

## ARTÍCULO TÉCNICO

Guillermo León<sup>1</sup>, Juliana Freitas-Astúa<sup>2</sup>,  
Elliot W. Kitajima<sup>3</sup> y Nora Cristina Meza<sup>4</sup>

## ABSTRACT

**Detection of the Cytoplasmic Citrus  
Leprosis Virus in the easter plains of  
Colombia**

Symptoms of citrus leprosis were observed during 2004 - 2005 in the East plains of Colombia, Departments of Meta and Casanare. To identify the causal agent, CORPOICA collected leaves of Valencia sweet orange exhibiting typical lesions of leprosis from several locations in the Departments of Casanare (Yopal, Aguazul) and Meta (Guamal, Villavicencio and Cumaral). Virus identification was done by RT-PCR and transmission electron microscopy (TEM). Ten of the 21 samples examined by TEM resulted positive to the leprosis virus (Citrus Leprosis Virus, CiLV-C). Short bacilliform particles characteristic of CiLV-C were found in the endoplasmic reticulum, and irregularly shaped viroplasms were present in the cytoplasm. Fourteen of the 32 samples processed by RT-PCR were positive to CiLV-C. RT-PCR analyses amplified cDNA fragments of expected size for samples collected in Meta. One of the amplifications was sequenced (GenBank accession No. DQ272491) and found to have 98% nucleotide sequence identity to the Brazilian CiLV-C isolate (GenBank accession No. AY289190.1). Sequence and primers were provided to ICA for CiLV-C diagnosis in Colombia. Mites collected from affected plants were identified as *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), one of the most important vectors of CiLV-C.

*Key words:* CiLV-C, Colombia, leprosis, citrus disease, Rhabdovirus.

Recibido: septiembre 12 de 2006.  
Aceptado: diciembre 4 de 2006.

1. Investigador especialista asistente, Centro de Investigación La Libertad, Villavicencio (Meta), CORPOICA. e-mail: gleon@corpoica.org.co

2. Investigadora, Cassava and Tropical Fruits, CAPTASM-IAC, EMBRAPA CP4, 13490-970, Cordeirópolis, SP, Brasil. e-mail: jfastua@centrodecitricultura.br

3. Investigador, departamento de Entomología, Fitopatología e Zoología agrícola, LEF-ESALQ/USP, CP 9, 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil. e-mail: ewkitaji@carpa.ciagri.usp.br

4. Docente, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ciencias Agrícolas, Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. e-mail: nmeza@palmira.unal.edu.co

## Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia

## RESUMEN

Durante los años 2004 y 2005 se observaron síntomas de la leprosis de los cítricos en los departamentos de Meta y Casanare. Para confirmar la causa de esta sintomatología, se colectaron hojas de naranja 'Valencia' con lesiones típicas en municipios de Casanare (Yopal y Aguazul) y Meta (Guamal, Villavicencio y Cumaral). Las muestras fueron procesadas para identificar el virus por medio de microscopía electrónica de transmisión (MET) y transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Diez de las 21 muestras analizadas por MET resultaron positivas para el virus de la leprosis (*Citrus Leprosis Virus*, CiLV-C). En algunas muestras se observaron partículas baciliformes características del CiLV-C en el retículo endoplasmático y formas irregulares de viroplasmas en el citoplasma. Catorce de las 32 muestras procesadas por RT-PCR resultaron positivas al CiLV-C. Los análisis RT-PCR amplificaron fragmentos de cADN del tamaño esperado para las muestras colectadas en el Meta. Una de las ampliaciones fue secuenciada (GenBank accesión No. DQ272491) y la secuencia obtenida guarda identidad del 98% con la secuencia brasilera aislada de nucleótidos para CiLV-C (GenBank accesión No. AY289190.1). La secuencia obtenida y los *primers* fueron entregados al Instituto Colombiano Agropecuario –ICA– para el diagnóstico del virus CiLV-C en Colombia. Entre los ácaros recolectados en las plantas afectadas se identificó a *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) reconocido como principal vector de CiLV-C.

*Palabras clave:* CiLV-C, Colombia, enfermedad de cítricos, vector, Rhabdovirus.

## INTRODUCCIÓN

LA LEPROSIS DE LOS CÍTRICOS es una enfermedad producida por un virus tipo baciliforme que afecta principalmente naranjos y mandarinos (Rodrigues *et al.*, 2003). La leprosis ha incrementado su importancia económica en América puesto que se ha comprobado su dispersión por varios países de Centro y Suramérica, especialmente durante los últimos 15 años (Freitas-Astúa *et al.*, 2005). Por causa de esta enfermedad cuarentenaria hay severas restricciones en los mercados internacionales de fruta fresca por parte aquellos países en donde no ha sido reportada, especialmente en Norteamérica, Europa y Asia.

La presencia del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático (CiLV-C) se sospechó en Colombia en el año 2004 luego de observar varios árboles de naranja con síntomas clásicos en los departamentos de Meta y Casanare, en la región de los Llanos Orientales. Durante los años 2004 y 2005, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –CORPOICA– y el Instituto Colombiano Agropecuario –ICA– observaron síntomas similares a los causados por la leprosis de los cítricos en varios huertos

de cítricos de los departamentos citados, lo cual representa una seria amenaza para la citricultura nacional, puesto que dichos síntomas no se habían reportado en otras regiones productoras de cítricos del país. Aún cuando el ácaro rojo plano *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes), vector del CiLV-C, se encuentra registrado y disperso en varias zonas del país desde hace más de tres décadas (Posada, 1989), el virus no había sido observado antes en Colombia (León *et al.*, 2005).

El CiLV-C ha causado pérdidas económicas en Argentina, Brasil, Uruguay, Panamá, Venezuela y está registrado en Bolivia, Perú, Guatemala, Honduras y Costa Rica. En Brasil es la enfermedad viral más importante en cítricos y los costos del control del ácaro transmisor suman cerca de 100 millones de dólares al año (Rodrigues *et al.*, 2003; Bastianel *et al.*, 2006; Freitas-Astúa *et al.*, 2005; Zúñiga y Ramírez, 2002). En Estados Unidos el patógeno fue registrado en el estado de La Florida a fines de 1800 y estuvo cerca de destruir la industria citrícola; luego, debido a condiciones climáticas y programas de control del ácaro vector, la enfermedad no se ha vuelto a reportar en ese país desde 1968 (Childers *et al.*, 2003).

En Colombia existen alrededor de 55.000 hectáreas cultivadas en cítricos que producen cerca de 1.000.000 toneladas de fruta fresca y unas 150.000 toneladas para el procesamiento, la mayoría para consumo interno (Espinal *et al.*, 2005). Gran parte de la producción nacional proviene del Eje Cafetero, zona localizada entre las cordilleras central y occidental en los departamentos de Antioquia, Caldas, Quindío y Risaralda. Los departamentos de Meta y Casanare se localizan al este de la cordillera oriental y, aunque se encuentran separados del eje cafetero por las cordilleras central y oriental, poseen cerca de 5.500 hectáreas sembradas en cítricos que aportan aproximadamente el 10% de la producción nacional.

Los Llanos Orientales tienen un gran potencial para la producción de cítricos en Colombia debido a sus condiciones edafoclimáticas y a su cercanía con el mercado de Bogotá, principal centro de consumo de cítricos del país. Durante la década del 90, la región de Colombia con mayor crecimiento en área sembrada en cítricos fue los Llanos Orientales, con un crecimiento promedio del 12,34% anual (MADR-ICA, ASOHFRUCOL, 2002). De acuerdo con la Secretaría de Agricultura del Meta, en el año 2004 existían en dicho departamento 4.500 ha sembradas en cítricos, que se encontraban amenazadas por la presencia del CiLV-C. El valor de dicha producción se calcula en \$180.000 millones de pesos anuales.

Teniendo en cuenta que los Llanos Orientales comprenden una amplia región apartada del Eje Cafetero por dos cadenas montañosas, es necesario adelantar el diagnóstico de la situación actual de la leprosis de los cítricos en las zonas donde aún se encuentra confinada la enfermedad, como base para adelantar programas de control y erradicación locales y para prevenir la diseminación de del virus desde los Llanos Orientales hacia las demás regiones productoras de cítricos en Colombia.

Los primeros trabajos de detección molecular del virus de la leprosis de los cítricos en Colombia fueron realizados en el laboratorio de análisis molecular del ICA. En dichos trabajos se logró estandarizar la técnica de detección molecular para el virus y se obtuvieron resultados positivos para muestras provenientes de Brasil. Sin embargo, no se logró obtener

la amplificación esperada para el gen de la proteína en movimiento del CiLV en las muestras provenientes de Colombia. De acuerdo con dichos resultados, los autores sugirieron determinar mediante técnicas de microscopía electrónica si el virus de la leprosis de los cítricos en Colombia es nuclear o citoplasmático y analizar molecularmente secuencias del virus correspondiente a aislamientos colombianos (Moreno y Ángel, 2005).

El objetivo del presente trabajo fue efectuar, por medio de microscopía electrónica (MET) y técnicas moleculares como la transcripción reversa con reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), el diagnóstico del virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C en los departamentos de Meta y Casanare. Adicionalmente, confirmar la presencia del virus y del ácaro transmisor *B. phoenicis* en plantas de naranja 'Valencia' procedentes de cinco municipios productores de cítricos en los departamentos mencionados. Finalmente, determinar la eficacia del método molecular como herramienta de diagnóstico del CiLV-C para Colombia.

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Para confirmar la presencia de la leprosis de los cítricos, enfermedad previamente registrada por identificación visual de los síntomas observados en árboles de naranja de huertos de los Llanos Orientales, se colectaron muestras de hojas de naranja 'Valencia' con lesiones típicas producidas por el virus (CiLV) en cinco municipios de los departamentos de Casanare y Meta (Colombia). Adicionalmente, para identificar y constatar la presencia del virus, fueron tomadas muestras al azar del ácaro *B. phoenicis* presentes en árboles de naranja 'Valencia' con síntomas de la enfermedad.

En el departamento del Meta se recolectaron las hojas en huertos de naranja ubicados en los municipios de Villavicencio, Lejanías y Guamal. En el municipio de Lejanías se tomaron las muestras en las fincas La Aurora y El Jardín; en el municipio de Guamal se muestrearon las fincas El Triunfo y La Carolina, mientras que en el municipio de Villavicencio se tomaron muestras del huerto de cítricos del Centro de Investigación La Libertad. En el departamento de Casanare las muestras fueron colectadas en huertos de naranja 'Valencia' ubicados en las

fincas La Talanquera y La Parcela pertenecientes al municipio de El Yopal, y en las fincas Villaflores y La Esperanza del municipio de Aguazul. Todos los árboles muestreados y analizados se posicionaron geográficamente (GPS).

Las muestras colectadas fueron procesadas en el Laboratorio de Entomología de CORPOICA en el Centro de Investigación La Libertad y se codificaron para el diagnóstico posterior por MET y RT-PCR.

Para el análisis por MET se seleccionaron 22 cortes de tejido sintomático de tamaño 5 x 2 mm. Dichos cortes fueron procesados y aislados en tubos de microcentrifugación Eppendorf con solución de paraformaldehído/glutaraldehído al 3% y posteriormente se enviaron debidamente codificados al laboratorio de microscopía electrónica en la Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) de la Universidad de Sao Paulo (Brasil), en donde fueron fijados en solución 1% de OsO<sub>4</sub> en tampón cacodilato 0,05 M de pH 7,2 por 1 hora; luego fueron deshidratados en concentración creciente de acetona infiltrada y montados en bloques de resina epóxica. Los bloques fueron seccionados en un ultramicrotomo Leica UC6<sup>®</sup> equipado con cuchilla de diamante. Las secciones fueron montadas en rejillas de 100 mesh cubiertas con película de Formvar, teñidas con acetato de uranilo 3% y citrato de plomo de Reynold. Todos los cortes se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900<sup>®</sup>.

Para la detección del virus mediante el diagnóstico molecular de RT-PCR, las muestras colectadas de hojas con síntomas de leprosis fueron secadas a 35°C en el Laboratorio de Entomología del C.I. La Libertad, conforme el procedimiento de Antonioli-Luizon *et al.* (2004); posteriormente se seleccionaron, codificaron y enviaron 32 aislamientos de tejido vegetal deshidratado en bolsas de papel numeradas al laboratorio de Biotecnología del Centro APTA Citros Sylvio Moreira en Brasil.

Para el diagnóstico molecular, se realizó una extracción de ARN de 50 a 100 mg de tejido sintomático, de acuerdo con lo descrito por Locali *et al.* (2003). Las muestras fueron maceradas en nitrógeno líquido; luego de la maceración se adicionaron 500 µL de solución tampón

de lavado (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8; 2 M NaCl; 0,05% BSA). Las muestras fueron sometidas a vortex y centrifugadas en microcentrífuga a velocidad máxima por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y se adicionaron 600  $\mu$ L de tampón de extracción peletizado [2% TAB (hexadeciltrimetilamonium bromide); 1,4 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 8; 0,5%  $\beta$ -mercaptoetanol]. Después de una nueva resuspensión en vortex, las muestras fueron incubadas a 55°C por 15 a 30 minutos y entonces sometidas a 400  $\mu$ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezcladas por vortex y centrifugadas a velocidad máxima por 5 minutos. La fase acuosa fue transferida a otro tubo y se le adicionó 0,1 en volumen de 7,5 M de acetato de amonio y 1 volumen de isopropanol. Las muestras fueron incubadas a -20°C por 15 min centrifugadas a velocidad máxima por 5 min y lavadas con alcohol 70%. El pellet se secó al aire y fue resuspendido en 25  $\mu$ L de agua tratada con dietil pirocarbomato (DEPC). La concentración y la pureza del ARN fueron estimadas en espectrofotómetro y gel de agarosa desnaturalizada [1% agarosa; 6,7% formaldeído, MOPS 10X (200 mM morfolino-propanosulfonato; 5 mM acetato de sodio; 10 mM EDTA) y agua DEPC]. Las muestras fueron mantenidas en refrigeración a temperatura de -80°C.

Los análisis RT-PCR fueron conducidos utilizando 1  $\mu$ L de enzima M-MLV-RT (Invitrogen<sup>®</sup>), 1,5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 5  $\mu$ L de ARN total y 100 ng de *primers* randómicos. Las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C por 10 min y colocadas en gel. Luego de algunos minutos se adicionó 4  $\mu$ L de tampón 5X; 1  $\mu$ L de 10 mM dNTP mix; 0,5  $\mu$ L de DTT 2 mM; 1  $\mu$ L (15 U) del inhibidor de ARNse (ARN sin Invitrogen<sup>®</sup>); 1  $\mu$ L (200 U) de M-MLV-RT (Invitrogen<sup>®</sup>) y agua estéril para un volumen final de 20  $\mu$ L. Las reacciones fueron incubadas a 37°C por 2 h.

Todas las amplificaciones RT-PCR fueron hechas utilizando un termociclador PTC 100<sup>®</sup> (MJ Research, Waltham, MA). Las reacciones consistieron en 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP mix (Invitrogen<sup>®</sup>); 100 ng de *primer* MPF (5'-CGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC-3'); 100 ng de *primer* MPR (5'-TGTATACCAAGCCGCTG TGAAC-3'); 2  $\mu$ L de cADN; 1U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen<sup>®</sup>) y agua estéril para un volumen final de 25  $\mu$ L. Un ciclo inicial de desnaturaliza-

ción a 94°C por 2 min fue seguido por 32 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, anillamiento a 56°C por 30 s y extensión a 72°C por 40 s, con un ciclo final de 5 min de extensión. Se tomaron alícuotas de 8  $\mu$ L de los productos de PCR para ser visualizadas en gel de agarosa al 1%.

Los ácaros colectados fueron introducidos en viales de vidrio con alcohol al 70% y enviados a la ESALQ para corroborar la presencia del virus y la identificación respectiva de la especie.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis microscópicos y moleculares de los tejidos examinados concluyen que los síntomas encontrados en el follaje (Figura 1) de árboles de naranja 'Valencia' corresponden a lesiones causadas por el CiLV-C y por consiguiente se puede afirmar que el virus de la leprosis de los cítricos está presente en los Llanos Orientales de Colombia, en los departamentos del Meta y Casanare.

Mediante los estudios de microscopía electrónica (MET) adelantados por la Universidad de Sao Paulo (ESALQ), se

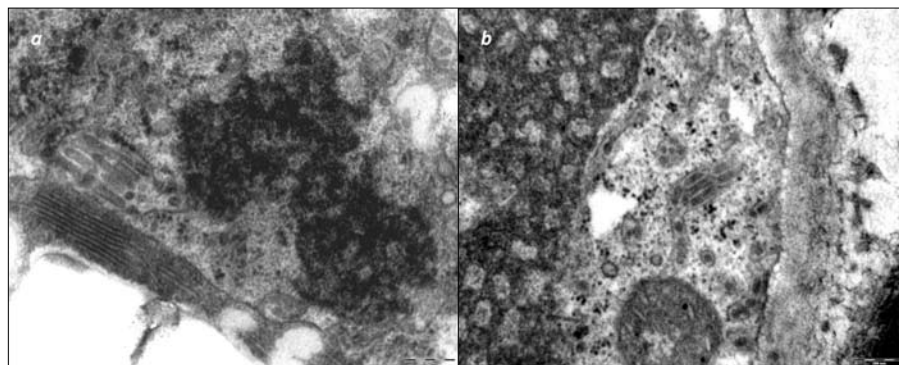
determinó que el virus de la leprosis de los cítricos proveniente de las muestras recolectadas de los departamentos de Meta y Casanare es de tipo citoplasmático (CiLV-C) y no nuclear. En las muestras analizadas con MET se detectó la presencia de partículas baciliformes contenidas en el retículo endoplasmático de células del mesófilo del parénquima vascular y una forma irregular de un viroplasma en el citoplasma, por lo cual se determina que el virus de la leprosis de los cítricos presente en Colombia es del tipo citoplasmático (Figura 2).

De un total de 21 muestras analizadas en el microscopio electrónico, 10 resultaron con presencia del virus (47,6 %), siendo cuatro de Yopal, una de Aguazul, dos de Villavicencio, una de Lejanías y dos de Guamal. Los árboles de donde provinieron las muestras se encuentran geográficamente posicionados (Tabla 1).

Los *primers* utilizados en los análisis RT-PCR llevados a cabo en este estudio amplificaron específicamente un fragmento de 344 pb correspondiente a una región del gene que codifica para la proteína de movimiento del virus CiLV-C



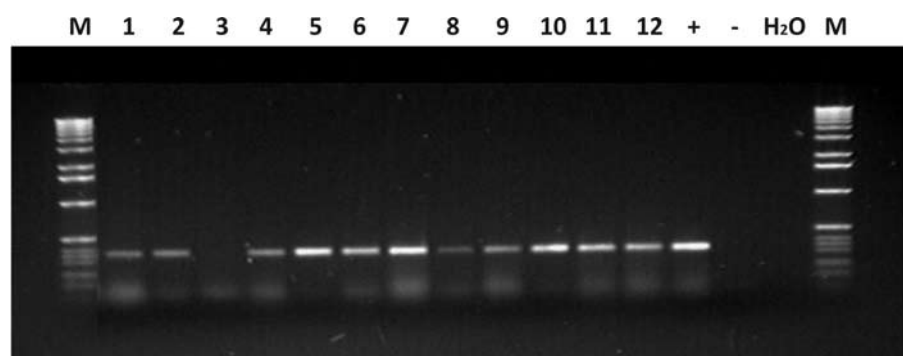
**Figura 1.** Lesiones típicas producidas por el virus de la leprosis de los cítricos en hojas (a) y ramas (b) de naranja 'Valencia' procedentes de los departamentos de Meta y Casanare, en los Llanos Orientales de Colombia.



**Figura 2.** Microfotografía electrónica de células parenquimáticas con lesiones lepróticas en hojas de naranja 'Valencia': a) se observa el viroplasma en el citoplasma (V); b) las partículas baciliformes son señaladas por una flecha.

**Tabla 1.** Resultado de los análisis de microscopía electrónica para el virus de la leprosis de los cítricos CiLV-c. Muestras de naranja 'Valencia' (Llanos Orientales de Colombia, septiembre de 2005).

Código	Resultado MET	Departamento	Municipio	Finca	Posición geográfica
3473	Positivo CiLV-C	Casanare	Yopal	La Talanquera	N 05° 21' 46,4" W 72° 18' 11,2"
3474	Negativo CiLV-C	Casanare	Yopal	La Parcela	N 05° 25' 25,2" W 72° 25' 37,5"
3475	Negativo CiLV-C	Casanare	Yopal	La Parcela	N 05° 25' 25,4" W 72° 25' 38,2"
3476	Positivo CiLV-C	Casanare	Yopal	La Parcela	N 05° 25' 26,3" W 72° 25' 37 "
3477	Negativo CiLV-C	Casanare	Aguazul	La Esperanza	N 05° 10' 06,6" W 72° 31' 48,8" (frutos)
3478	Positivo CiLV-C	Casanare	Aguazul	La Esperanza	N 05° 10' 06,6" W 72° 31' 48,8" (hojas)
3480	Positivo CiLV-C	Casanare	Yopal	La Talanquera	N 05° 21' 47,8" W 72° 18' 12"
3481	Positivo CiLV-C	Casanare	Yopal	La Talanquera	N 05° 21' 48" W 72° 18' 11,6"
3482	Negativo CiLV-C	Casanare	Yopal	La Talanquera	N 05° 21' 48,1" W 72° 18' 12,2"
3483	Negativo CiLV-C	Casanare	Aguazul	Villa Flor	N 05° 09' 52,6" W 72° 34' 10,8"
3484	Negativo CiLV-C	Casanare	Aguazul	Villa Flor	N 05° 09' 52,5" W 72° 34' 11"
3486	Negativo CiLV-C	Meta	Villavicencio	C.I La Libertad	N 04° 03' 44,8" W 73° 27' 9,6"
3487	Negativo CiLV-C	Meta	Villavicencio	C.I La Libertad	N 04° 03' 67,4" W 73° 27' 5,4"
3488	Positivo CiLV-C	Meta	Villavicencio	C.I La Libertad	N 04° 03' 67,6" W 73° 27' 5,41"
3489	Positivo CiLV-C	Meta	Villavicencio	C.I La Libertad	N 04° 03' 67,9" W 73° 27' 5,43"
3490	Positivo CiLV-C	Meta	Lejanías	El Jardín	N3° 29' 47, 22" W 73° 57' 21,12"
3491	Negativo CiLV-C	Meta	Lejanías	La Aurora	N3° 30' 18, 72" W 73° 59' 11,4"
3492	Negativo CiLV-C	Meta	Guamal	La Carolina	N3° 52' 53, 1" W 73° 44' 7,74"
3493	Positivo CiLV-C	Meta	Guamal	El Triunfo	N3° 52' 57, 8" W 73° 45' 40,74"
3494	Positivo CiLV-C	Meta	Guamal	El Triunfo	N3° 52' 55, 5" W 73° 45' 40,66"

**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de RT-PCR. Se utilizaron *primers* que amplifican la región del gen de la proteína de movimiento del CiLV-C. M: marcador de peso molecular 1 kpb (Invitrogen®), 1 a 12: muestras procedentes de los departamentos de Meta y Casanare; +: control positivo, -: control negativo; H<sub>2</sub>O: control agua.

(Figura 3). De las 32 muestras procesadas, 14 (43,7%) resultaron positivas a la presencia del CiLV-C, siendo dos de ellas de Lejanías, una de Guamal, seis de Yopal y cinco de Aguazul (Tabla 2).

El porcentaje de muestras negativas (52,4%) resultantes de los análisis efectuados por MET se explica porque en este tipo de análisis solamente se examina una parte muy pequeña del tejido y la concentración del virus es muy baja en las lesiones maduras. Por ello se recomienda para este tipo de análisis utilizar tejidos frescos y con presencia de lesiones iniciales. Igualmente, en los análisis de RT-PCR la extracción del ARN es mucho más eficiente cuando se trabaja con tejidos frescos; así, las muestras negativas resultantes en este estudio (53,6%) se pueden explicar por dicha razón. El desecamiento de las hojas, aunque preserva el material viral, ciertamente disminuye la concentración de ARN extraíble, reduciendo por consiguiente la eficiencia del método (Bastianel *et al.*, 2006).

En este estudio sin embargo, los resultados positivos del 47,6% de muestras con presencia de virus en los análisis MET y del 43,7% para los análisis RT-PCR, confirman la presencia del virus de la leprosis de los cítricos en los Llanos Orientales de Colombia. Teniendo en cuenta que el método RT-PCR para el diagnóstico del CiLV-C en Colombia produjo por primera vez resultados positivos, la teoría planteada por Moreno y Ángel (2005) sobre la existencia de un virus nuclear no citoplasmático, así como la presencia en Colombia de variantes genéticas del virus —que no son reconocidas por los iniciadores utilizados y son reportadas por Locali *et al.* (2003)— queda por ahora sin fundamento.

En las pruebas moleculares (RT-PCR) de las muestras de naranja 'Valencia' colectadas en el departamento del Meta se amplificaron fragmentos de ADN citoplasmático del CiLV-C del tamaño esperado (344 pb). Una de las amplificaciones fue secuenciada y registrada como la accesión GenBank No. DQ272491 (León *et al.*, 2006). Se encontró que la secuencia obtenida para las muestras procedentes de Colombia posee el 98% de coincidencia con la secuencia de nucleótidos aislada en Brasil y registrada como la accesión GenBank No. AY289190.1.

**Tabla 2.** Resultado de los análisis de diagnóstico molecular (RT-PCR) para el virus de la leprosis de los cítricos. Muestras de naranja 'Valencia' de los Llanos Orientales de Colombia. Oct. 2005.

Código	Resultado RT-PCR	Departamento	Municipio	Finca	Posición geográfica
1	Negativo	Meta	Lejanías	El Jardín	N3° 29' 48, 18" W 73° 57' 19,27"
2	Negativo	Meta	Lejanías	El Jardín	N3° 29' 47, 22" W 73° 57' 21,12"
3	Negativo	Meta	Lejanías	El Jardín	N3° 29' 47, 4" W 73° 57' 21,9"
4	Negativo	Meta	Lejanías	El Jardín	N3° 29' 47,7" W 73° 57' 21,3"
5	Negativo	Meta	Guamal	El Triunfo	N3° 52' 59, 1" W 73° 45' 40,74"
6	Negativo	Meta	Guamal	El Triunfo	N3° 52' 59, 16" W 73° 45' 40,68"
7	Negativo	Meta	Guamal	El Triunfo	N3° 52' 58, 8" W 73° 45' 40,8"
8	Negativo	Meta	Guamal	La Carolina	N3° 52' 53, 1" W 73° 44' 7,74"
9	Negativo	Meta	Guamal	La Carolina	N3° 52' 52,68" W 73° 44' 7,74"
10	Negativo	Meta	Guamal	La Carolina	N3° 52' 51,96" W 73° 44' 8,58"
11	Positivo	Meta	Lejanías	La Aurora	N3° 30' 18, 72" W 73° 59' 11,04"
12	Negativo	Meta	Lejanías	La Aurora	N3° 30' 18, 18" W 73° 59' 11,07"
13	Positivo	Meta	Lejanías	La Aurora	N3° 30' 18, 72" W 73° 59' 11,4"
15	Positivo	Casanare	Yopal	La Parcela	N 05° 25' 25, " W 72° 25' 37,8"
16	Positivo	Casanare	Yopal	La Parcela	N 05° 25' 25, " W 72° 25' 38,0"
17	Negativo	Casanare	Yopal	La Parcela	N 05° 25' 25,2, " W 72° 25' 37,5"
18	Positivo	Casanare	Yopal	La Parcela	N 05° 25' 25,4, " W 72° 25' 38,2"
19	Positivo	Casanare	Yopal	La Parcela	N 05° 25' 26,3, " W 72° 25' 37,0"
20	Positivo	Casanare	Yopal	La Talanquera	N 05° 21' 46,4, " W 72° 18' 11,2"
21	Negativo	Casanare	Yopal	La Talanquera	N 05° 21' 47,7, " W 72° 18' 12,2"
22	Positivo	Casanare	Yopal	La Talanquera	N 05° 21' 46,9, " W 72° 18' 10,9"
23	Negativo	Casanare	Yopal	La Talanquera	N 05° 21' 46,7, " W 72° 18' 11,2"
24	Negativo	Casanare	Aguazul	Villa Flor	N 05° 09' 53,7, " W 72° 34' 15,1"
25	Positivo	Casanare	Aguazul	Villa Flor	N 05° 09' 54,7, " W 72° 34' 14,0"
26	Negativo	Casanare	Aguazul	Villa Flor	N 05° 09' 52,5, " W 72° 34' 11,1"
27	Negativo	Casanare	Aguazul	Villa Flor	N 05° 09' 51,8, " W 72° 34' 11,3"
28	Negativo	Casanare	Aguazul	Villa Flor	N 05° 09' 51,2, " W 72° 34' 11,5"
29	Positivo	Casanare	Aguazul	La Esperanza	N 05° 10' 06,6, " W 72° 31' 48,8"
30	Positivo	Casanare	Aguazul	La Esperanza	N 05° 10' 07,4, " W 72° 31' 48,7"
31	Positivo	Casanare	Aguazul	La Esperanza	N 05° 10' 05,9, " W 72° 31' 50,3"
32	Positivo	Casanare	Aguazul	La Esperanza	N 05° 10' 06,2, " W 72° 31' 48,5"

La secuencia obtenida de muestras de naranja valencia colectadas en Colombia, registrada como accesoión GenBank No. DQ272491, consta de 318 pb y se compone de: 74 a, 61 c, 85 g y 98 t, según se describe a continuación:

Los *primers* y la secuencia citados fueron entregados oficialmente al Laboratorio de Análisis Molecular del Instituto Colombiano Agropecuario –ICA–, entidad encargada de realizar el diagnóstico y la prevención de los problemas fitosanitarios de Colombia.

Los ácaros recolectados en los departamentos de Meta y Casanare, provenientes de árboles de naranja 'Valencia' que presentaban síntomas de la enfermedad, fueron identificados en la ESALQ como *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) Fam. Tenuipalpidae, lo cual corrobora que esta especie de ácaros es probablemente el principal vector del CiLV-C en Colombia.

Los resultados positivos obtenidos en el presente estudio, en cuanto al diagnóstico molecular del virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C, hacen posible que Colombia efectúe una campaña de diagnóstico eficaz en todas las regiones productoras, lo cual es necesario para adelantar programas de prevención, manejo y erradicación de la enfermedad del país.

#### BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Antonioli-Luizon, R., J. Freitas-Astúa, E.C. Locali, V. Rodrigues, G. Astua-Monge, E.W. Kitajima, y M.A. Machado. 2004. Viabilidade da detecção do vírus da leprose, tipo citoplasmático, em amostras foliares de citros armazenadas. *Laranja* 25(2): 357-366.
- Bastianel, M., J. Freitas-Astúa, E.W. Kitajima y M.A. Machado. 2006. The citrus leprosis pathosystem. *Summa Phytopathologica* 32(3): 211-220.
- Castro, B.L., L.W. Timmer y G.W. Muller. 2000. Enfermedades de los cítricos en Colombia. *Produmedios*. pp. 68-70.
- Childers, C.C., J.C. Rodrigues, K.S. Derrick, D.S. Achor, J.V. French, W.C. Welbourn, R. Ochoa, E.W. Kitajima. 2003. Citrus leprosis its status in Florida and Texas: Past and present. *Exp. App. Acarol.* 30: 181-202.
- Childers, C.C., J.C. Rodriguez, K.S. Derrick, E.W. Kitajima, C. Rivera y S. Welbourn. 2005. Estrategia de manejo para romper el ciclo del vector *Brevipalpus* spp. –Rhadovirus, causante de la leprosis de los cítricos.

- CATIE Revista Manejo Integrado de Plagas. No. 60.
- Espinal, G.C., C.H. Martínez y Y. Peña. 2005. La cadena de cítricos en Colombia. Ministerio de Agricultura - Cítricos en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Documento de trabajo No.107. 64 p.
- Freitas-Astúa, J., E.C. Locali, M. Bastianel, V.M. Novelli, G. Astúa-Mongu y M.A. Machado. 2005. Citrus Leprosis: Challenges and advances of an increasingly important disease. XLV Reunion Anual APS-CD. Costa Rica. 37 p.
- León, M.G. 2001. Insectos de los cítricos. Guía ilustrada de plagas y benéficos con técnicas para el manejo de los insectos dañinos. Produmedios, pp: 79-81.
- León, M.G., O.C. Realpe, M.X. Carreño, B.P. Garzón y P.J. Campos. 2005. La Leprosis de los cítricos. Plegable divulgativo N° 43. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – CORPOICA C.I. La Libertad. Villavicencio, Meta. 5 p.
- León M.G., W.E. Kitajima y J. Freitas. 2006. Diagnóstico y recomendaciones de manejo para la leprosis de los cítricos. Boletín técnico No. 47. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural – CORPOICA C.I. La Libertad, Villavicencio, Meta. 24 p.
- León M.G., C.E. Realpe, P.A. Garzón, J.A. Rodríguez., P.M. Moreno, C.C. Childers, D. Achor, A.J. Freitas; L.R. Antonioli, R.B. Salaroli, N.C. Meza y W.E. Kitajima. 2006. Occurrence of Citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. APS Journals. Plant Disease - Disease Notes 90(5): 682.
- Moreno, P.M. y D.J. Ángel. 2005. Sistema de detección molecular del virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) en Colombia. ICA Informa 32(2): 26-29.
- Posada, O.L. 1989. Lista de insectos dañinos y otras plagas en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Boletín técnico No. 43, cuarta edición, 622 p.
- Rodrigues, J.C; N.L. Nogueira, y M.A. Machado. 2002. Elaboração e validação de escala diagramática para leprose dos citros. Summa Phytopathologica 28: 192-196.
- Rodrigues, J.C., E.W. Kitajima y C.M. Chagas. 2003. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. Experimental and Applied Acarology 30: 161-179. Kluwer Academic Publishers 161-179 p.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, MADR, IICA, ASOHOFRUCOL. 2002. Acuerdo de competitividad de la cadena productiva de los cítricos. Bogotá. D.C. 79 p.
- Zúñiga, C y P. Ramírez. 2002. Los virus, patógenos de importancia mundial. Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) 64; 25-33.