfold®

Figura 24. Valor de energía óptimo del iniciador p24-T2-R calculado y representado mediante mfold®



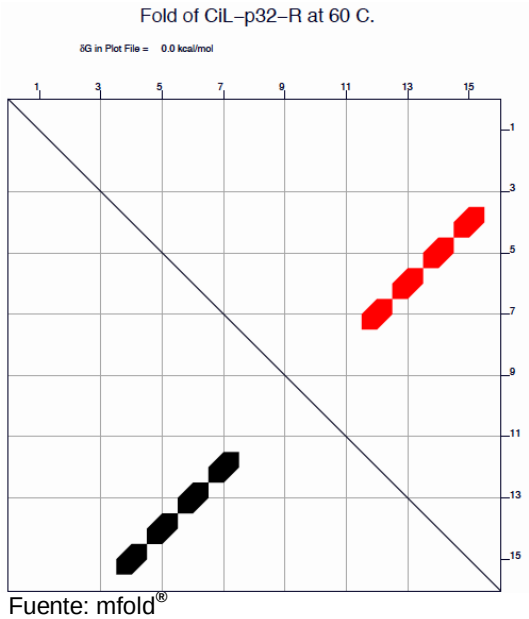
Fuente: mfold®

Figura 25. Valor de energía óptimo del iniciador CiL-p32-F calculado y representado mediante mfold®



Fuente: mfold®

Figura 26. Valor de energía óptimo del iniciador CiL-p32-R calculado y representado mediante mfold®



Fuente: mfold®

El análisis de identidad, valor E (*E-value*) y puntuación máxima (*Max score*) de las secuencias de iniciadores realizado con el algoritmo Blastn® - NCBI® (*National Center for Biotechnology Information*) mostró que la pareja de iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R poseen 100 % de identidad con relación a secuencias de CiLV-C2 en el GenBank®. De igual forma, las secuencias de los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R poseen 100% identidad con relación a secuencias de CiLV-C y CiLV-C2 presentes en dicho banco de genes.

4.1.2 Recolección de muestras de tejido vegetal.

Muestras de foliolos, ramas y frutos con síntomas de leprosis de los cítricos se colectaron en los departamentos de Meta y Casanare en los sitios descritos en la tabla 7 y figura 22. Seis muestras fueron colectadas en cada uno de los lugares de muestreo para un total de 36 muestras.

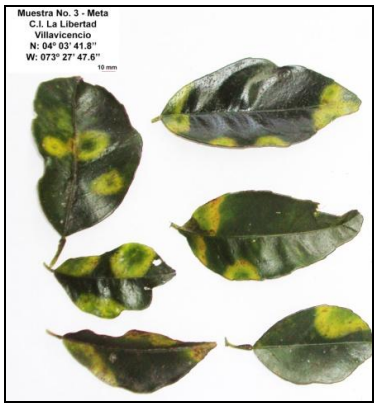
Todas las muestras colectadas fueron analizadas con las parejas de iniciadores descritos en las tablas 8 y 9. Sin embargo, los productos secuenciados con las distintas parejas de iniciadores fueron obtenidos de 12 muestras elegidas al azar, dos de cada sitio.

Los productos secuenciados fueron obtenidos a partir de las muestras de tejido vegetal, las cuales se observan en las figuras 27 a la 32.

Figura 27. Muestras colectadas en Villavicencio (C.I. La Libertad-Corpoica) Meta

A

Fig 27A: Muestra No. 2



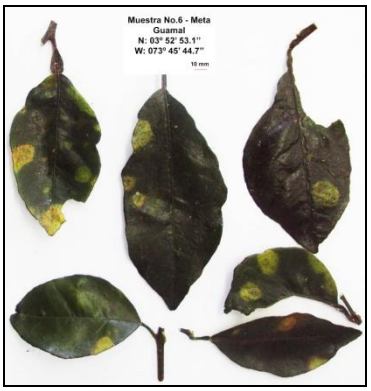
B

Fig 27B: Muestra No. 3

Figura 28. Muestras colectadas en Guamal-Meta

A

Fig 28A: Muestra No. 4



B

Fig 28B: Muestra No. 6

Figura 29. Muestras colectadas en Puerto López (C.I. Taluma-Corpoica) Meta

A

Fig 29A: Muestra No. 9

B

Fig 29B: Muestra No. 17

Figura 30. Muestras colectadas en Yopal-Casanare (Coordenadas 5.219861,-72.395667)

A

Fig 30A: Muestra No. 20

B

Fig 30B: Muestra No. 23

Figura 31. Muestras de epidermis de fruto y ramas colectadas en Yopal-Casanare (Coordenadas 5.391444,-72.426056)

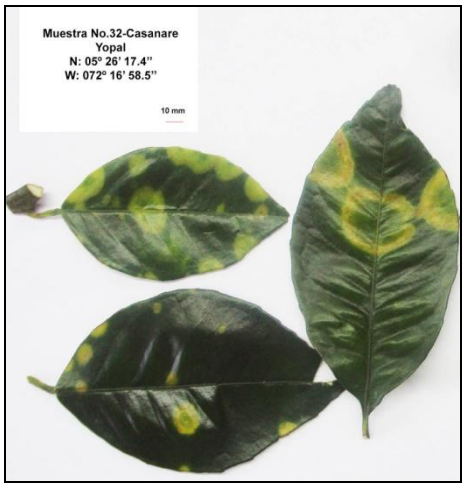
A

Fig 31A: Muestra No. 27

B

Fig 31B:Muestra No. 29

Figura 32. Muestras colectadas en Yopal-Casanare (Coordenadas 5.438167,-72.282917)



A

Fig 32A: Muestra No. 32

B

Fig 32B: Muestra No. 33

4.1.3 Extracción de RNA total.

Los resultados de la cuantificación por espectofotometría del RNA total extraído, expresado en ng/μL, y la relación de absorbancia 260/280, de las 12 muestras analizadas mediante secuenciación se observa en la tabla 11.

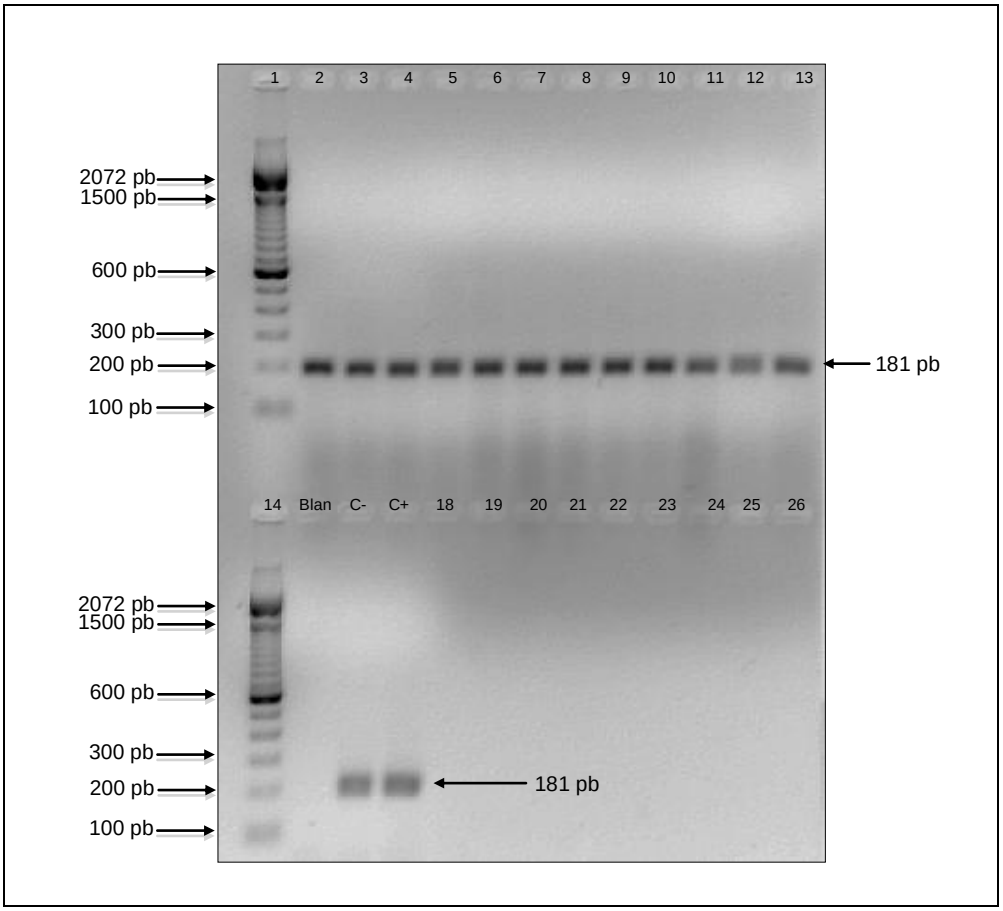
Tabla 11. Concentración y pureza del RNA total extraído

Origen	ID Muestra	Concentración (ng/μL)	A260/280
Villavicencio - Meta	Muestra No. 2	1704,9	1,81
Villavicencio - Meta	Muestra No. 3	907,2	1,92
Guamal - Meta	Muestra No. 4	974,8	1,90
Guamal - Meta	Muestra No. 6	553,5	1,97
Pto/López - Meta	Muestra No. 9	2296,4	1,78
Pto/López - Meta	Muestra No. 17	1958,2	1,80
Yopal - Casanare	Muestra No. 20	1015,8	1,88
Yopal - Casanare	Muestra No. 23	1388,1	1,81
Yopal - Casanare	Muestra No. 27	377,3	1,65
Yopal - Casanare	Muestra No. 29	304,6	1,68
Yopal - Casanare	Muestra No. 32	510,9	1,74
Yopal - Casanare	Muestra No. 33	639,3	1,89

4.1.4 Estandarización de la metodología de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) convencional para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

La amplificación del producto de 181 pb correspondiente al control interno *Nad*5, de las muestras analizadas y secuenciadas, con los iniciadores citados en la tabla 8, se observa en la figura 33.

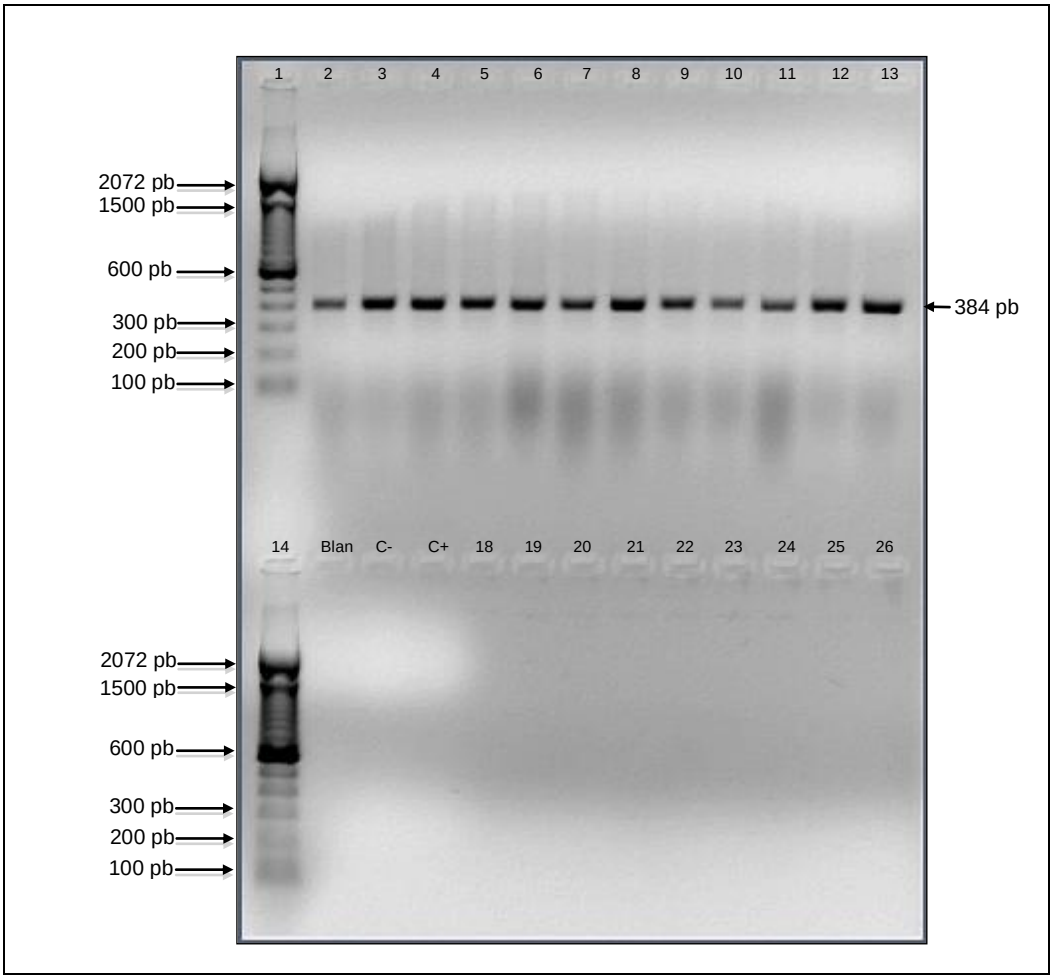
Figura 33. Muestras amplificadas con los iniciadores *nad*5-sentido y *nad*5-antisentido



Carril 1: Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 2:** Muestra 2-Meta, **Carril 3:** Muestra 3-Meta, **Carril 4:** Muestra 4-Meta, **Carril 5:** Muestra 6-Meta, **Carril 6:** Muestra 9-Meta, **Carril 7:** Muestra 17-Meta, **Carril 8:** Muestra 20-Casanare, **Carril 9:** Muestra 23-Casanare, **Carril 10:** Muestra 27-Casanare, **Carril 11:** Muestra 29-Casanare, **Carril 12:** Muestra 32-Casanare, **Carril 13:** Muestra 33-Casanare, **Carril 14:** Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 15:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 16:** Control "Negativo" cDNA CTV (C-), **Carril 17:** Control Positivo cDNA CiLV-C Brasil (C+), **Carril 18 al 26:** Sin muestra.

Productos de 384 pb amplificados en la región terminal 3' del gen p24 y parte de la región 3' no traducible (UTR) del RNA 2 de CiLV-C2, correspondiente a 12 muestras provenientes de los departamentos de Meta y Casanare analizadas con los iniciadores específicos p24-T2-F y p24-T2-R los cuales se indican en la tabla 9, se observan a continuación en la figura 34. Adicionalmente estos productos de PCR fueron secuenciados.

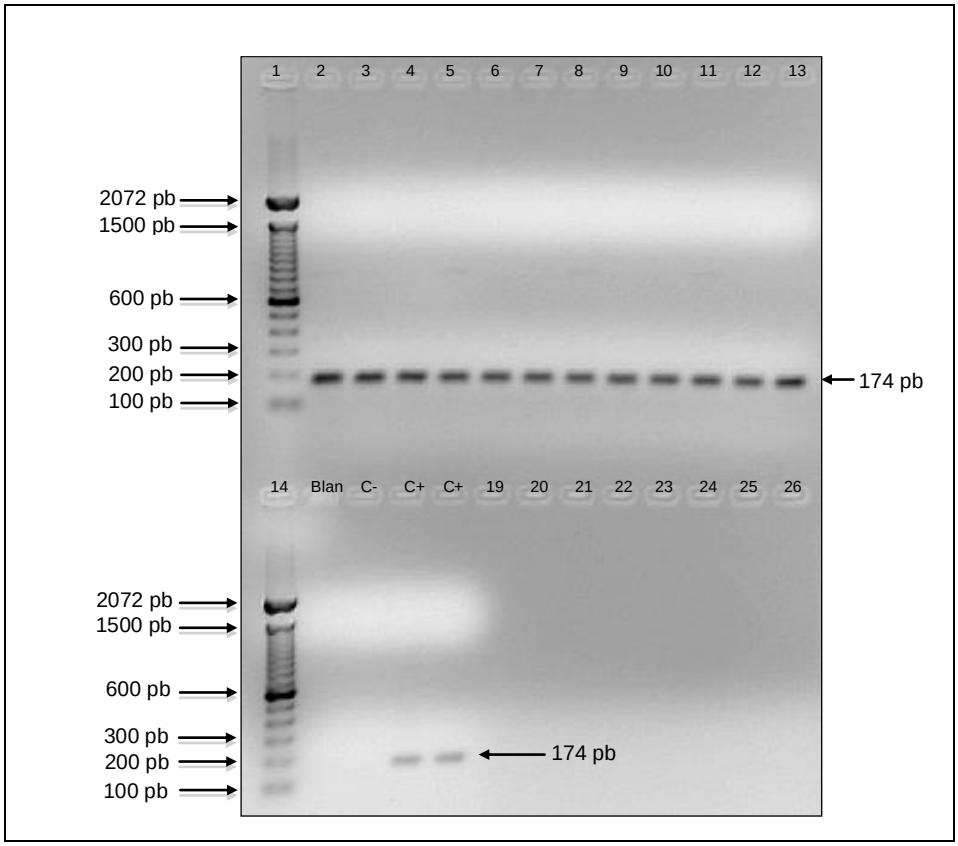
Figura 34. Muestras amplificadas con los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R



Carril 1: Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 2:** Muestra 2-Meta, **Carril 3:** Muestra 3-Meta, **Carril 4:** Muestra 4-Meta, **Carril 5:** Muestra 6-Meta, **Carril 6:** Muestra 9-Meta, **Carril 7:** Muestra 17-Meta, **Carril 8:** Muestra 20-Casanare, **Carril 9:** Muestra 23-Casanare, **Carril 10:** Muestra 27-Casanare, **Carril 11:** Muestra 29-Casanare, **Carril 12:** Muestra 32-Casanare, **Carril 13:** Muestra 33-Casanare, **Carril 14:** Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 15:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 16:** Control Negativo cDNA CTV (C-), **Carril 17:** Control Positivo cDNA CiLV-C Brasil (C+), **Carril 18 al 26:** Sin muestra.

Productos de ~174 pb amplificados a partir de la región parcial del gen p32-MP de CiLV-C2 y CiLV-C, con los iniciadores específicos CiL-p32-F y CiL-p32-R, tabla 9, se observan a continuación en la figura 35. Estas muestras fueron analizadas mediante secuenciación.

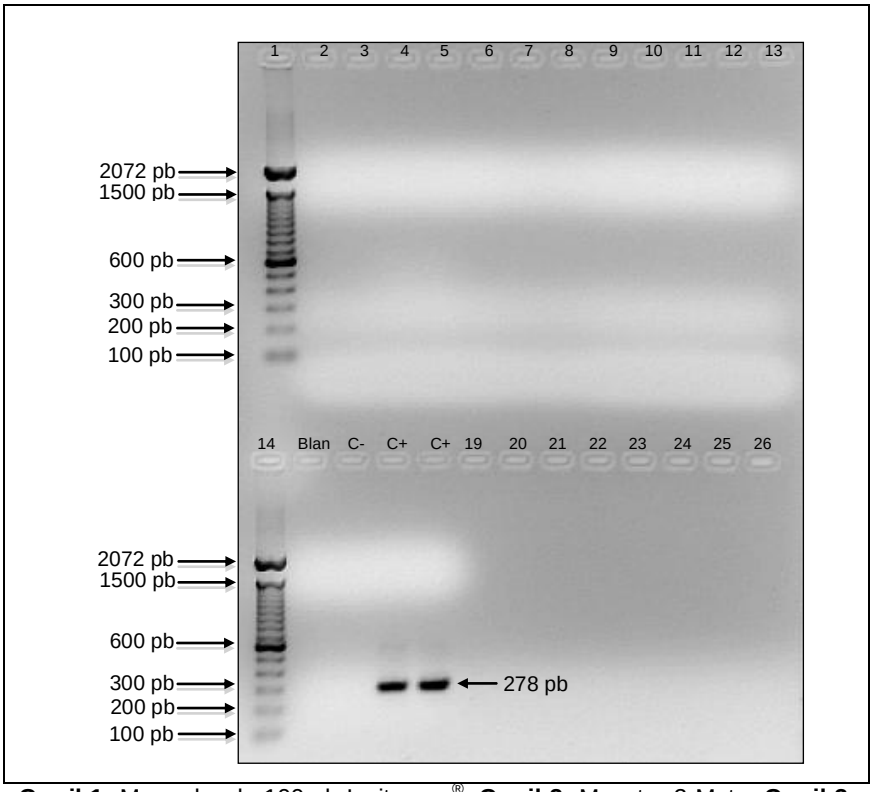
Figura 35. Muestras amplificadas con los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R



Carril 1: Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 2:** Muestra 2-Meta, **Carril 3:** Muestra 3-Meta, **Carril 4:** Muestra 4-Meta, **Carril 5:** Muestra 6-Meta, **Carril 6:** Muestra 9-Meta, **Carril 7:** Muestra 17-Meta, **Carril 8:** Muestra 20-Casanare, **Carril 9:** Muestra 23-Casanare, **Carril 10:** Muestra 27-Casanare, **Carril 11:** Muestra 29-Casanare, **Carril 12:** Muestra 32-Casanare, **Carril 13:** Muestra 33-Casanare, **Carril 14:** Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 15:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 16:** Control Negativo cDNA CTV (C-), **Carril 17:** Control Positivo cDNA CiLV-C Brasil (C+), **Carriles 18:** Control Positivo cDNA CiLV-C Brasil No. 2 (C+), **Carril 19 al 26:** Sin muestra.

Los iniciadores específicos CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R (Ochoa-Corona *et al*., 2009) (secuencias no publicadas), amplifican una región de 278 pb del gen p15 de CiLV-C. Las 36 muestras analizadas en los departamentos de Meta y Casanare resultaron negativas al análisis de CiLV-C con estos iniciadores. Contrario a lo anterior, estos iniciadores amplificaron el producto esperado en los controles positivos Brasileros (CiLV-C). La amplificación por RT-PCR con los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R, citados en la tabla 9, se muestran en la figura 36.

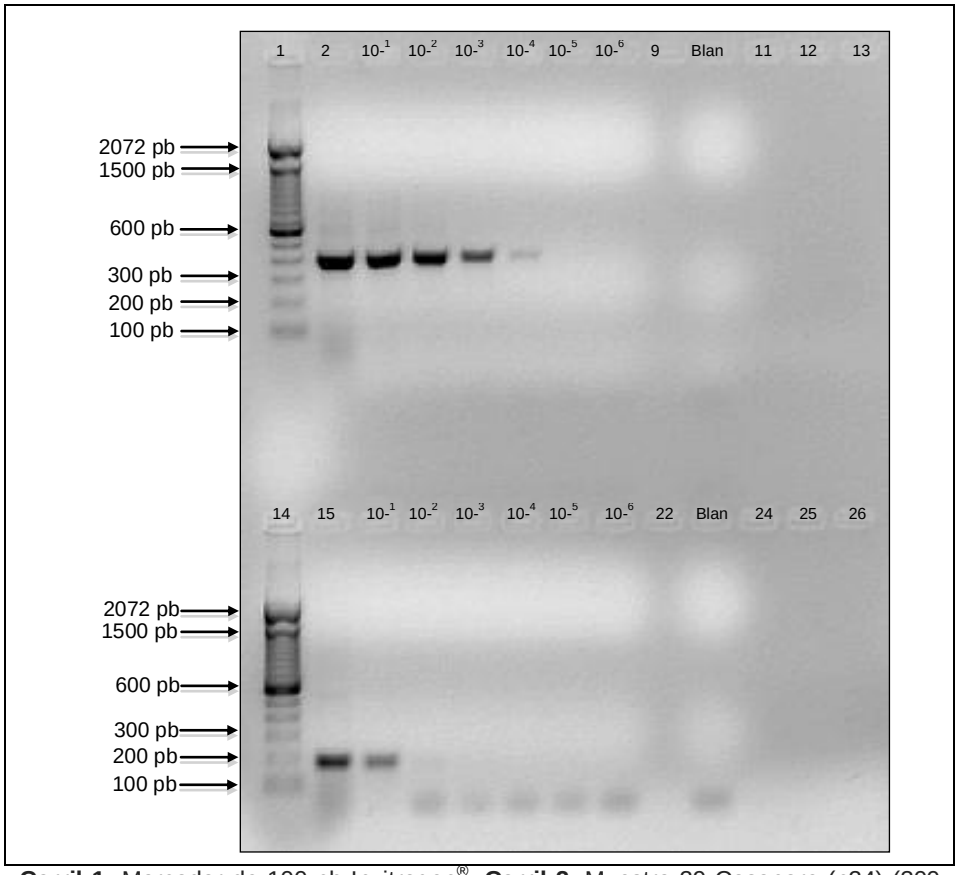
Figura 36. Análisis realizado con los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R



Carril 1: Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 2:** Muestra 2-Meta, **Carril 3:** Muestra 3-Meta, **Carril 4:** Muestra 4-Meta, **Carril 5:** Muestra 6-Meta, **Carril 6:** Muestra 9-Meta, **Carril 7:** Muestra 17-Meta, **Carril 8:** Muestra 20-Casanare, **Carril 9:** Muestra 23-Casanare, **Carril 10:** Muestra 27-Casanare, **Carril 11:** Muestra 29-Casanare, **Carril 12:** Muestra 32-Casanare, **Carril 13:** Muestra 33-Casanare, **Carril 14:** Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 15:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 16:** Control Negativo cDNA CTV (C-), **Carril 17:** Control Positivo cDNA CiLV-C Brasil (C+), **Carriles 18:** Control Positivo cDNA CiLV-C Brasil No. 2 (C+), **Carril 19 al 26:** Sin muestra.

La detección mínima de CiLV-C y CiLV-C2 utilizando los iniciadores específicos p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R, se realizó mediante diluciones seriadas de RNA total a partir de una concentración inicial de 300 ng/μL. Los resultados obtenidos con la muestra No. 29 del departamento de Casanare se observan en la figura 37.

Figura 37. Ensayo de detección mínima con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R

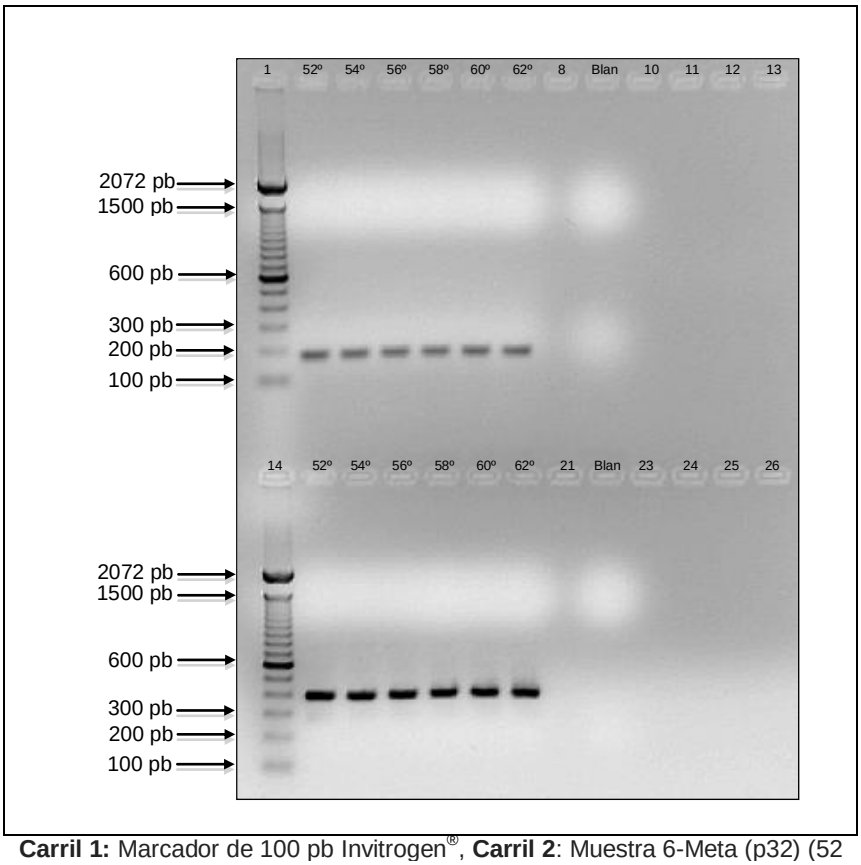


Carril 1: Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 2**: Muestra 29-Casanare (p24) (300 ng/μL), **Carril 3:** Muestra 29-Casanare (p24) ($1x10^{-1}$), **Carril 4**: Muestra 29-Casanare (p24) ($1x10^{-2}$), **Carril 5:** Muestra 29-Casanare (p24) ($1x10^{-3}$), **Carril 6:** Muestra 29-Casanare (p24) ($1x10^{-4}$), **Carril 7**: Muestra 29-Casanare (p24) ($1x10^{-5}$), **Carril 8**: Muestra 29-Casanare (p24) ($1x10^{-6}$), **Carril 9:** Sin muestra, **Carril 10:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 11 al 13:** Sin muestra, **Carril 14:** Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 15**: Muestra 29-Casanare (p32) (300 ng/μL), **Carril 16:** Muestra 29-Casanare (p32) ($1x10^{-1}$), **Carril 17**: Muestra 29-Casanare (p32) ($1x10^{-2}$), **Carril 18:** Muestra 29-Casanare (p32) ($1x10^{-3}$), **Carril 19:** Muestra 29-Casanare (p32) ($1x10^{-4}$), **Carril 20**: Muestra 29-Casanare (p32) ($1x10^{-5}$), **Carril 21**: Muestra 29-Casanare (p32) ($1x10^{-6}$), **Carril 22:** Sin muestra, **Carril 23:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 24 al 26:** Sin muestra.

La amplificación por RT-PCR de los fragmentos diagnósticos en un gradiente de temperatura de hibridación, con los iniciadores específicos p24-T2-F/p24-T2-R que producen un fragmento de 384 pb e iniciadores CiL-p32-F/CiL-p32-R que

amplifican una región de ~174 pb, se observa en la figura 38. La muestra utilizada en este experimento corresponde a la No. 6 (departamento del Meta).

Figura 38. Amplificación en gradiente de temperatura con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R



Carril 1: Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 2**: Muestra 6-Meta (p32) (52 ºC), **Carril 3:** Muestra 6-Meta (p32) (54 ºC), **Carril 4**: Muestra 6-Meta (p32) (56 ºC), **Carril 5:** Muestra 6-Meta (p32) (58 ºC), **Carril 6:** Muestra 6-Meta (p32) (60 ºC), **Carril 7**: Muestra 6-Meta (p32) (62 ºC), **Carril 8**: Sin muestra, **Carril 9:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 10 al 13:** Sin muestra, **Carril 14:** Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 15**: Muestra 6-Meta (p24) (52 ºC), **Carril 16:** Muestra 6-Meta (p24) (54 ºC), **Carril 17**: Muestra 6-Meta (p24) (56 ºC), **Carril 18:** Muestra 6-Meta (p24) (58 ºC), **Carril 19:** Muestra 6-Meta (p24) (60 ºC), **Carril 20**: Muestra 6-Meta (p24) (62 ºC), **Carril 21**: Sin muestra, **Carril 22:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 23 al 26:** Sin muestra.

4.1.5 Secuenciación de productos amplificados.

Los productos de RT-PCR, amplificados con cada una de las parejas de iniciadores, no presentaron amplificaciones inespecíficas, barridos o dímeros de iniciadores. Por esta razón fueron purificados y secuenciados de forma directa con los iniciadores sentido y antisentido. Las secuencias consenso editadas de las regiones diagnósticas de muestras provenientes de los departamentos de Meta y Casanare amplificadas con los iniciadores específicos p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R y los respectivos controles positivos, incluyendo la región diagnóstica generada con los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R que amplifica un fragmento de 278 pb del gen p15 de CiLV-C se encuentran consignadas en el anexo D.

El alineamiento y análisis de identidad, valor *E* (*E-value*) y puntuación máxima (*Max score*) obtenidos con el algoritmo Blastn® - NCBI® en la región diagnóstica p24 (p24-T2-F y p24-T2-R) de 12 muestras provenientes de los departamentos de Meta y Casanare, se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Alineamiento y análisis Blastn® de secuencias diagnósticas amplificadas con los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R

Muestra	Identidad	*E*-value	*Max score*
Pr2-p24-Meta	99% con CiLV-C2	0.0	701
Pr3-p24-Meta	99% con CiLV-C2	0.0	701
Pr4-p24-Meta	99% con CiLV-C2	0.0	701
Pr6-p24-Meta	93% con CiLV-C2	4e-155	556
Pr9-p24-Meta	95% con CiLV-C2	9e-167	595
Pr17-p24-Meta	99% con CiLV-C2	0.0	701
Pr20-p24-Casanare	99% con CiLV-C2	0.0	695
Pr23-p24-Casanare	99% con CiLV-C2	0.0	695
Pr27-p24-Casanare	99% con CiLV-C2	0.0	701
Pr29-p24-Casanare	98% con CiLV-C2	0.0	673
Pr32-p24-Casanare	98% con CiLV-C2	0.0	673
Pr33-p24-Casanare	98% con CiLV-C2	0.0	667

El alineamiento y análisis de identidad, valor *E* (*E-value*) y puntuación máxima (*Max score*), realizado con el algoritmo Blastn® - NCBI® en la región diagnóstica p32 amplificada y secuenciada con los iniciadores específicos CiL-p32-F y CiL-p32-R, en 12 muestras provenientes de los departamentos de Meta y Casanare, se presenta en la tabla 13.

Tabla 13. Alineamiento y análisis Blastn® de secuencias diagnósticas amplificadas con los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R

Muestra	Identidad	*E*-value	*Max score*
Pr2-p32-Meta	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr3-p32-Meta	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr4-p32-Meta	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr6-p32-Meta	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr9-p32-Meta	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr17-p32-Meta	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr20-p32-Casanare	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr23-p32-Casanare	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr27-p32-Casanare	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr29-p32-Casanare	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr32-p32-Casanare	99% con CiLV-C2	3e-83	316
Pr33-p32-Casanare	99% con CiLV-C2	3e-83	316

El análisis de identidad, el valor *E* (*E-value*) y la puntuación máxima (*Max score*) realizado con el algoritmo Blastn® - NCBI® a las regiones diagnósticas amplificadas y secuenciadas, a partir de los controles positivos Brasileros, con los iniciadores específicos CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R, se observan en la tabla 14.

Tabla 14. Alineamiento y análisis Blastn® de secuencias diagnósticas amplificadas, a partir de los controles positivos Brasileros, con los iniciadores CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R

Muestra	Identidad	*E*-value	*Max score*
Pr-p32-Control_Pos-Brasil	100% con CiLV-C	2e-80	307
Pr-p15-Control_Pos-Brasil	99% con CiLV-C	3e-120	440

4.1.6 Inferencia de la historia evolutiva de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2.

4.1.6.1 Inferencia Bayesiana

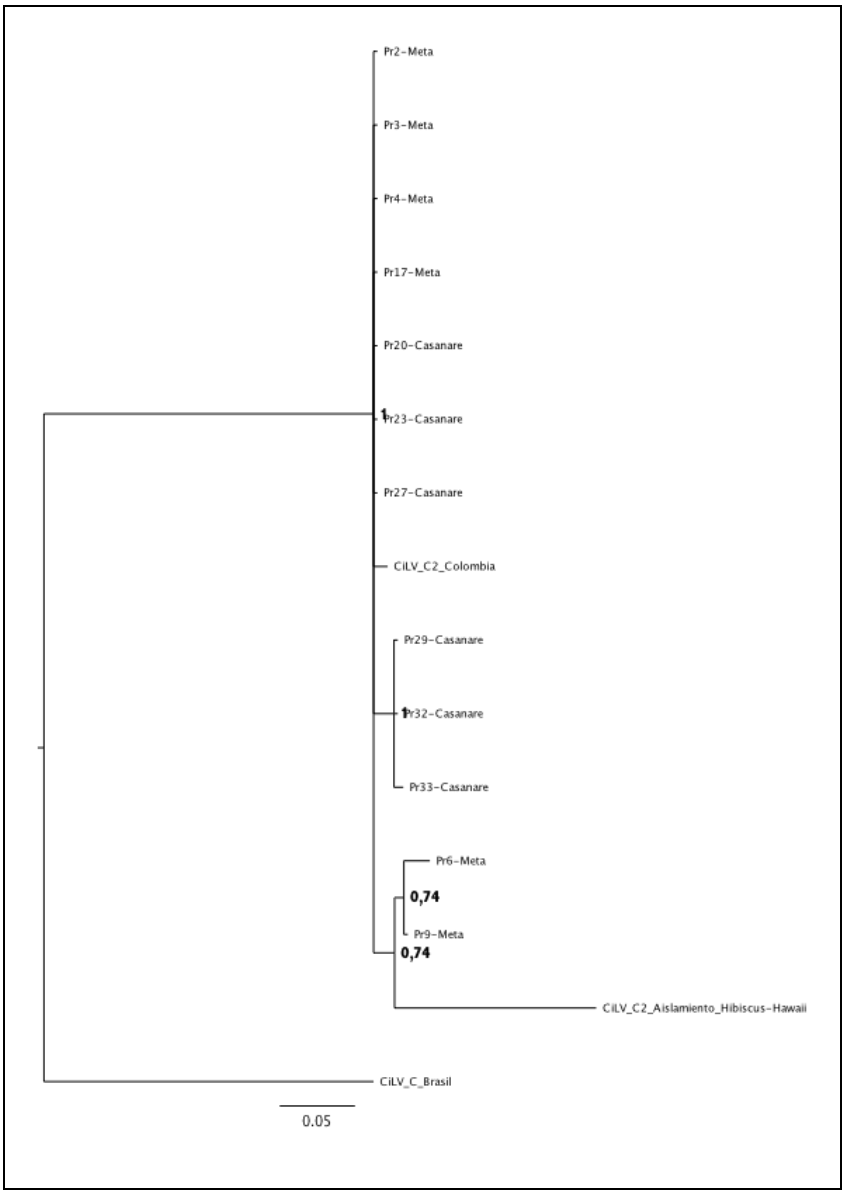
Las condiciones del modelo de substitución nucleotídica de la matriz de datos se estableció de manera independiente para cada partición teniendo como base el análisis a partir del programa jModelTest 0.1.1. utilizando el Criterio Bayesiano - BIC (*Bayesian information criterion*).

El modelo seleccionado para el gen p32 fue K80 y los parámetros del modelo fueron: igual frecuencia de nucleótidos (*Lset base*=equal), un modelo de substitución con diferentes tasas para Ti/Tv (*nst*=2) y una relación Transición/Transversión (*tratio*) con un valor de 1.9676.

El modelo seleccionado para el gen p24 fue TPM2 y los parámetros del modelo fueron: igual frecuencia de nucleótidos (*Lset base*=equal), un modelo en donde todas las tasas de substitución son diferentes (GTR) (*nst=6*) y con valores de tasas de substitución (*rmat*) de: 10.8683; 14.5435; 10.8683; 1.0000; 14.5435; 1.0000.

El árbol construido mediante inferencia bayesiana, a partir de la matriz de datos combinada de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2, se observa en la figura 39.

Figura 39. Árbol de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2 construido mediante inferencia bayesiana



El diagnóstico de convergencia del análisis bayesiano evaluado con el programa Tracer® v1.5, se observa en la figura 40. Así mismo, el *Trace* en donde se visualiza la zona de descarte y la zona de convergencia del análisis, se muestra en la figura 41.

Figura 40. Diagnóstico de convergencia del análisis bayesiano evaluado con el programa Tracer® v1.5

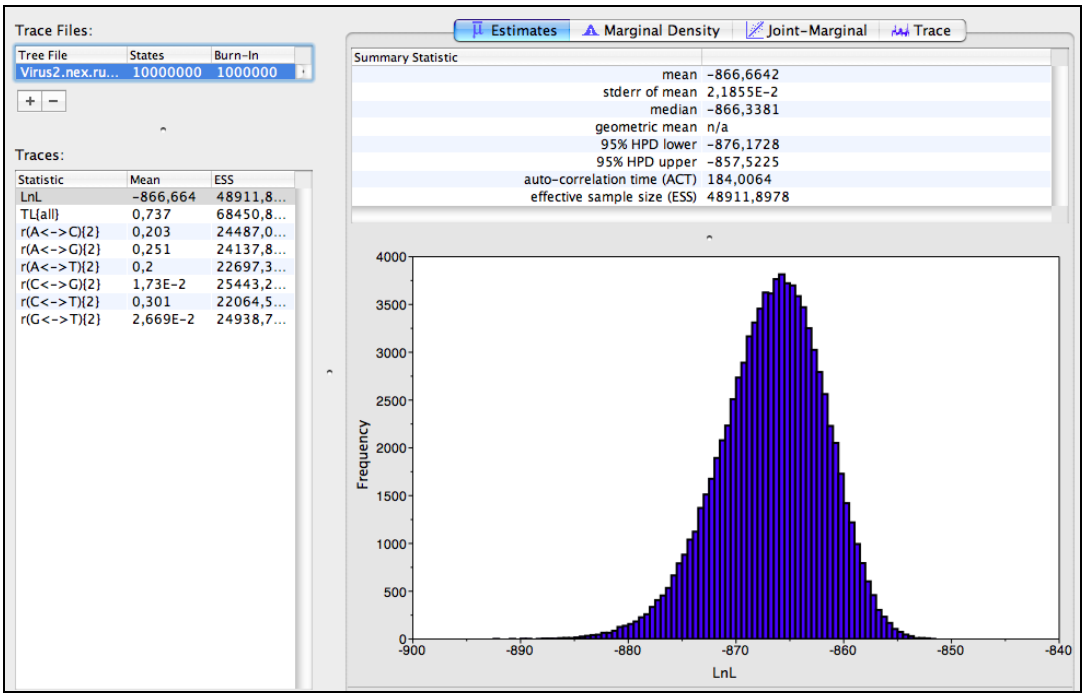
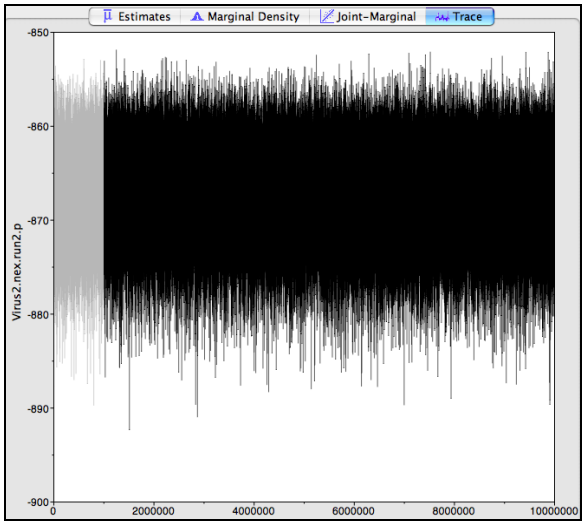


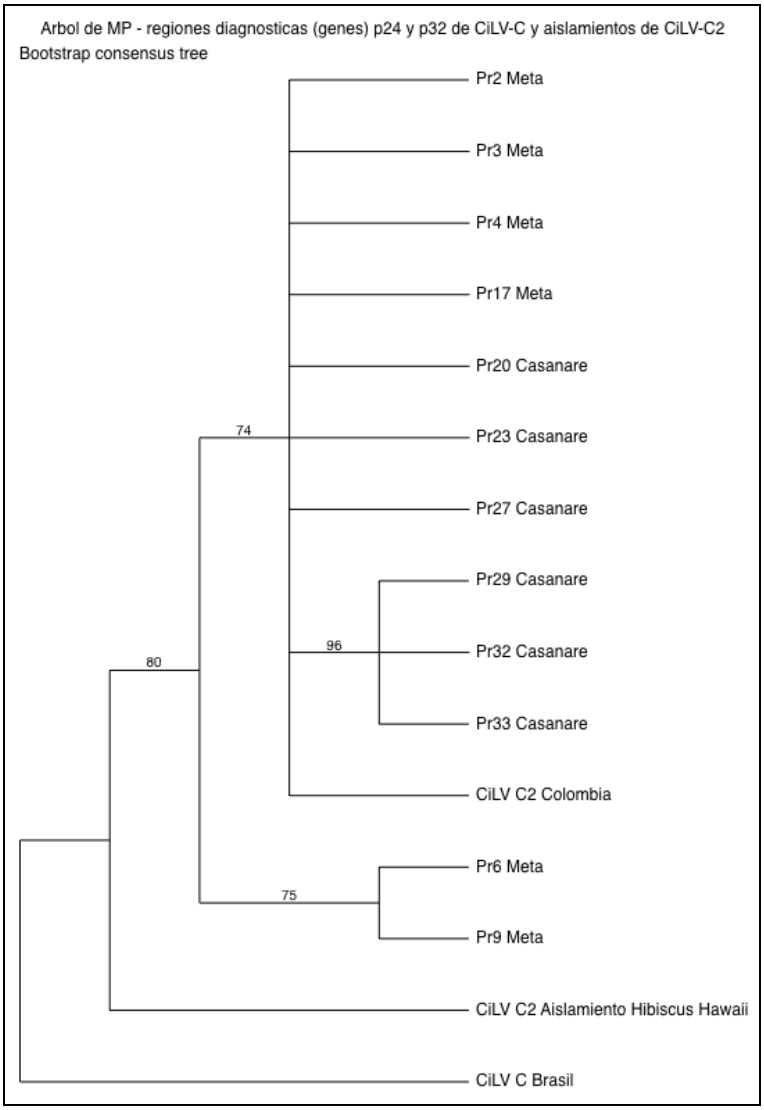
Figura 41. Zona de descarte y zona de convergencia del análisis visualizadas en la ventana *Trace* del programa Tracer® v1.5



4.1.6.2 Máxima Parsimonia

Se obtuvo un único árbol de máxima parsimonia a partir de la matriz combinada de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2, con un L=18, un Ci=0,83 y un Ri=0,84, el cual se observa en la figura 42.

Figura 42. Árbol de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2 construido mediante máxima parsimonia



4.1.7 Ajustes de la metodología de transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

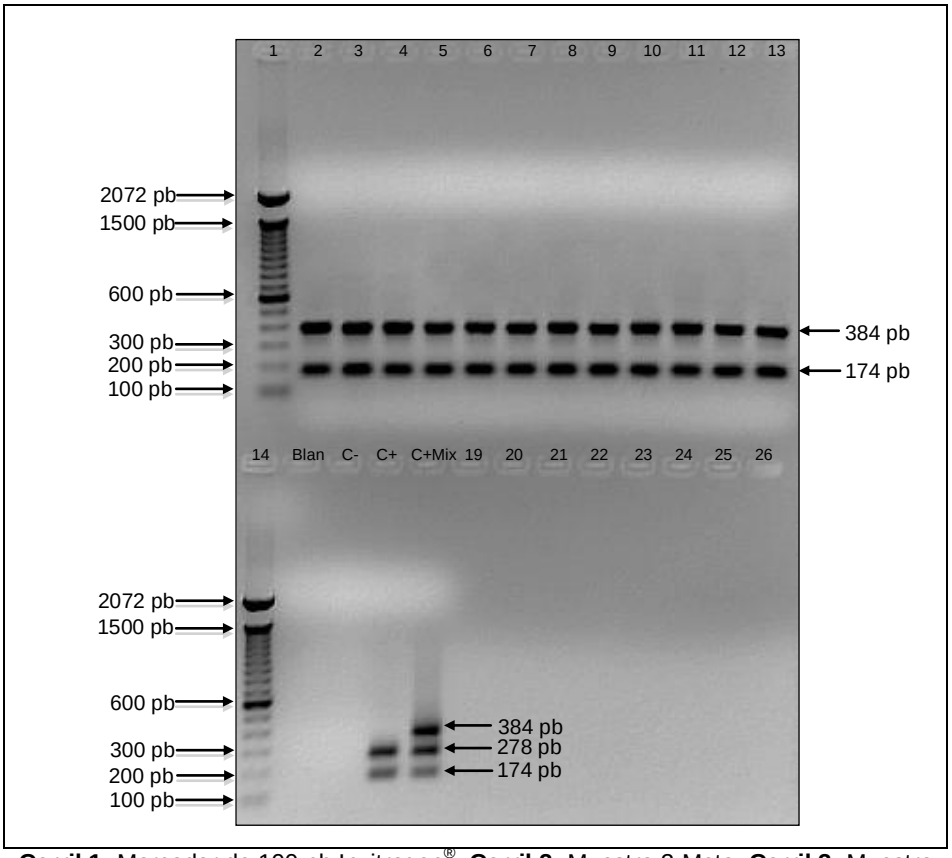
El esquema de detección simultánea y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 mediante transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) utilizando los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R, citados en la tabla 9, se observa en la tabla 15.

Tabla 15. Representación esquemática de la propuesta para la detección simultánea y discriminación mediante RT-mPCR utilizando los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R

	CiLV-C	**CiLV-C2**	**Coinfección CiLV-C+CiLV-C2**
p24 (p24-T2-F/p24-T2-R)	384 pb (-)	384 pb (+)	384 pb (+)
p15 (CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R)	278 pb (+)	278 pb (-)	278 pb (+)
p32 (CiL-p32-F/CiL-p32-R)	~174 pb (+)	~174 pb (+)	~174 pb (+)
	Sin amplificación (resultado negativo)		
	Presencia de producto amplificado (resultado positivo)		

Los productos amplificados mediante RT-mPCR utilizando los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R, se observan en la figura 43.

Figura 43. Análisis RT-mPCR con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R en muestras de los departamentos de Meta y Casanare



Carril 1: Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 2:** Muestra 2-Meta, **Carril 3:** Muestra 3-Meta, **Carril 4:** Muestra 4-Meta, **Carril 5:** Muestra 6-Meta, **Carril 6:** Muestra 9-Meta, **Carril 7:** Muestra 17-Meta, **Carril 8:** Muestra 20-Casanare, **Carril 9:** Muestra 23-Casanare, **Carril 10:** Muestra 27-Casanare, **Carril 11:** Muestra 29-Casanare, **Carril 12:** Muestra 32-Casanare, **Carril 13:** Muestra 33-Casanare, **Carril 14:** Marcador de 100 pb Invitrogen®, **Carril 15:** Blanco de reacción (Blan), **Carril 16:** Control Negativo cDNA CTV (C-), **Carril 17:** Control Positivo cDNA CiLV-C Brasil (C+), **Carriles 18:** Mezcla de cDNA Control Positivo CiLV-C Brasil + cDNA CiLV-C2 (C+Mix) (Muestra 9-Meta), **Carril 19 al 26:** Sin muestra.

4.2 DISCUSIÓN

4.2.1 Diseño de iniciadores específicos para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

Los parámetros termodinámicos de los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R (tabla 10), muestran que la temperatura de disociación (*melting*, *T*m) entre cada una de las parejas de iniciadores es similar; es decir, que existe una baja diferencia entre la *T*m (ºC) de estas parejas de iniciadores (1 ºC), lo cual aumenta la sensibilidad y la eficiencia de la reacción y facilita utilizarlos de manera simultánea en transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR). Cabe resaltar, en el caso de PCR, que si la *T*m de un iniciador es mucho más alta que la temperatura de hibridación es probable que se presenten eventos de hibridación inespecíficas (*off-target*); y en forma opuesta, si la temperatura de hibridación es mucho más alta que la *T*m, es probable que el iniciador no se adhiera a la secuencia blanco y por lo tanto no participe en la reacción. Lo anteriormente expuesto, indica que lo ideal es diseñar iniciadores con una *T*m igual o cercana a la temperatura de hibridación (Manthey, 2005), como los diseñados en esta investigación.

La tabla 10 y las figuras 23 a 26, muestran los valores de energía (ΔG) de los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R, a una temperatura de hibridación de 60 ºC. En los gráficos de puntos (*Plot File*) generados mediante mfold® se observa que el valor ΔG (kcal/mol) de los iniciadores es cero o cercano a éste (máximo valor de 1,0 kcal/mol). Estos valores de ΔG son óptimos e indican menor probabilidad de formación de estructuras secundarias en los iniciadores. Así mismo, el gráfico muestra el número de posibles estructuras secundarias formadas en cada iniciador y su correspondiente ΔG. Estas estructuras son débiles y se presentan distantes al extremo 3', lo cual convierte estos

plegamientos de las pares de bases en óptimos debido a su baja probabilidad de formación durante la reacción (Arif y Ochoa-Corona, 2013).

Los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R, fueron analizados mediante el programa mfold® a una temperatura de hibridación de 56 ºC, presentan un ΔG de 0 y 0,5 kcal/mol, respectivamente (ver Poster, Ochoa-Corona *et al*., 2009). Al igual que los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R, las posibles estructuras secundarias presentes en los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R son débiles y se presentan distantes del extremo 3', estas características termodinámicas permiten utilizarlos en RT-mPCR simultáneamente con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R.

4.2.2 Características de muestras de tejido vegetal sintomático a leprosis de los cítricos.

Los síntomas de leprosis de los cítricos observados en las muestras de foliolos, frutos y ramas colectadas en los departamentos de Meta y Casanare (figuras 27 a 32), son similares a los síntomas característicos de la enfermedad reportados en el estado del conocimiento de la leprosis de los cítricos, descritos en el numeral 2. Las muestras presentaron óptimas características para el análisis mediante RT-PCR y RT-mPCR. Las condiciones de transporte y almacenamiento a temperatura ambiente (29 ºC) durante varios días, fueron similares a las previamente establecidas para la preservación de tejido foliar con síntomas de leprosis de los cítricos con el fin de posibilitar un análisis eficaz de las muestras (Antonioli-luizon *et al*., 2004), y por lo tanto una detección confiable del agente etiológico mediante RT-PCR.

La concentración del RNA total extraído utilizando el reactivo TRIzol®, anexo A, permitió avanzar sin inconvenientes en los análisis de RT-PCR y RT-mPCR. Los

valores de concentración de RNA total extraídos en las 36 muestras de tejido vegetal colectadas en los departamentos de Meta y Casanare oscilaron entre 304,6 ng/μL y 2296,4 ng/μL. De igual forma, la relación de absorbancia A260/280, la cual indica la pureza de la extracción, fue la adecuada debido que los valores obtenidos fueron cercanos o superiores a 1,8. La muestra 27 (377,3 ng/μL y A260/280: 1,65) y la muestra 29 (304,6 ng/μL y A260/280: 1,68) extraídas a partir de fruto y ramas, respectivamente, presentaron las concentraciones y absorbancias más bajas. Sin embargo, los valores mencionados no constituyen variables que comprometan o alteren los resultados obtenidos en el análisis mediante RT-PCR y RT-mPCR con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R.

4.2.3 Estandarización de la metodología de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) convencional para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

Las 36 muestras de tejido vegetal con síntomas de leprosis de los cítricos procedentes de los departamentos de Meta y Casanare fueron analizadas con los iniciadores *nad5*-sentido y *nad5*-antisentido (Menzel *et al*., 2002). El fragmento esperado de 181 pb que codifica una región de la proteína *NADH dehydrogenase* 5 (*Nad*5) mitocondrial, fue amplificado en todas las muestras analizadas, esta región fue empleada como control interno de reacción. Este control minimiza el riesgo de obtener resultados falsos negativos en RT-PCR convencional y RT-mPCR (Menzel *et al*., 2002). Los productos amplificados con los iniciadores *nad5*-sentido y *nad5*-antisentido (figura 33, carriles 2 al 13), presentaron suficiente intensidad para ser visualizados en un gel de agarosa. No obstante, las amplificaciones realizadas a partir del control negativo (cDNA CTV) y positivo (cDNA CiLV-C Brasil) figura 33 carriles 16 y 17 respectivamente, fueron más tenues, posiblemente debido a repetidos eventos descongelamiento de los cDNAs

entre cada prueba. Sin embargo, estos productos se observan sin ningún problema en un gel de agarosa.

El producto de amplificación esperado de 384 pb, generado con los iniciadores específicos p24-T2-F y p24-T2-R, se obtuvo en las 36 muestras de tejido vegetal sintomáticas analizadas en los departamentos de Meta y Casanare. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 384 pb exclusivo de la región terminal 3' del gen p24 y parte de la región 3' no traducible (UTR) del RNA 2 de CiLV-C2; es decir, los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R detectan únicamente esta especie viral y no detectan a CiLV-C u otra especie del género *Cilevirus* (figura 34). El control negativo (cDNA de CTV) y el control positivo (cDNA de CiLV-C Brasil) descargados en los carriles 16 y 17 respectivamente, no amplificaron (figura 34). No obstante, las 12 muestras analizadas mediante secuenciación, provenientes de los departamentos de Meta y Casanare, las cuales fueron descargadas en los carriles 2 al 13 (figura 34), resultaron positivas a CiLV-C2, al igual que las muestras restantes (24 muestras, resultados no presentados).

El ensayo de detección mínima de CiLV-C2 con los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R fue realizado con la muestra No. 29 del departamento de Casanare a partir de una concentración inicial de 300 ng/μL de RNA total. Este experimento indicó que la sensibilidad de la RT-PCR con estos iniciadores es alta debido que es posible amplificar el fragmento de 384 pb hasta una concentración límite de 300 pg/μL ($1x10^{-3}$) (figura 37, carriles 2 al 5). Sin embargo, es necesario realizar un ensayo de límite de detección a partir de los fragmentos clonados mediante PCR en tiempo real (*real-time quantitative* PCR - qPCR) con el fin de determinar con exactitud la concentración mínima de detección de CiLV-C2 con estos iniciadores.
El ensayo de gradiente de temperatura de hibridación con los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R, fue realizado entre 52 ºC y 62 ºC, con la muestra No. 6 proveniente del departamento de Meta (figura 38, carriles 15 al 20), este resultado evidencia la robustez termodinámica de estos iniciadores, los cuales trabajan bien en un rango

de temperatura de hibridación que varía entre 52 ºC y 62 ºC. Este amplio rango de temperatura de hibridación en el cual reaccionan los iniciadores reduce el riesgo de error de la prueba debido a fallas en la calibración del termociclador, variables de tipo humano y ensayos de modificación de variables de la prueba, y es una característica importante para aplicaciones de bioseguridad.

El producto de amplificación generado con los iniciadores específicos CiL-p32-F y CiL-p32-R fue obtenido en las 36 muestras de tejido vegetal sintomáticas analizadas en los departamentos de Meta y Casanare. Estos iniciadores amplifican un fragmento de ~174 pb de una región parcial del gen p32-MP de CiLV-C2 y/o CiLV-C. Es decir, tienen la capacidad de detectar indistintamente una u otra especie o coinfecciones entre estas dos; lo cual no permite discriminar entre CiLV-C y CiLV-C2 a través de las longitudes de los fragmentos amplificados, debido que el tamaño del producto amplificado es muy similar y no se puede diferenciar en un gel de agarosa (figura 35). La discriminación entre una u otra especie es posible mediante la secuenciación del fragmento de ~174 pb. Las 12 muestras provenientes de los departamentos de Meta y Casanare cuyos productos de PCR se presentan en la figura 35, fueron analizadas mediante secuenciación con los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R, al igual que los respectivos controles de reacción. Así mismo, las 24 muestras restantes fueron analizadas y se obtuvo el fragmento esperado (resultados no presentados).

Es importante resaltar que la intensidad de la amplificación obtenida con los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R es más baja que con los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R. De igual forma, se observa en el ensayo de detección mínima, figura 37 (carriles 15 al 21), realizado a partir de la muestra No. 29 del departamento de Casanare con una concentración inicial de 300 ng/μL de RNA total, que la sensibilidad de la RT-PCR con estos iniciadores permite amplificar el fragmento de ~174 pb hasta una concentración límite de 30 ng/μL ($1x10^{-1}$) (figura 37, carril 16). La sensibilidad de la RT-PCR cuando se emplean estos iniciadores es menor

debido, posiblemente a las características termodinámicas de los iniciadores (tabla 10, figuras 25 y 26). Aunque las características termodinámicas de estos iniciadores son en general buenas, es importante aclarar que el diseño de iniciadores óptimos, en lo que se refiere a sus características termodinámicas y a su vez con la capacidad de discriminar entre CiLV-C y CiLV-C2 es complejo, debido a la naturaleza misma de la región y a su %GC. Por lo tanto, se sacrificó la sensibilidad del fragmento amplificado, con el objetivo de poder discriminar entre las dos especies, sin poner en riesgo la efectividad y sensibilidad de la prueba debido que se mantiene en los rangos normales de amplificación. No obstante, este inconveniente técnico se puede corregir aumentando la concentración de los iniciadores en desventaja, en este caso los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R (figura 43), o con la adición de una secuencia adicional enriquecida en A/T en el extremo 5' de los iniciadores (*5' A/T-rich overhanging sequences - flaps*) (Arif y Ochoa-Corona, 2013).

Al igual que con los iniciadores p24-T2-F y p24-T2-R, es necesario realizar un ensayo de límite de detección a partir de los fragmentos clonados y establecer la sensibilidad de la prueba con los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R mediante PCR en tiempo real.

El ensayo de RT-PCR en gradientes de temperatura de hibridación de los iniciadores CiL-p32-F y CiL-p32-R fue realizado entre 52 ºC y 62 ºC, con la muestra No. 6 del departamento de Meta (figura 38, carriles 2 al 7). Este resultado evidencia la robustez termodinámica de estos iniciadores, los cuales amplifican en un rango de temperatura de hibridación entre 52 ºC y 62 ºC.

En el año 2005 investigadores del Instituto Colombiano Agropecuario-ICA publicaron el trabajo denominado "Sistema de detección molecular del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) en Colombia", siendo el primer reporte oficial en el país de la presencia de CiLV-C como agente causal de la leprosis de los cítricos

(Moreno y Ángel, 2005). Posterior al primer reporte de detección de CiLV-C mediante RT-PCR en los departamentos de Meta y Casanare, León *et al*., 2006 corroboraron la presencia de CiLV-C en el país con el trabajo denominado "Occurrence of *Citrus leprosis virus* in Llanos Orientales" publicado en la revista Plant Disease. De igual forma, el trabajo denominado "Natural Infection of *Swinglea glutinosa* by the *Citrus leprosis virus Cytoplasmic* Type (CiLV-C) in Colombia" (León *et al*., 2008), fue el primer reporte en Colombia de leprosis de los cítricos ocasionada por CiLV-C en una planta hospedante distinta al género *Citrus*. Estos trabajos publicados entre los años 2005 y 2008, demostraron que el agente etiológico asociado a los síntomas de leprosis de los cítricos en los departamentos de Meta y Casanare Colombia fue CiLV-C.

De acuerdo con el estado actual de la distribución de la enfermedad en el país, la leprosis de los cítricos se encuentra confinada únicamente a los departamentos de Meta y Casanare (Llanos Orientales de Colombia). Entre tanto, la presencia de CiLV-C en plantas de cítricos sintomáticas en el departamento del Tolima aún no ha sido confirmada, publicada y notificada oficialmente (Bastianel *et al*., 2010).

Contrario a lo anteriormente expuesto, entre los años 2007 al 2009, el Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, el Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica realizaron la primera fase del proyecto "Desarrollo e implementación de una red nacional para certificación fitosanitaria de cítricos competente a nivel mundial" el cual analizó alrededor de 100 muestras de tejido vegetal con síntomas de leprosis de los cítricos mediante RT-PCR haciendo uso de los iniciadores específicos MPF/MPR (tabla 1) y RepF/RepR (tabla 2) (Locali *et al*., 2003). Dichas muestras fueron tomadas en plantas sintomáticas de naranja dulce (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y *Swinglea glutinosa* en los departamentos de Meta y Casanare Colombia. Es importante resaltar que estos iniciadores específicos son utilizados como herramienta de referencia por las distintas Organizaciones

Nacionales de Protección Fitosanitaria-ONPFs y centros de investigación en los países en donde se reportan plantas que exhiben síntomas de leprosis de los cítricos, lo cual permite determinar la presencia de CiLV-C asociado a los síntomas encontrados en campo. Sin embargo, los resultados de RT-PCR obtenidos a partir de la utilización de mencionados iniciadores específicos en el proyecto "Desarrollo e implementación de una red nacional para certificación fitosanitaria de cítricos competente a nivel mundial" fueron negativos a la presencia de CiLV-C en todas las muestras tomadas en los mismos puntos de muestreo en los departamentos de Meta y Casanare, en donde anteriormente reportaron a CiLV-C asociado a los síntomas de leprosis de los cítricos en Colombia (Moreno y Ángel, 2005; León *et al*., 2006; 2008). Así mismo, el análisis inmunoenzimático (ELISA) en estas mismas muestras realizados con anticuerpos policlonales contra la proteína p29 de CiLV-C, mostró resultados negativos.

El análisis realizado en la presente investigación a las 36 muestras de tejido vegetal sintomáticas de los departamentos de Meta y Casanare, entre los años 2011 al 2014, con los iniciadores específicos MPF/MPR (tabla 1) y RepF/RepR (tabla 2) (Locali *et al*., 2003) para detección de CiLV-C resultaron negativos. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante análisis de RT-PCR de los controles positivos (cDNAs CiLV-C de Brasil) utilizando los iniciadores MPF/MPR y RepF/RepR, amplificaron un fragmento de 339 pb que codifica una región de la proteína de movimiento de CiLV-C y un fragmento de 402 pb que codifica una región de la proteína de la replicasa de CiLV-C, respectivamente (resultados no presentados). De igual forma, el análisis realizado a las 36 muestras de tejido vegetal con los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R (Ochoa-Corona *et al*., 2009), que amplifican una región de 278 pb exclusiva del gen p15 de CiLV-C, resultó negativo para este virus en todas las muestras analizadas (figura 36, carriles 2 al 13, muestras analizadas mediante secuenciación), cabe resaltar que las 24 muestras restantes también resultaron negativas al análisis de RT-PCR con los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R (Ochoa-Corona *et al*., 2009) para

detección de CiLV-C (resultados no presentados). Sin embargo, los controles positivos (cDNA de CiLV-C Brasil y cDNA de CiLV-C Brasil No. 2) descargados en los carriles 17 y 18 respectivamente, amplificaron el fragmento esperado (figura 36). Las pruebas de detección mediante RT-PCR, realizadas con los iniciadores anteriormente descritos demuestran la ausencia de CiLV-C en las 36 muestras provenientes de los departamentos de Meta y Casanare. Esto se correlaciona con hallazgos de otro grupo de investigación, obtenidos mediante RT-PCR con los iniciadores MPF/MPR (tabla 1) y RepF/RepR (tabla 2) en muestras provenientes de los mismos departamentos (Roy *et al*., 2013a), al igual que los resultados obtenidos con el anticuerpo policlonal CREC-13 para detección de este virus a través de DAS-ELISA. Los resultados encontrados en la presente investigación, sugieren que la especie prevalente en Colombia es CiLV-C2, distinto a lo inicialmente reportado en donde la especie asociada a la leprosis de los cítricos en Colombia es CiLV-C (Moreno y Ángel, 2005; León *et al*., 2006; 2008).

El ensayo de detección mínima de CiLV-C con los iniciadores específicos CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R (Ochoa-Corona *et al*., 2009) mostró que es posible detectar hasta 2 ng/μL de cDNA. Así mismo, el gradiente de temperatura de hibridación de estos iniciadores se encuentra en un rango de 51 ºC a 61ºC (ver Poster, Ochoa-Corona *et al*., 2009). Estas características de la RT-PCR con los iniciadores CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R permite utilizarlos en RT-mPCR simultáneamente con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R y CiL-p32-F/CiL-p32-R.

El límite de detección mediante RT-PCR con los iniciadores específicos CiLV-C2-CPG-F y CiLV-C2-CPG-R (Roy *et al*., 2013a) para detección de CiLV-C2 es de 132,7 ng/μL de RNA total (León, 2013), más bajo que el límite de detección de los iniciadores CiL-p32-F/CiL-p32-R (30 ng/μL) y p24-T2-F/p24-T2-R (300 pg/μL). Las 36 muestras analizadas en esta investigación, resultaron negativas a CiLV-N mediante RT-PCR con los iniciadores CiLV-N-NPF/CiLV-N-NPR (tabla 4) y CiLV-N-MF/CiLV-N-MR (tabla 5) (Roy *et al*., 2014) (resultados no presentados).

4.2.4 Secuenciación de productos amplificados.

El análisis con el algoritmo Blastn® - NCBI® al fragmento de 384 pb del gen p24, amplificado y secuenciado con los iniciadores específicos p24-T2-F y p24-T2-R, en muestras provenientes de los departamentos de Meta y Casanare, mostró que la identidad de esta región diagnóstica oscila entre 93 y 99% con relación a CiLV-C2 (JX000025.1- *GenBank*®) (tabla 12). Los productos de amplificación Pr6-p24-Meta (muestra No. 6 Meta) y Pr9-p24-Meta (muestra No. 9 Meta) tienen una identidad del 93 y 95% respectivamente, con relación a CiLV-C2 (JX000025.1-*GenBank*®). Los productos Pr29-p24-Casanare (muestra No. 29 Casanare), Pr32-p24-Casanare (muestra No. 32 Casanare) y Pr33-p24-Casanare (muestra No. 33 Casanare) mantienen una relación de identidad del 98% con relación a CiLV-C2 (JX000025.1- *GenBank*®). El resto de muestras tiene una identidad del 99% con relación a CiLV-C2 (JX000025.1- *GenBank*®). De igual forma, el análisis de identidad realizado con el algoritmo Blastn® - NCBI® al fragmento de 174 pb del gen p32 amplificado y secuenciado con los iniciadores específicos CiL-p32-F y CiL-p32-R, en las mismas muestras, mostró que la identidad de esta región diagnóstica es del 99% con relación a CiLV-C2 (JX000025.1- *GenBank*®) (tabla 13). Los resultados de secuenciación corroboran la presencia de CiLV-C2 como único agente etiológico asociado a las muestras de tejido vegetal sintomático colectadas en los departamentos de Meta y Casanare.

4.2.5 Inferencia de la historia evolutiva de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de CiLV-C y aislamientos de CiLV-C2.

La inferencia de la historia evolutiva de las regiones diagnósticas realizada mediante inferencia bayesiana (figura 39), a partir de los fragmentos amplificados de los genes p24 y p32 de virus del género *Cilevirus*, permitió discriminar a CiLV-C y CiLV-C2 en dos grupos diferentes debido a su variabilidad genética, la cual se

representa en la comparación de los genes p24 y p32 de estas dos especies (Roy *et al*., 2013a). Sin embargo, entre los aislamientos que conforman el clado de CiLV-C2 no existe una congruencia geográfica, este grupo constituye una gran politomía en donde aparentemente se diferencian dos subgrupos del resto de aislamientos que se derivan del nodo politómico. El subgrupo 1, está conformado por las muestras Pr29 (muestra No. 29 Casanare), Pr32 (muestra No. 32 Casanare) y Pr33 (muestra No. 33 Casanare), procedentes del departamento de Casanare en Colombia, soportados con una probabilidad posterior de 1 (100%). El subgrupo 2 constituido por las muestras Pr6 (muestra No. 6 Meta) y Pr9 (muestra No. 9 Meta), provenientes del departamento de Meta en Colombia, las cuales se agrupan con el aislamiento de CiLV-C2 que infecta *Hibiscus* sp. en Hawaii (Melzer *et al*., 2013). Este subgrupo 2 tiene una probabilidad posterior de 0,74 (74%). Es decir, un soporte muy bajo que probablemente indique que este subgrupo se presente por un artefacto generado en la longitud tan corta de la matriz de datos creada a partir de los fragmentos diagnósticos (genes) p24 y p32.

De acuerdo a lo sugerido por el análisis de inferencia bayesiana realizado a partir de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32, es probable que en Colombia exista variabilidad intra-específica en CiLV-C2. Esta posible variabilidad se encuentra representada por el subgrupo 1 conformado por muestras del departamento de Casanare, aparentemente divergentes con relación al resto de muestras que corresponden a la misma zona geográfica y el subgrupo 2 constituido por muestras del departamento de Meta, las cuales se relacionan de forma más cercana con el aislamiento de CiLV-C2 de Hawaii que con el resto de muestras del Meta. Sin embargo, cabe resaltar que el subgrupo 2 no está bien soportado por sus valores de probabilidad posterior. La falta de representatividad de los datos, debido a el número reducido de muestras de Colombia secuenciadas en la investigación, la poca disponibilidad de secuencias de genes ortólogos p24 y p32 de *Cilevirus* almacenados en el GenBank® y el tamaño de la matriz de datos, no permiten resolver estas hipótesis (subgrupo 1 y subgrupo 2) a partir del método

de inferencia bayesiana. Por lo tanto, la poca variabilidad genética encontrada en las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 no permite recuperar dichas hipótesis en un clado resuelto.

En inferencia bayesiana filogenética la longitud de la ramas del árbol representa probabilidad de cambio esperado y esta es producto de la tasa de substitución por el tiempo transcurrido desde la divergencia. Las diferencias en las longitudes de las ramas están representando las diferencias en las probabilidades de cambio ya sea porque ha transcurrido distinto tiempo desde el ancestro común más cercano para cada una de las ramas o porque las tasas de substitución son distintas entre las ramas (Gorbalenya, 2008). Es probable que la aparente divergencia, de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de los aislamientos de CiLV-C2 se deba a diferencias sutiles en los porcentajes de identidad entre las secuencias. Por lo tanto, es importante explorar la posible divergencia entre aislamientos de CiLV-C2 con un mayor número de datos lo cual permitirá hacer una inferencia robusta sobre la historia evolutiva de los aislamientos de CiLV-C2. En busca de este objetivo, se deben utilizar genes completos o secuencias con una mayor longitud y realizar un muestreo más representativo que permitan estudiar las relaciones evolutivas de las especies y aislamientos del género *Cilevirus*.

El diagnóstico de convergencia del análisis bayesiano se evaluó teniendo en cuenta que la cadena fría no estuviera estancada y que el intervalo de la variación de los valores de esta cadena al final del análisis se mantuviera bajos. De igual forma, se contempló el valor de desviación standard (*Average standard deviation of split frequencies*) después de 10 millones de generaciones el cual debía estar por debajo de 0,01 y el valor del *Potential Scale Reduction Factor* (PSRF) cercano a 1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). También se tuvo en cuenta la distribución normal del análisis graficado en el programa Tracer® (figura 40) y el valor de tamaño efectivo de muestra (*Effective Sample Size* - ESS) mayor a 100.

A diferencia del análisis realizado mediante inferencia bayesiana, el análisis de máxima parsimonia permitió discriminar al “subgrupo 2” como un grupo o clado independiente y constituido por las muestras Pr6 (muestra No. 6 Meta) y Pr9 (muestra No. 9 Meta), provenientes del departamento de Meta en Colombia (figura 42). En el análisis bayesiano este “subgrupo 2” hace parte de una gran politomía y además se agrupa con el aislamiento de CiLV-C2 que infecta *Hibiscus* sp. en Hawaii (figura 39). El análisis de máxima parsimonia permitió separar el aislamiento de CiLV-C2 que infecta *Hibiscus* sp. en Hawaii del “subgrupo 2” (Pr6-muestra No. 6 Meta y Pr9-muestra No. 9 Meta) e igualmente separa mencionado aislamiento del resto de aislamientos de CiLV-C2 colombianos que se derivan del nodo politómico (figura 42). De la misma manera que el análisis bayesiano, el análisis de máxima parsimonia agrupó los aislamientos colombianos de CiLV-C2: Pr2, Pr3, Pr4, Pr17 del departamento del Meta y los aislamientos Pr20, Pr23, Pr27, Pr29, Pr32 y Pr33 del departamento de Casanare en una gran politomía, en donde se diferencia el “subgrupo 1”, que está conformado por las muestras Pr29 (muestra No. 29 Casanare), Pr32 (muestra No. 32 Casanare) y Pr33 (muestra No. 33 Casanare).

4.2.6 Ajustes de la metodología de transcripción reversa-reacción múltiple en cadena de la polimerasa (RT-mPCR) para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2.

Las características termodinámicas de los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R, su especificidad, su sensibilidad y los resultados obtenidos mediante RT-PCR convencional, permitieron emplearlos en un análisis simultáneo para detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 mediante RT-mPCR. De acuerdo al esquema de detección simultánea y discriminación de estas dos especies (tabla 15), es posible observar una combinación de fragmentos amplificados de distintas longitudes, los cuales indican la presencia, ausencia o coinfección de CiLV-C y CiLV-C2. Las 36 muestras de

tejido vegetal con síntomas de leprosis de los cítricos procedentes de los departamentos de Meta y Casanare fueron analizadas de manera simultánea mediante RT-mPCR con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R, resultando positivas únicamente a CiLV-C2. Esta plataforma de detección y discriminación se propone fundamentada en la amplificación de los fragmentos de 384 pb (p24) y ~174 pb (p32), para CiLV-C2, con falta en la amplificación del fragmento de 278 pb (p15) el cual es exclusivo de CiLV-C (tabla 15 y en la figura 43, carriles 2 al 13). No obstante, el análisis del control positivo Brasilero, constituido por cDNA generado a partir de una muestra de tejido vegetal de naranja dulce infectada únicamente con CiLV-C, mostró la amplificación de fragmentos de 278 pb (p15) y ~174 pb (p32), pero no del fragmento de 384 pb (p24), exclusivo de CiLV-C2 (figura 43, carril 17). De igual forma, la mezcla de cDNA de CiLV-C y cDNA de CiLV-C2, permite la amplificación de los tres fragmentos de 384 pb (p24), 278 pb (p15) y ~174 pb (p32), que simulan en este caso, la coinfección experimental de CiLV-C y CiLV-C2 (figura 43, carril 18).

5. CONCLUSIONES

Las características termodinámicas óptimas de las parejas de iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R permiten su utilización de manera individual en RT-PCR convencional y de forma simultánea en RT-mPCR con excelentes resultados en la detección y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2. Estos iniciadores amplifican en un amplio rango de temperatura de hibridación, lo cual reduce el riesgo de error de la prueba asociado a fallas en la calibración del termociclador y ensayos de modificación de variables de la prueba. Lo anterior convierte a estos iniciadores en excelentes herramientas diagnósticas para programas de mejoramiento genético, regulación y certificación fitosanitaria.

Todas las muestras analizadas en la investigación resultaron positivas a CiLV-C2 y negativas a CiLV-C, al igual que a CiLV-N. Estos resultados demuestran, que hasta el momento, CiLV-C2 es el agente etiológico prevalente asociado a los síntomas de leprosis de los cítricos en los departamentos de Meta y Casanare en Colombia.

La inferencia de la historia evolutiva de las regiones diagnósticas (genes) p24 y p32 de virus del género *Cilevirus* permite discriminar y confirmar que CiLV-C y CiLC-C2 constituyen dos grupos diferentes. Sin embargo, la poca información generada con regiones diagnósticas cortas (menores de 300 pb) y la falta de representatividad de los datos, impiden hacer inferencias sobre la diversidad genética intra-específica de CiLV-C2.

Se desarrolló un sistema para detección simultánea y discriminación de CiLV-C y CiLV-C2 mediante RT-mPCR con iniciadores específicos de utilidad en bioseguridad agrícola.

6. RECOMENDACIONES

Es necesario diseñar y validar una pareja de iniciadores específicos que detecte a CiLV-N y pueda ser utilizada simultáneamente con los iniciadores p24-T2-F/p24-T2-R, CiL-p32-F/CiL-p32-R y CiLV-C-p15F/CiLV-C-p15R, para detección y discriminación de CiLV-C, CiLV-C2 y CiLV-N mediante RT-mPCR.

El estudio de las relaciones evolutivas de las distintas especies de virus que causan leprosis de los cítricos permitirá avanzar en el entendimiento de aspectos relacionados con las interacciones vector-patógeno-planta e inferir sobre la posible variación de los aislamientos colombianos.

Es indispensable realizar un estudio de distribución de la enfermedad en el país, con un diseño estadístico que incluya un número significativo de muestras que permitan evaluar el estado de la enfermedad en Colombia con relación a sus hospedantes, nuevos vectores, diversidad genética de los agentes etiológicos y coinfecciones de las especies que causan leprosis de los cítricos, así como hospedantes alternos y ciclo biológico de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403–410.

Antonioli-Luizon, R., Freitas-Astúa, J., Locali, E.C., Rodrigues, V., Astúa-Monge, G., Kitajima, E.W., e Machado, M.A. 2004. Viabilidade da detecção do vírus da leprose, tipo citoplasmático, em amostras foliares de citros armazenadas. LARANJA, Cordeirópolis, v.25, n.2: 357-366.

Arif, M., and Ochoa-Corona, F. M. 2013. Comparative Assessment of 50 A/T-Rich Overhang Sequences with Optimal and Sub-optimal Primers to Increase PCR Yields and Sensitivity. Mol Biotechnol, 55: 17–26.

Bastianel, M., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E.W. & Machado, M.A. 2006. The citrus leprosis pathosystem. Scielo, 32: 211-220.

Bastianel, M., Novelli, V., Kubo, K., Kitajima, E.W., Bassanezi, R., Machado, M.A., Freitas-Astúa, J. 2010. Citrus Leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. Plant Disease 94(3): 284-292.

Bitancourt, A. A. 1934. Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de Fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. Arq. Inst. Biol. 5:185-196.

Bitancourt, A. A. 1940. A leprose dos citrus. O Biol. 6:39-45.

Bitancourt, A. A. 1955. Estudos sobre a leprose dos citros. Arq. Inst. Biol. 22: 161 231.

CABI, 2014. *Citrus leprosis virus C*. In: Crop Protection Compendium. Wallingford , UK: CAB International. www.cabi.org/cpc.

Calegario, R. F., Locali, E. C., Stach-Machado, D. R., Peroni, L. A., Caserta, R., Salaroli, R. B., Freitas-Astúa, J., Machado, M. A., and Kitajima, E. W. 2013. Polyclonal antibodies to the putative coat protein of *Citrus leprosis virus C* expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. Tropical Plant Pathology 38: 188-197.

Carstens, E. B. 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). Archives of Virology 155 (1): 133-146.

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

Chagas, C. M., Rossetti, V. V., and Chiavegato, L. G. 1984. Effectiveness of the different life cycle stages of *Brevipalpus phoenicis* Geijskes in leprosis transmission. Pages 211-214. In: Proc. 9th Conf. Int. Org. Citrus Virol. S. M. Garnsey, L. W. Timmer, and J. A. Dodds, eds. IOCV, Riverside, USA.

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.

Choudhary, N., Roy, A., Guillermo, L. M., Picton, D. D., Wei, G., Nakhla, M. K., Levy, L., and Brlansky, R. H. 2013. Immunodiagnosis of Citrus leprosis virus C using a polyclonal antibody to an expressed putative coat protein. Journal of Virological Methods 193 (2):548-553.

Dietzgen, R. G., Kuhn, J. H., Clawson, A. N., Freitas-Astua, J., Goodin, M. M., Kitajima, E. W., Kondo, H., Wetzel, T., and Whitfield, A. E. 2014. *Dichorhavirus*: a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. Arch Virol. 159 (3): 607-619.

Fawcett HS. 1911. Scaly bark or nail-head rust of citrus. *Florida Agriculture Experiment Station Bulletin*. 106: 3-41.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 38: 783-791.

Gorbalenya, A.E., 2008. Phylogeny of Viruses. In: Mahy, B.W.J. and Van Regenmortel, 2010. Desk Encyclopedia of General Virology. Elsevier, San Diego: 66-69.

Groot, T. V. M., Freitas-Astúa, J., and Kitajima, E. W. 2006. *Brevipalpus phoenicis* transmits Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) to common bean (*Phaseolus vulgaris*) under experimental conditions. Virus Rev. Res. 11 (Suppl. 1): 67-68.

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.

Kitajima EW, Chagas CM, Harakava R, Calegario RF, Freitas- Astúa J, Rodrigues JCV, Childers CC. 2011. Citrus leposis in Florida, USA, appears to have been caused by the nuclear type of citrus leprosies virus (CiLV-N). Virus Rev. Res. 16: 23–27.

Kitajima, E.W., Chagas, C.M., Rodrigues, J.C.V. 2003. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases cytopathology and some recent cases. Experimental and Applied Acarology 30: 135–160.

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

Knorr LC. 1959. Presenting *Brevipalpus* mites and some questions that they pose. *Citrus Magazine*. 21: 8-22.

Kondo H, Maeda T, Shirako Y, Tamada T. 2006. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. J. Gen. Virol. 87: 2413–2421.

Kondo H, Maeda T, Tamada T. 2003. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. Exp Appl Acarol 30: 215–223.

Kubo KS, Novelli VM, Bastianel M, Locali-Fabris EC, Antonioli-Luizon R, Machado MA, Freitas-Astúa J. 2011. Detection of *Brevipalpus*-transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR. Exp Appl Acarol 54: 33–39.

León M.G. 2013. Eficiencia de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C por ácaros vectores *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) en Colombia. Universidad Nacional de Colombia-Facultad de Ciencias Agrarias, sede Bogotá. Tesis Doctoral.

León, M.G., Becerra, C.H., Freitas-Astúa, J., Salaroli, R.B. & Kitajima, E.W. 2008. Natural Infection of *Swinglea glutinosa* by the *Citrus leprosis virus Cytoplasmic* Type (CiLV-C) in Colombia. Plant Disease 92: 1364-1364.

León, M.G., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E.W., Meza, N.C. 2006. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria 7(2): 67-72.

León, M.G., Realpe, C.E., Garzón, P.A., Rodriguez, J.A., Moreno, M.G., Childers, C.C., Achor, D., Freitas-Astua, J., Antonioli-Luizon, R., Salaroli, R.B., Mesa, N.C. y Kitajima, E.W. 2006. Occurrence of *Citrus leprosis virus* in Llanos Orientales, Colombia. Plant Disease 90: 682-682.

Locali-Fabris, E.C., Freitas-Astúa J, Machado MA. 2012. Genus Cilevirus. In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (eds) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego: 1139–1142.

Locali, E.C., Freitas-Astua, J., Souza, A.A., Takita, M.A., Astúa-Monge, G., Antonioli-Luizon, R., Kitajima, E. W. y Machado, M.A. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. Plant Disease 87: 1317-1321.

Locali-Fabris, E.C., Freitas-Astua, J., Souza, A.A., Takita, M.A., Astúa-Monge, G., Antonioli-Luizon, R., Rodrigues, V., Targon, M. L. y Machado, M.A. 2006. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of *Citrus leprosis virus cytoplasmic* type. Journal of General Virology 87: 2721-2729.

Lovisolo, O. 2001. Citrus leprosis virus: properties, diagnosis, agro-ecology and phytosanitary importance. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 31: 79-89.

Manthey, J. 2005. mFold, Delta G, and Melting Temperature: What Does it Mean?. Integrated DNA Technologies Bioinformatics Group: 1-8.

Marques, J. P. R., Freitas-Astúa, J. d., Kitajima, E. W., and Appezzato-da-Glória, B. 2007. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.42, n.11: 1531-1536.

Marques, J.P., Kitajima, E.W., Freitas-Astúa, J. & Appezzato-da-Glória, B. 2010. Comparative morpho-anatomical studies of the lesions caused by *citrus leprosis virus* on *sweet orange*. Anais da Academia Brasileira de Ciências 82: 501-511.

Melzer, MJ, Sether, DM, Borth, WB, and Hu, JS. 2012a. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. Phytopathology 102:122-127.

Melzer, MJ, Sether, DM, Borth, WB, and Hu, JS. 2012b. Template for taxonomic proposal to the ICTV executive committee to create a new unassigned genus-Higrevirus. ICTV-EC. 2012.011a-dP.

Melzer, M.J., Simbajon, N., Carillo, J., Borth, W.B., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E.W., Neupane, K.R., Hu, J.S. 2013. A *cilevirus* infects ornamental hibiscus in Hawaii. 2013. Archives of Virology 158: 2421-2424.

Menzel W, Jelkmann W, Maiss E, 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. Journal of Virological Methods 99: 81–92.

Moreno, M. y Ángel, J. 2005. Sistema de detección molecular del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) en Colombia. Laboratorio Nacional de Análisis Molecular - Instituto Colombiano Agropecuario. ICA Informa, Julio-Diciembre: 32: 26-29. No. 2 – ISSN: 0046 – 9920.

Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Antonioli-Luizon, R., Locali, E. C., Arrivabem, F., Hilf, M. E., Gottwald, T. R., and Machado, M. A. 2005. Detecção do vírus da leprose do citros (CiLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). Fitopatol. Bras. 30: 183.

Nunes, M. A., de Oliveira, C. A. L., de Oliveira, M. L., Kitajima, E. W., Hilf, M. E., Gottwald, T. R., and Freitas-Astúa, 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.

Ochoa-Corona, F.M., Arif, M., Locali-Fabris, E.C., Freitas-Astúa, J. 2009. An RT-PCR procedure for detection and surveillance of *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) in post-entry quarantine stocks of citrus. p.34. En: Bulletin of the American Physical Society. APS. Pittsburgh. Poster.

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., Junior, H., Oliveira, F., Giachetto, P., Ferrari, F., Aguilar-Vildoso, C., Franchiscini, F., Silva, J., Arruda, P., Ferro, J., Reinach, F., y Da Silva, Ana 2006.The Complete nucleotide sequence and genomic organization of citrus leprosis associated virus, cytoplasmatic type (CiLV-C). Virus Genes 32: 289-298.

Peng, D., Zheng, G., Zheng, Z., Tong, Q., and Ming, Y. 2013. Orchid fleck virus: an unclassified bipartite, negative-sense RNA plant virus. Archives of Virology 158 (2): 313-323.

Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution 25 (7): 1253–1256.

Robert E., 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, Nucleic Acids Research 32 (5): 1792-1797.

Rodrigues, J., and Childers, C. 2013. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. Experimental and Applied Acarology 59 (1-2): 165-175.

Rodrigues, J.C.V., Kitajima, E.W., Childers, C.C. and Chagas, C.M. 2003. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in citrus in Brazil. Exp. Appl. Acarol. 30: 161–179.

Rodrigues, J. C. V, Locali, E. C., Freitas-Astúa, J., and Kitajima, E. W. 2005. Transmissibility of Citrus leprosis virus by *Brevipalpus phoenicis* to *Solanum violaefolium*. Plant Dis. 89: 911.

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). Proceedings of the Conference on International Organizations in Citrus Virology 14: 174–178.

Ronquist F. and Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics (12): 1572-4.

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. 2013a. A novel virus of the genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus leprosis. Phytopathology 103: 488-500.

Roy, A., Leon, M. G., Stone, A. L., Schneider, W. L., Hartung, J., and Brlansky, R. H. 2014. First Report of Citrus leprosis virus nuclear type in sweet orange in Colombia. Plant Disease: 02-14-0117-PDN.

Roy A., Shao J., Hartung JS, Schneider W and Brlansky RH. 2013b. A Case Study on Discovery of Novel Citrus Leprosis Virus Cytoplasmic Type 2 Utilizing Small RNA Libraries by Next Generation Sequencing and Bioinformatic Analyses. J Data Mining Genomics Proteomics 4: 129.

Roy A, Stone A, Otero-Colina G, Wei G, Choudhary N, Achor D, Shao J, Levy L, Nakhla MK, Hollingsworth CR, Hartung JS, Schneider WL, Brlansky RH. 2013c. Genome assembly of citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with *Orchid fleck virus*. Genome Announc. 1 (4): 1-2.

Rozen, S., & Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: S. Krawetz & S. Misener (Eds.), Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology (pp. 365–386). Totowa, NJ: Humana Press.

Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg P.E., Stromberg, V.K., and Vidaver A.K. 2006. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Systematic and Applied Microbiology 29 (8): 690–695.

Spegazzini, C. 1920. Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de “agrios” en el Paraguay. Ann. Soc. Cient. 90: 155-188.

Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

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. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Zeman V. 1932. [*Lepra explosiva'of orange.*] Universidad Nacional del Litoral, Faculdad de Agronomia Ganadeira y Industrias Afines. Corrientes (AR) (in Spanish).

Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Research, 31: 3406–3415.

ANEXOS

Anexo A
Extracción de RNA total con el protocolo TRIzol® Reagent

Según el protocolo del estuche comercial Reagent Invitrogen® Cat. No. 15596-026.

1- Pulverizar la muestra (80 mg) y homogenizarla en 1 mL de TRIzol® usando vortex.

2- SEPARACIÓN DE FASES. Incubar la muestra homogenizada por 5 minutos a 25 ºC, adicionar 200 µL de cloroformo por 1 mL de TRIzol®. Agitar los tubos vigorosamente con la mano por 15 segundos e incubar los viales a 25 ºC, durante 3 minutos.

3- Centrifugar las muestras a 12.000 x *g* por 15 minutos a 4 ºC. Después de la centrifugación la muestra se separa en una fase inferior roja, fenol-cloroformo, 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®.

4- PRECIPITACIÓN DE RNA. 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 a 25 ºC por 10 minutos y centrifugar a 12.000 x *g* durante 10 minutos a 4 ºC. El RNA precipitado después de la centrifugación a menudo es invisible, es decir como un pequeño gel de forma circular (pellet) en la pared del fondo del tubo.

5- LAVADO DEL RNA. Se remueve el sobrenadante y se lava el pellet una sola vez con etanol al 75%, adicionando como mínimo 1 mL de etanol por 1 mL de TRIzol®. Luego se mezcla la muestra con vortex y se centrifuga a 7.500 x *g* durante 5 minutos a 4 ºC.

6- RESUSPENSIÓN DEL RNA. Para finalizar el proceso se seca brevemente el pellet RNA a temperatura ambiente durante 10 minutos, se resuspende en 50 µL de agua ultra pura y se almacena a -20 ºC.

Anexo B
Protocolo de purificación a partir de producto de PCR

Según el estuche comercial *PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit de Invitrogen®*

1- Adicionar 4 volúmenes de buffer de homogenización (*Binding Buffer*) (B2) a 1 volumen de reacción o producto de PCR (50–100 µL) y mezclar bien.

2- Poner una columna (*PureLink® Clean-up Spin Column*) en un tubo de lavado.

3- Adicionar la muestra del paso 1, a la columna.

4- Centrifugar la columna, con los productos de PCR, a temperatura ambiente a 10.000 × *g* durante 1 minuto.

5- Descartar el líquido del tubo de lavado y poner nuevamente la columna en el mismo tubo.

6- Adicionar 650 µL de buffer de lavado con etanol a la columna.

7- Centrifugar la columna a temperatura ambiente a 10.000 × *g* durante 1 minuto. Descartar el líquido del tubo de lavado y poner nuevamente la columna en el mismo tubo.

8- Centrifugar la columna a velocidad máxima y a temperatura ambiente durante 3 minutos para remover cualquier residuo de buffer de lavado. Posteriormente descartar el tubo de lavado.

9- Poner la columna en un tubo de elución de 1,7 mL limpio (*PureLink® Elution Tube*) proporcionado en el estuche.

10- Adicionar 50 μL de buffer de elución (*Elution Buffer*) (E1), o agua ultra pura-grado molecular, al centro de la columna.

11- Incubar la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto.

12- Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 1 minuto.

13- El tubo de elución contiene el producto de PCR purificado. Remover y descartar la columna. El volumen de producto purificado recuperado es ~48 μL.

Anexo C
Protocolo de precipitación y conservación de RNA total y cDNA a – 80 ºC

1- Medir el volumen de RNA total o cDNA.

2- Adicionar 1/10 volúmenes de Acetato de Sodio (3 M, pH: 5,2).

3- Mezclar bien con vortex.

4- Adicionar 2,5 volúmenes de Etanol frío al 100%.

5- Mezclar bien con vortex.

6- Almacenar a – 80 ºC

Anexo D

Secuencias de las regiones diagnósticas y controles positivos amplificados

Secuencia nucleotídica del producto amplificado (384 pb) con los iniciadores específicos p24-T2-F y p24-T2-R

>Pr2-p24-Meta

AAAAGTTCCCACTCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

>Pr3-p24-Meta

AAAAGTTCCCACTCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

>Pr4-p24-Meta

AAAAGTTCCCACTCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

>Pr6-p24-Meta

AAAAGTTCCCACTCACCCAGTCAACAAAGTAGAAAGGGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCCACACCCCTTTTCAGGATGACTTCTTTTGATCTTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTGAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATTTACCGAAGATACTCTATGTTTCTTCA
ATATTTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGATATTTTAATTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATGCATGGAAAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGAGTATTTGATTTTTTTCTCTTCTATCTGG
GATCAGA

>Pr9-p24-Meta

AAAAGTTCCCACTCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGGGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCAACAACCCTTTTCAGGATGACTTCTTTTGATCTTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTGAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATTTACCGAAGATACGCTATGTTTCTTCA
ATATTTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGATATTTTAATTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATGCATGGAAAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTGATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

>Pr17-p24-Meta

AAAAGTTCCCACTCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

>Pr20-p24-Casanare

AAAAGTTCCCACTCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCAAGCTGG
GATCAGA

>Pr23-p24-Casanare

AAAAGTTCCCACTCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCAAGCTGG
GATCAGA

>Pr27-p24-Casanare

AAAAGTTCCCACTCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTTG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCTTCATGAATACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

>Pr29-p24-Casanare

AAAAGTTCCCCATCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTCG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCGTCATGAACACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

>Pr32-p24-Casanare

AAAAGTTCCCCATCATCCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTCG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCGTCATGAACACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

>Pr33-p24-Casanare

AAAAGTTCCCCATCAACCAGTCAACAAAGTTGAAAGAGTTGTTAACCGCGTCG
GTGGTCAACAATCCTTTTCGGGTTGACTTCTTTTGATTCTTCCGGGGTTTTTGT
TACGGCTTCTTTTCCCCGTGAGTGTAGAAACCGTTTTGAGCGTTTATTTAAGC
GTATGCTTGTATATTCGTTCATTATTATATCCTGAAGATACTCTTTGTTTCTTCA
ATATCTCTGAGGTTTTCTATGGATTCTTTCCTCAGACATTTCAACTTTGAATCCT
ACATATTCGTCATGAACACATACATGGATAATATGTATTCCGGTCGTTGTCAGC
TGGGAGGGGTTTAAATTCCCTAATGATTAGTTAATTTATTTCTCTTCTAGCTGG
GATCAGA

Secuencia nucleotídica del producto amplificado (~174 pb) con los iniciadores específicos CiL-p32-F y CiL-p32-R

>Pr2-p32-Meta

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr3-p32-Meta

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr4-p32-Meta

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr6-p32-Meta

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr9-p32-Meta

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr17-p32-Meta

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr20-p32-Casanare

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr23-p32-Casanare

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr27-p32-Casanare

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr29-p32-Casanare

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr32-p32-Casanare

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

>Pr33-p32-Casanare

TCCATTCCGAATGAGGATCGTATCTCTATTGGGGGAAACGAGACTCATAGAAG
ATTAGGTATATCCTATGAGATTGAGCACTCTGAGAACCTTGGTGGTGGGCATA
TCACATTTTTCACACTTACTTTGTTGTGGCGTGAAGCGTTTTCATTGCGACCAT
CCTTTTATAAGGTGTA

Secuencia nucleotídica del producto del control positivo (~174 pb), CiLV-C-Brasil, amplificado con los iniciadores específicos CiL-p32-F y CiL-p32-R

>Pr-p32-Control_Positivo-Brasil

ACTTCAGATCCATTCCGAATGAGGACAGGACTCATGTTAATGGATCTGAAGTT
CACAGGCGGCTTGGTATACAGTATCAAGTTGACTGTGATAATATTTCAGGTCG
TGTAACAACCTTTTCGATCACTGCACTATGGCGCGAGGCTTTTTCGTTTCGAC
CATCCTTTTATAAGGTGTAACTGAAGTTCACAGGCTGCTTGGTATACAGTATC

Secuencia nucleotídica del producto del control positivo (278 pb), CiLV-C-Brasil, amplificado con los iniciadores específicos CiLV-C-p15F y CiLV-C-p15R

>Pr-p15-Control_Positivo-Brasil

TCGAGTGTGATTTTATTACCTCTATAGATCCACTCGTGCATGATTACGCGATTT
ATCATTCTTTATCTCAAAAGACCGTTCTCGAGATGCTTCAGACGCACTTGGTTG
CCGGGCCAGATGCATCTGAAACAATTCGAAGACAGGTTGCCTTTCTCATTTAT
GACTTTCACAGGTTATCCTGTAATTGTGATAAATGTTATGGGGATTGCAATGCT
ACCACTACCGGTAGATTCAAGGTGGTCGA