

Transmisión de leprosis de los cítricos por ácaros *Brevipalpus yothersi* a través de hospederos no cítricos

Citrus leprosis transmission by *Brevipalpus yothersi* mites through non citrus hosts

Transmissão do vírus da leprose dos citros por ácaros *Brevipalpus yothersi* por meio de hospedeiros não cítricos

Guillermo León M.,¹ Avijit Roy,² Nandlal Choudhary,³ Ronald Brlansky⁴

¹ PhD, Universidad Nacional de Colombia. Investigador PhD Asociado, CI La Libertad, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Villavicencio, Colombia. gleon@corpoica.org.co

² PhD, Indian Agricultural Research Institute. Plant Pathology Molecular Biologist, USDA-APHIS. Maryland, EE. UU. avijit.roy@ars.usda.gov

³ PhD, University of Florida. Assistant professor, Amity Institute of Virology & Immunology. Noida, India. nchoudhary@amity.edu

⁴ PhD, University of Florida. Professor Emeritus, Citrus Research and Education Center. Lake Alfred, EE. UU. rhby@crec.ifas.ufl.edu

Fecha de recepción: 08/03/2016

Fecha de aceptación: 22/11/2016

Para citar este artículo: León G, Roy A, Choudhary N, Brlansky R. 2017. Transmisión de leprosis de los cítricos por ácaros *Brevipalpus yothersi* a través de hospederos no cítricos. Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. 18(2):307-319

DOI: http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:633

Resumen

El virus de la leprosis de los cítricos (CiLV) se detectó en los Llanos Orientales en 2004. Es una amenaza para la citricultura colombiana si logra extenderse hacia otras regiones del país. El principal vector es el ácaro *Brevipalpus yothersi* Baker (antes, *Brevipalpus phoenicis*). En esta investigación se determinó que *B. yothersi* puede transmitir CiLV a plantas cítricas luego de hospedarse en plantas no cítricas. Inicialmente se permitió la adquisición del virus por parte de los ácaros durante tres días sobre hojas sintomáticas de naranjos (*Citrus x sinensis*) positivos a CiLV-C2. Luego, los ácaros se ubicaron sobre seis plantas no cítricas (*Dieffenbachia* sp., *Hibiscus rosa-sinensis*, *Codiaeum variegatum*, *Swinglea glutinosa*, *Sida*

acuta y *Stachytarpheta cayennensis*), de acuerdo con un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones. Cumplido el tiempo programado, los ácaros se reubicaron por tres días sobre plantas sanas de *C. x sinensis*. Las hojas de las plantas receptoras se evaluaron según la presencia de síntomas y se colectaron para pruebas RT-PCR. Los resultados muestran que *B. yothersi* transmite el CiLV con más de un 85 % de efectividad hacia plantas de *C. x sinensis*, luego de haber permanecido en cualquiera de los hospederos alternos. Esta investigación sirve de apoyo al desarrollo de medidas cuarentenarias de diagnóstico para evitar la dispersión del virus.

Palabras clave: CiLV-C2, *Citrus*, transmisión de enfermedades, vectores, virus

Abstract

Citrus leprosis virus (CiLV) was detected in Colombia at the eastern plains in 2004; it is a threat the disease spreads to other regions of the country. The main vector is *Brevipalpus yothersi* Baker (formerly identified as *Brevipalpus phoenicis*). This research determined the viability of *B. yothersi* to transmit CiLV to citrus plants, after been hosted in non-citrus plants. To virus acquisition, mites spent three days on symptomatic orange (*Citrus x sinensis*) leaves positives to CiLV-C2; then mites were placed on six non-citrus plants (*Dieffenbachia* sp., *Hibiscus rosa-sinensis*, *Codiaeum variegatum*, *Swinglea glutinosa*, *Sida acuta* and *Stachytarpheta cayennensis*). A randomized design with 6 treatments and 4 replicates was carried out.

After scheduled time in non-citrus plants, mites were three days relocated on *C. x sinensis* healthy plants. Leaves of receptor plants, were evaluated to the occurrence or absence of symptoms and collected for RT-PCR tests. *B. yothersi* mites were able to transmit the CiLV virus over 85% of Valencia orange plants (*Citrus x sinensis* L.), after feeding from 2-20 days on non-citrus host plants. The first leprosis symptoms on *C. x sinensis* leaves was confirmed from 14 to 51 days after transmission. The present research work further established that CiLV-C2 is a persistently transmitted virus. The implement quarantine diagnostic measures to prevent spread of CiLV to disease-free zones is suggested.

Keywords: CiLV-C2, *Citrus*, Disease transmission, Vectors, Viruses

Resumo

O vírus da leprose dos citros (CiLV) foi detectado na planície oriental da Colômbia em 2004. É uma ameaça para a citricultura colombiana se conseguir se expandir a outras regiões do país. O principal vetor é o ácaro *Brevipalpus yothersi* Baker (antes, *Brevipalpus phoenicis*). Nesta pesquisa, foi determinado que *B. yothersi* pode transmitir CiLV a plantas cítricas após ser hospedado em plantas não cítricas. Inicialmente, permitiu-se a aquisição do vírus por parte dos ácaros durante três dias sobre folhas sintomáticas de laranjeiras (*Citrus x sinensis*) positivas a CILV-C2. Em seguida, os ácaros se localizaram sobre *Dieffenbachia* sp., *Hibiscus rosa-sinensis*, *Codiaeum variegatum*, *Swinglea glutinosa*, *Sida*

acuta e *Stachytarpheta cayennensis*, de acordo com um desenho experimental completamente ao acaso com seis tratamentos e quatro repetições. Cumprido o tempo programado, os ácaros se reposicionaram por três dias sobre plantas sãs de *C. x sinensis*. As folhas das plantas receptoras foram avaliadas segundo a presença de sintomas e foram coletadas para testes RT-PCR. Os resultados mostram que *B. yothersi* transmite o CiLV com mais de 85% de efetividade a plantas de *C. x sinensis*, após ter permanecido em qualquer das hospedeiras alternas. Esta pesquisa serve de apoio para o desenvolvimento de medidas de quarentena de diagnóstico para evitar a propagação do vírus.

Palavras chave: CiLV-C2, *Citrus*, transmissão de doença, vector, vírus

Introducción

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

Los naranjos dulces *Citrus x sinensis* (L.) Osbeck y los mandarinos *Citrus reticulata* Blanco son afectados frecuentemente por la leprosis de los cítricos (CiLV) (Salvo 1997; Domingues y Rodrigues 1999; Locali et al. 2003). Las limas *Citrus x latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez y los limones *Citrus limon* (L.) Osbeck son considerados inmunes a la leprosis, mientras que el tangor Murcott, un híbrido entre naranjo dulce y mandarino, muy utilizado en Brasil, puede hospedar el virus de la leprosis de los cítricos y ser asintomático (Bastianel et al. 2004). Las toronjas *Citrus x paradisi* Macfad., y algunos tangores muestran niveles variables de resistencia al virus de la leprosis (Rodrigues et al. 2001; Bastianel et al. 2004; Locali et al. 2004).

En Colombia, el virus de la leprosis de los cítricos citoplasmático (CiLV-C) fue registrado en el departamento del Casanare en 2004. Para 2005 se registró ampliamente distribuido en varios municipios de los departamentos del Meta y el Casanare (León et al. 2006a; Becerra et al. 2007). Posteriormente, se encuentra un reporte de presencia de leprosis de los cítricos en Ibagué, Tolima (Bastianel et al. 2010), lo cual indica la dispersión de la enfermedad en el país.

Para 2012, en Colombia fue detectado un nuevo tipo de virus denominado “virus de la leprosis de los

cítricos citoplasmático - tipo 2” (CiLV-C2), el cual provoca síntomas muy similares a los producidos por el CiLV-C (Roy et al. 2013; León et al. 2014). Tras la identificación del genoma completo de este virus, se desarrolló un nuevo set de cebadores para su diagnóstico molecular por medio de RT-PCR. Los resultados muestran que el CiLV-C2 en Colombia está asociado con plantas sintomáticas de leprosis colectadas en los departamentos del Meta y el Casanare, lo cual sugiere que los dos tipos de virus CiLV-C y CiLV-C2 están presentes en el país.

De acuerdo con Chagas y Rosseti (1983), el principal transmisor del virus de la leprosis de los cítricos es el ácaro rojo plano *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). Esta es una especie polífaga, distribuida en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo (Chagas et al. 1983; Salvo 1997; Rodrigues et al. 2001; Maia y Oliveira 2002).

Childers et al. (2003) reportan más de 486 plantas hospederas que incluyen muchas plantas cultivadas y malezas. Entre las plantas cultivadas, además de los cítricos, mencionan marañón (*Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae), papaya (*Carica papaya* L., Caricaceae), yuca (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae), algodón (*Gossypium* sp., Malvaceae), guayaba (*Psidium guajava* L., Myrtaceae), maracuyá (*Passiflora* sp., Passifloraceae), café (*Coffea arabica* L., Rubiaceae), cacao (*Theobroma cacao* L., Malvaceae) y vid (*Vitis vinifera* L., Vitaceae).

Chiavegato (1996) menciona 34 especies diferentes de plantas hospederas de *B. phoenicis*. Ulian y Oliveira (2002) evaluaron la habilidad de *B. phoenicis* para vivir en barreras rompevientos de cultivos de cítricos y concluyeron que *Hibiscus* sp. (Malvaceae) y *Bixa orellana* L. (Bixaceae) no deben ser usadas como barreras vivas, porque proveen condiciones favorables para el ácaro vector del CiLV. Maia y Oliveira (2002; 2005) identificaron plantas hospederas que son reservorios del ácaro *B. phoenicis* en plantaciones de cítricos en Brasil, las cuales incluyen malezas como *Bidens pilosa* L. y barreras rompevientos como *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Fabaceae) y *Malvaviscus arboreus* Cav. (Malvaceae).

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

Recientemente Roy et al. (2015) determinaron que el ácaro *B. phoenicis* presente en Colombia corresponde a la especie *Brevipalpus yothersi* Baker, 1949 (Acari: Tenuipalpidae). Flat Mites of the World (2015) confirmó que la especie *B. yothersi* fue previamente listada como *Brevipalpus phoenicis* especie grupo B., y afirma además que *B. yothersi* se ha encontrado en asociación con el complejo de virus de la leprosis de los cítricos. El Global Biodiversity Information Facility, GBIF (2013), corrobora el estatus taxonómico de *Brevipalpus yothersi* (Baker) como un sinónimo de *B. phoenicis* (Geijskes).

Roy et al. (2015) adicionalmente encontraron que la especie *B. yothersi* identificada en muestras colectadas en los departamentos de Casanare y Meta (Colombia) está fuertemente asociada con el complejo CiLV y confirmaron que es vector de varios virus conocidos de leprosis presentes en el país, como el virus de la leprosis citoplasmático (CiLV-C), el virus de la leprosis citoplasmático tipo 2 (CiLV-C2), el virus de la leprosis nuclear (CiLV-N) y el hibiscus green spot virus 2 (HGSSV-2). De acuerdo con León (2012), en Colombia el ácaro vector de la leprosis se encuentra diseminado en varias regiones geográficas del país y puede infestar los cultivos de cítricos durante todo el año. León et al. (2014) confirmaron que el ácaro es vector del CiLV-C2 en los departamentos del Meta y Casanare.

El CiLV puede infectar plantas de cítricos, plantas susceptibles usadas como barreras vivas o malezas en plantaciones de cítricos (Maia y Olivera 2005). Diferentes autores han reportado infección natural, mecánica o experimental por CiLV-C en varias especies de plantas no rutáceas como *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* H. J. Coste & A. Reyn., *Gomphrena globosa* L. (Amaranthaceae), *Commelina benghalensis* L. (Commelinaceae), *H. rosa-sinensis* L., *Malvaviscus arboreus* Cav., *Grevillea robusta* A. Cunn. ex R. Br. (Proteaceae), *Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae) y *Solanum violae-folium* Schott (Solanaceae) (Colariccio et al. 1995; Rodrigues et al. 2001; Nunes et al. 2012).

Lovisoló et al. (2000) afirman que la transmisión mecánica del virus desde plantas cítricas es posible, pero solo se ha obtenido un bajo porcentaje de positivos. Nunes et al. (2012) confirmaron la retransmisión del CiLV-C hacia plantas de naranjo dulce (*C. x sinensis*) var. Pera, después de que el ácaro vector *B. phoenicis* pasara por hospederos alternos como hibiscos (*H. rosa-sinensis*), malvaviscus (*M. arboreus*), roble plateado (*G. robusta*) y achiote (*B. orellana*). Adicionalmente, estas plantas produjeron síntomas de leprosis y resultaron positivas para CiLV-C por análisis RT-PCR y microscopía electrónica. Garita et al. (2014) ampliaron el número de plantas hospederas del CiLV a 59 especies de 24 familias, las cuales desarrollaron lesiones localizadas luego de inoculaciones realizadas con ácaros vectores. Algunas de las familias de plantas reportadas como hospederas del CiLV son Rutaceae, Aizoaceae, Chenopodiaceae, Amaranthaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae, Malvaceae, Orchidaceae, Solanaceae y Violaceae.

En Colombia, *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. (Rutaceae) se reconoció como una planta hospedera natural de CiLV-C y de su ácaro vector *B. yothersi* (citado como *B. phoenicis*) (León et al. 2008). Los mismos autores también mencionan varias malezas comunes en huertos de cítricos hospederas del ácaro *B. yothersi*, como la verbena negra *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl, yerba mora *Lantana camara* L. (Verbenaceae) y escobo *Sida* sp. (Malvaceae),

entre otras (León et al. 2008). Igualmente, en Colombia se detectó infección natural del CiLV-C2 en cultivares de naranjo Valencia (Valencia, Delta Valencia, Rhode Red Valencia y Cara Cara Navel) y también en diferentes plantas no cítricas como *Dieffenbachia* sp. (Araceae), *S. glutinosa* y *H. rosa-sinensis* (Roy et al. 2013; 2015).

Para transmitir el virus, *B. phoenicis* inyecta saliva tóxica en frutos, hojas, ramas y otros tejidos de las plantas (Oliveira 1996). Solo los ácaros que han tenido acceso a las lesiones pueden transmitir leprosis. Los estados de larva, ninfa y adulto son capaces de adquirir y transmitir el CiLV: el 48,3% de las larvas del ácaro transmiten la enfermedad, mientras que las ninfas y adultos son menos eficientes en la transmisión (Chagas et al. 1983). De acuerdo con Kitajima et al. (2003), el virus no es sistémico, lo cual significa que no se disemina a través de la planta.

En cuanto a aspectos biológicos, *B. phoenicis* pasa por los estados de huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto. Cada estado de desarrollo tiene fases de quietud y alimentación. Se reproduce de forma asexual por partenogénesis telitoquia; la reproducción sexual es menos común. Cada hembra puede colocar de uno a cuatro huevos por día durante 20 días aproximadamente, con lo cual se pueden presentar varias generaciones por año (Chiavegato 1996). La duración del ciclo de vida de *B. yotheresi*, con un promedio de temperatura de $27,6 \pm 0,7$ °C y humedad relativa de $69 \pm 7,9$ %, reporta los tiempos siguientes: huevo, 4 a 6 días; larva, 3 a 4 días; protoninfa, 5 a 7 días; deutoninfa, 6 a 8 días; y adulto, 21 a 24 días. De acuerdo con estos datos, el ciclo de huevo a adulto demora de 18 a 25 días y el estado adulto dura en promedio más de 21 días (León et al. 2006).

Pocos estudios se han realizado sobre la transmisión del CiLV después de que el ácaro vector *B. yotheresi* se ha alimentado en plantas hospederas alternas de diferentes especies; sin embargo, se conoce una gran abundancia de plantas que pueden hospedar el ácaro vector, así como el reciente número de reportes de plantas hospederas del CiLV-C y CiLV-C2. Por consiguiente, esta investigación se realizó para determinar si existe transmisión cuando

el ácaro, luego de ser infectado, se hospeda en una planta no cítrica y regresa nuevamente a una cítrica. El estudio pretende documentar el papel del ácaro vector en relación con la transmisión del virus y su interacción entre plantas alternas no cítricas y plantas cítricas hospederas del virus. Los resultados permitirán generar estrategias para prevenir y evitar la entrada de leprosis a regiones libres del virus, así como para desarrollar medidas de cuarentena preventivas contra la enfermedad. La metodología contribuye al diagnóstico para determinar si los ácaros son virulíferos y cuál es su potencial para transmitir el virus, aunque se encuentren en plantas diferentes a cítricos.

Materiales y métodos

La eficiencia de transmisión del CiLV por el ácaro vector *B. yotheresi* cuando este adquiere el virus de una planta cítrica, pasa a una no cítrica y se relocaliza posteriormente en una planta cítrica sana fue estudiada por medio de pruebas de transmisión dentro de casas de malla. Las pruebas fueron realizadas en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Centro de Investigación La Libertad (Villavicencio, Colombia), con temperaturas que oscilaron entre 23 y 37 °C (con un promedio de 30,7 °C) y humedades relativas entre 41 y 86% (con promedio de 54%). Para este objetivo, se siguieron los pasos que se describen a continuación.

Selección y mantenimiento del material vegetal

Las plantas usadas como hospederos alternos del ácaro vector *B. yotheresi* en este estudio fueron las ornamentales millonaria (*Dieffenbachia* sp.), hibisco o cayena (*Hibiscus rosa-sinensis*) y croto (*Codiaeum variegatum*); la cerca viva (*Swinglea glutinosa*); y las malezas escobo (*Sida acuta*) y verbena negra (*Stachytarpheta cayennensis*). Estas plantas fueron seleccionadas para los estudios de transmisión por ser hospederas del ácaro vector o del virus CiLV. Como planta hospedera cítrica, se utilizó naranjo Valencia (*C. x sinensis*). Las plantas fueron sembradas individualmente en materas y se mantuvieron libres del virus, bajo condiciones de casa de malla.

Adquisición del virus por ácaros *B. yothersi*

Para la adquisición del virus por los ácaros *B. yothersi*, se aislaron en un invernadero dos árboles de naranjo Valencia con lesiones del virus CiLV como fuente de inóculo, los cuales fueron previamente determinados positivos para CiLV-C y CiLV-C2 por medio de RT-PCR según Roy et al. (2013). Se colectaron hojas con abundantes lesiones de la enfermedad de dichos árboles y se llevaron al laboratorio de entomología. Los pecíolos de las hojas se incrustaron dentro de viales de vidrio con agua destilada para mantener la humedad de las hojas durante el tiempo de experimentación. Sobre las lesiones de las hojas seleccionadas y con la ayuda de estereoscopios y pinceles de punta fina se colocaron aproximadamente 1.500 ácaros *B. yothersi* en alimentación durante un periodo de tres días. Las hojas ya infestadas fueron aisladas mediante la aplicación de una banda de vaselina en su pecíolo, para asegurar el confinamiento de los ácaros, su alimentación y la adquisición del virus.

Infestación de ácaros sobre hospederos no cítricos

Transcurrido el tiempo de adquisición de tres días, los ácaros se capturaron con pincel de punta fina y se ubicaron en grupos de 50 por planta en cada una de las seis especies no cítricas (*S. glutinosa*, *Dieffenbachia* sp., *C. variegatum*, *H. rosa-sinensis*, *S. acuta* y *S. cayennensis*). Se utilizaron cinco diferentes tiempos de exposición (2, 4, 8, 15 y 20 días) y cinco plantas de cada especie hospedera no cítrica. Una vez cumplido el tiempo del tratamiento sobre cada una de las plantas alternas, se procedió a reubicar los ácaros sobre plantas de naranjo Valencia (*C. x sinensis*) sanas.

Retransmisión del virus hacia plantas cítricas

Luego de cumplir el tiempo programado en las especies no cítricas, los ácaros *B. yothersi* se reubicaron sobre plantas sanas de naranjo Valencia (*C. x sinensis*), para evaluar la transmisión del CiLV. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones de diez ácaros *B. yothersi* por tiempo de exposición para cada una de las seis especies de plantas receptoras

no cítricas. Los ácaros se ubicaron en grupos de diez sobre las cuatro hojas superiores de cada planta de naranjo Valencia, de tal forma que cada hoja correspondió a una unidad experimental.

Las plantas receptoras se sometieron a un periodo de tres días de transmisión, después de los cuales, los ácaros de cada tratamiento fueron retirados manualmente con ayuda de un pincel de punta fina y colectados en tubos Eppendorf con etanol 70% para análisis de RT-PCR. Las plantas receptoras fueron mantenidas en casa de malla durante dos meses para observar la expresión de los síntomas. Las hojas expuestas a los tratamientos se evaluaron de acuerdo con la aparición o ausencia de síntomas de leprosis y adicionalmente fueron analizadas para detección molecular, utilizando cebadores específicos para CiLV-C2 en pruebas RT-PCR, según metodología estandarizada por Roy et al. (2014).

Los resultados obtenidos por sintomatología se analizaron mediante prueba χ^2 y regresión logística, para establecer el efecto del tiempo de hospedaje del ácaro *B. yothersi* en las plantas alternas no cítricas y relacionar esto con la probabilidad de aparición de síntomas en las plantas de naranjo Valencia receptoras finales.

Resultados y discusión

Expresión de síntomas de leprosis en hojas de naranjo Valencia

En todos los tratamientos evaluados, los resultados muestran aparición de síntomas visuales de la enfermedad sobre las hojas de naranjo expuestas al *B. yothersi* en porcentajes mayores al 80%. Esto permite afirmar que el ácaro *B. yothersi* es capaz de transmitir el CiLV a plantas de naranjo Valencia (*C. x sinensis*), luego de haber permanecido hospedado en cualquiera de las seis plantas alternas no cítricas, para las cuales se permitieron cinco tiempos diferentes de exposición.

Las primeras lesiones de leprosis en hojas de naranjo Valencia se observaron entre los 14 y los 47 días después de relocalizados los ácaros.

Cuando los ácaros vectores virulíferos se alimentaron en *S. glutinosa*, las primeras lesiones de leprosis fueron observadas en un rango de 15 a 37 días. Cuando los ácaros se hospedaron en *C. variegatum*, las primeras lesiones de leprosis en hojas de naranjo aparecieron entre 14 y 23 días. Cuando se alimentaron en *Dieffenbachia* sp., los primeros síntomas de leprosis fueron visibles entre 15 y 36 días. Para *S. acuta*, entre 18 y 46 días, y para los casos en que los ácaros

B. yothersi se alimentaron en *S. cayennensis* y en *H. rosa-sinensis*, el tiempo de expresión de las primeras lesiones en naranjo Valencia tomó entre 27 y 47 días y entre 26 y 51 días, respectivamente (figura 1). Locali et al. (2004) observaron síntomas de leprosis entre 17 y 21 días después de la inoculación, mientras que Freitas et al. (2004) reportan aparición de los primeros síntomas entre 17 y 60 días después de la transmisión.

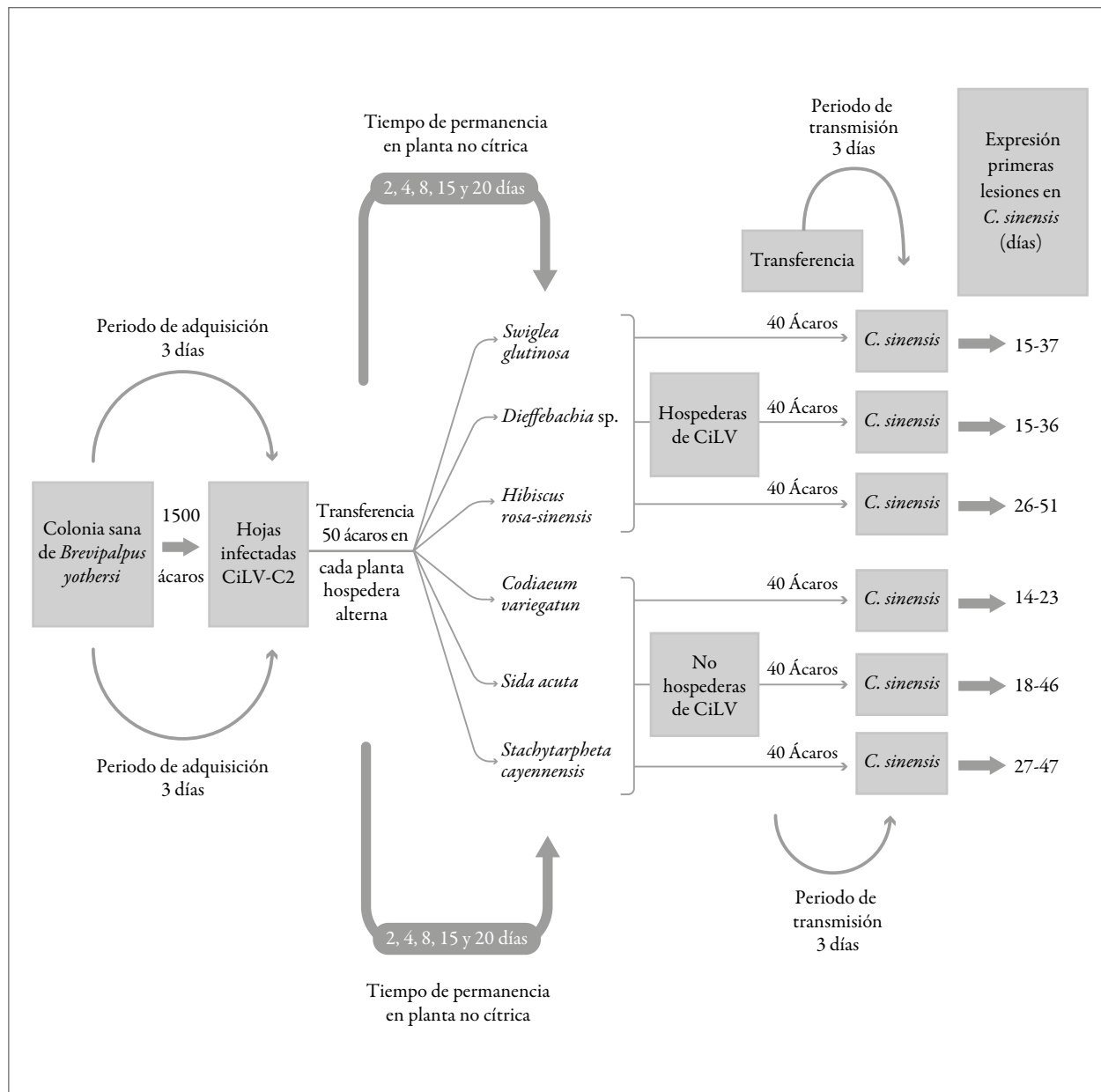


Figura 1. Tiempos requeridos para la expresión inicial de lesiones de leprosis en hojas de naranjo Valencia (*C. x sinensis*), después que *B. yothersi* fue hospedado en seis plantas alternas no cítricas. Fuente: Elaboración propia

Porcentaje de lesiones de leprosis en hojas de *C. x sinensis*

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

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

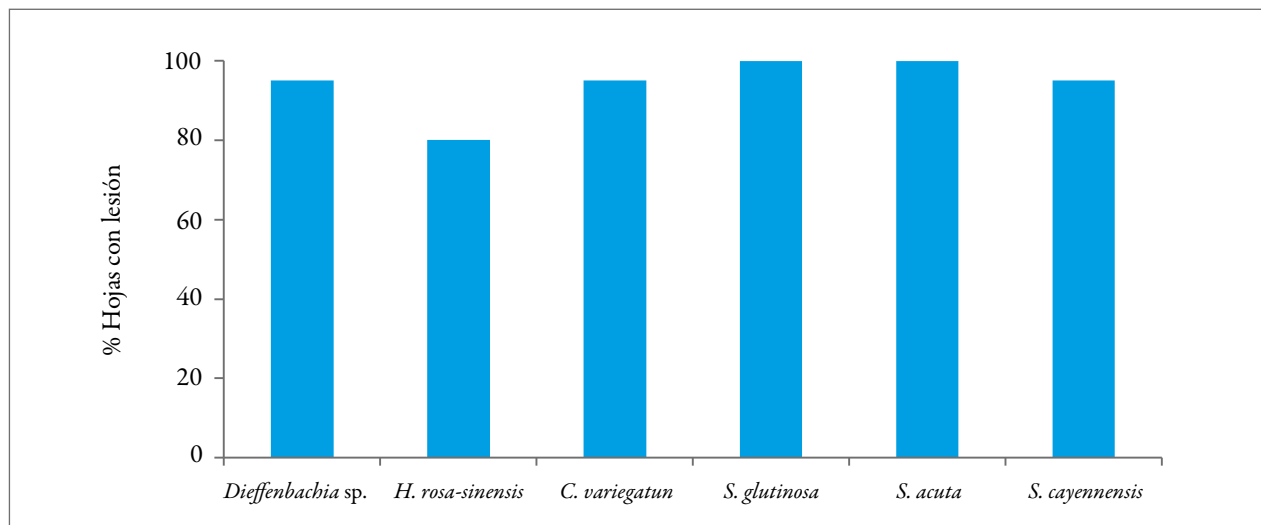


Figura 2. Porcentaje de aparición de lesiones de leprosis en plantas de naranja Valencia (*C. x sinensis*), en función del tiempo de alimentación del vector *B. yotheresi* sobre plantas no cítricas.

Fuente: Elaboración propia

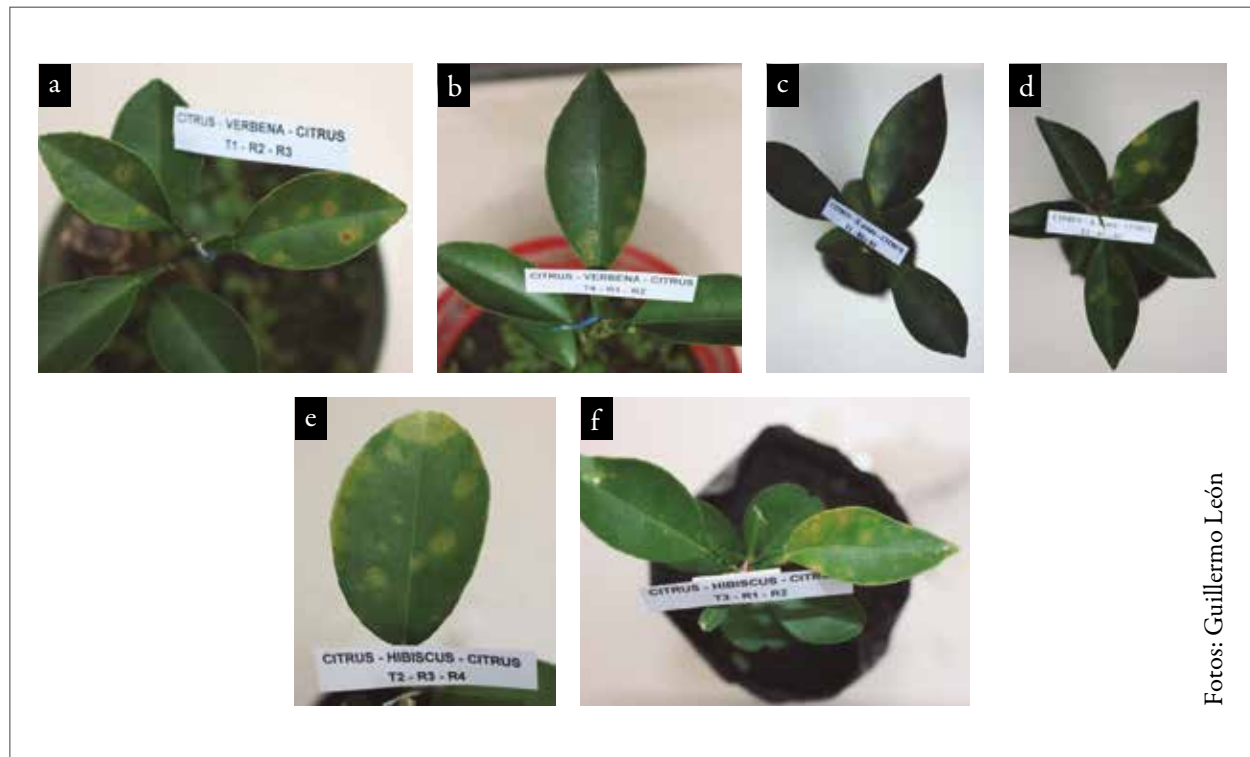
Tabla 1. Porcentaje de hojas de *C. x sinensis* con lesiones de leprosis en relación con cinco diferentes tiempos de alimentación del ácaro vector *B. yotheresi* en plantas no cítricas

Tiempo de alimentación de <i>B. yotheresi</i>	Porcentaje de hojas de naranja Valencia con lesiones en seis hospederos no cítricos (%)					
	<i>C. variegatum</i>	<i>Dieffenbachia</i> sp.	<i>H. rosa-sinensis</i>	<i>S. acuta</i>	<i>S. glutinosa</i>	<i>S. cayennensis</i>
T1= 2 días	100	100	100	100	100	100
T2= 4 días	100	100	100	100	100	100
T3= 8 días	100	100	100	100	100	100
T4= 15 días	100	100	25	100	100	100
T5= 20 días	75	75	100	100	100	75
Promedio	95	95	85	100	100	95

Fuente: Elaboración propia

La tabla 1 muestra altos promedios para todos los tratamientos y define que, cuando los ácaros *B. yotheri* virulíferos se hospedaron en *H. rosa-sinensis* y luego fueron transferidos a naranjos (*C. x sinensis*), en promedio el 85 % de hojas de los naranjos desarrolló síntomas de leprosis. El 95 % de hojas de *C. x sinensis* en promedio desarrolló lesiones de leprosis cuando los ácaros infectados se hospedaron

previamente durante diferentes tiempos en plantas alternas no cítricas como *C. variegatum*, *Dieffenbachia* o *S. cayennensis*. Cuando los ácaros permanecieron en *S. glutinosa* o *S. acuta*, el 100 % de las hojas de *C. x sinensis* desarrolló lesiones de leprosis. Algunas de las lesiones de leprosis observadas en hojas de naranjo *C. x sinensis* se presentan en la figura 3.



Fotos: Guillermo León

Figura 3. Hojas de *C. x sinensis* con lesiones sintomáticas de leprosis, 40 días después de la transmisión por ácaros *B. yotheri* hospedados previamente en plantas no cítricas. a y b. 2 y 15 días de hospedaje previo en *Stachytarpheta cayennensis*; c y d. 4 y 8 días de hospedaje previo en *Sida acuta*; e y f. 4 y 8 días de hospedaje previo en *Hibiscus rosa-sinensis*.

Con un nivel de significancia de 0,01 %, se determinó una probabilidad alta de transmisión del CiLV por aparición de los síntomas de leprosis en naranjo Valencia *C. x sinensis*, luego de que el ácaro se hospedó en cualquiera de las plantas no cítricas evaluadas en este estudio. Con la prueba χ^2 , se pudo establecer que existe dependencia entre la aparición de síntomas de la leprosis en hojas de naranjo con todas las especies no cítricas hospederas temporales del ácaro *B. yotheri* ($\chi^2=101,13$; $\alpha<0,0001$); es decir que no influye el tiempo de permanencia del ácaro en hospederos no

cítricos y, en consecuencia, el virus es transmitido con alta probabilidad a las plantas cítricas receptoras finales. Por tanto, se concluye que no hay efecto del tiempo de permanencia del ácaro *B. yotheri* sobre las especies no cítricas y que el virus puede ser igualmente transmitido por el vector luego de hospedarse en cualquiera de las plantas no cítricas evaluadas.

En la mayoría de los casos, el desarrollo de lesiones de leprosis en hojas de naranjo fue del 100 %, independientemente del tiempo que el ácaro permaneció

alimentándose en las diferentes plantas no cítricas utilizadas como hospederas alternas, excepto para los tratamientos de 20 días de alimentación en *C. variegatum*, *S. cayennensis* o *Dieffenbachia* sp., y para el tratamiento de 15 días sobre *H. rosa-sinensis*. Los altos promedios de ocurrencia de síntomas de la enfermedad demuestran que el CiLV puede ser transmitido efectivamente con alta probabilidad, una vez que el vector se ha hospedado de 2 a 20 días en cualquiera de las plantas no cítricas evaluadas como hospederas alternas del ácaro (tabla 1). Estos resultados confirman que las plantas hospederas no cítricas no tienen ningún efecto sobre la transmisión del virus por el ácaro y que el virus de la leprosis de los cítricos se transmite en forma persistente por el ácaro *B. yotheri*.

Detección del CiLV-C2 luego de hospedar el *B. yotheri* en plantas no cítricas

Una vez que los ácaros completaron el tiempo de permanencia en las plantas alternas no cítricas, se realizaron pruebas RT-PCR para la detección del CiLV-C2 en hojas de naranjo (*C. x sinensis*) con lesiones sintomáticas de leprosis, así como en los ácaros *B. yotheri* utilizados en los tratamientos.

Las figuras 4 y 5 muestran respectivamente el gel de agarosa al 1% con los productos de PCR de hojas de naranjo (*C. x sinensis*) sintomáticas y de ácaros *B. yotheri* virulíferos luego de haber sido alimentados en seis diferentes plantas hospederas no cítricas. La detección del CiLV-C2 en hojas de naranjo (*C. x sinensis*) con síntomas de leprosis fue positiva para los tratamientos en que el ácaro se hospedó, con un rango de 2 y 20 días de alimentación, en las plantas no cítricas *S. cayennensis*, *S. glutinosa*, *H. rosa-sinensis* y *S. acuta*. Sin embargo, no fue posible la detección cuando los ácaros se alimentaron en *C. variegatum* o *Dieffenbachia* sp. (figura 4), a pesar de que se observaron lesiones sintomáticas en las hojas de naranjo (*C. x sinensis*) de dichos tratamientos.

En la figura 5 se presenta la detección molecular del CiLV-C2 en ácaros *B. yotheri* por la técnica molecular RT-PCR cuando estos fueron hospedados de 2 a 20 días en plantas no cítricas. Los resultados muestran detección positiva del CiLV-C2 para los mismos tratamientos (*S. glutinosa*, *H. rosa-sinensis*, *S. acuta* y *S. cayennensis*) en los cuales el virus fue detectado en hojas de naranjo (*C. x sinensis*).



Figura 4. Detección de CiLV-C2 en hojas de naranjo (*C. x sinensis*), luego de ser hospedado el ácaro *B. yotheri* en plantas no cítricas. 1: marcador molecular HyperLadder IV (Bioline). 2-4: *S. cayennensis* (2, 8 y 20 DDA). 5-7: *H. rosa-sinensis* (2, 8 y 20 DDA). 8-9: *Dieffenbachia* sp. (2 y 20 DDA). 10-11: *C. variegatum* (2 y 20 DDA). 12-15: *S. glutinosa* (2, 8, 15 y 20 DDA). 16-20: *S. acuta* (2 y 20 DDA). 21: control positivo. 22: control negativo (DDA = días de alimentación en hospederas no cítricas).

Fuente: Elaboración propia

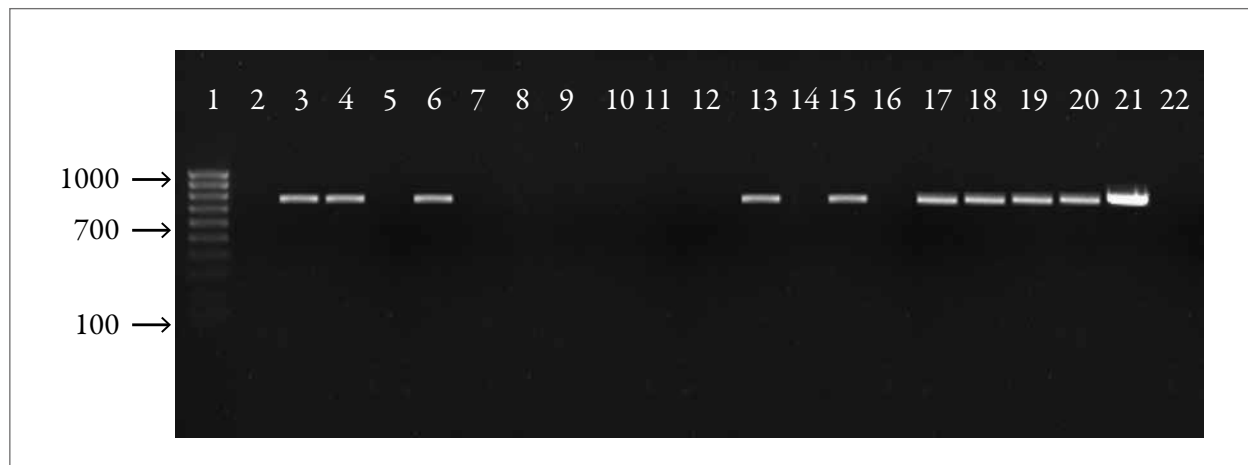


Figura 5. Detección del CiLV-C2 en ácaros *B. yotheresi* luego de ser hospedados en plantas no cítricas. 1: marcador molecular HyperLadder IV (Bioline). 2-4: *S. cayennensis* (2, 8 y 20 DDA). 5-7: *H. rosa-sinensis* (2, 8 y 20 DDA). 8-9: *Dieffenbachia* sp. (2 y 20 DDA). 10-11: *C. variegatum* (2 y 20 DDA). 12-15: *S. glutinosa* (2, 8, 15 y 20 DDA). 16-20: *S. acuta* (2 y 20 DDA). 21: control positivo. 22: control negativo (DDA=días de alimentación en hospederos no cítricos).

Fuente: Elaboración propia

Aun cuando los resultados del diagnóstico por RT-PCR para CiLV-C2 deberían haber sido positivos en todos los tratamientos de acuerdo con la expresión de los síntomas en las hojas de *C. x sinensis*, las pruebas no detectaron este tipo de virus en todos los casos. Esto puede deberse a la falta de uniformidad en tamaño y número de las lesiones observadas y colectadas en cada tratamiento, lo cual implica la obtención de diferentes concentraciones del virus por cada extracción para su procesamiento y detección. El hecho de que algunos tratamientos mostraron síntomas visuales de lesiones de leprosis sin que las pruebas RT-PCR detectaran el virus, podría también deberse a que las lesiones de leprosis desarrolladas en las hojas de naranjo (*C. x sinensis*) pudieron haberse ocasionado por infección mixta o por más de un tipo de virus de leprosis diferente a CiLV-C2.

Puesto que en este estudio se utilizaron iniciadores para la detección de CiLV-C2 en las pruebas RT-PCR, no fue posible detectar molecularmente otros virus como CiLV-N o CiLV-C, que producen lesiones similares a la leprosis y que recientemente fueron reportados en el país. En Colombia, el CiLV-C fue reportado desde 2004 (León et al.

2006b; León 2012), pero adicionalmente otros tipos de virus que producen lesiones sintomáticas de leprosis como el nuclear (CiLV-N) y el hibiscus green spot virus (HGSV) fueron detectados posteriormente al desarrollo de esta investigación (Roy et al. 2014). Más recientemente, y luego de finalizar esta investigación, también se comprobó infección mixta por más de un virus de leprosis (CiLV-C2 y CiLV-N) tanto en plantas de *C. x sinensis* y *S. glutinosa* como en ácaros vectores *B. yotheresi* en la región de la Orinoquía colombiana (Roy et al. 2015).

Conclusiones

Dado que los resultados muestran un promedio mayor al 85 % de hojas con presencia de lesiones de leprosis en hojas de naranjo (*C. x sinensis*) en todos los tratamientos, se concluye que los ácaros *B. yotheresi* infectados con el virus son capaces de transmitir efectivamente el CiLV a plantas de naranjo Valencia (*C. x sinensis*) en un alto porcentaje, sin importar que hayan sido hospedados en cualquiera de las plantas alternas no cítricas evaluadas.

Puesto que se encontró alta probabilidad de transmisión del CiLV hacia plantas cítricas (promedios entre 85 y 100%) cuando el ácaro *B. yothersi* fue hospedado durante periodos de 2 a 20 días en plantas alternas no cítricas, este estudio confirma que el virus de la leprosis se transmite por el ácaro *B. yothersi* en forma persistente.

Teniendo en cuenta que las pruebas RT-PCR no fueron positivas para CiLV-C2 en todos los tratamientos, podemos sugerir que otros tipos de virus causantes de lesiones de leprosis reportados recientemente en Colombia (como el CiLV-C, el CiLV-N o el CiLV) pudieron estar presentes en las muestras

procesadas en este estudio y lograron producir los síntomas de leprosis que no fueron detectables con los iniciadores específicos para CiLV-C2.

Descargos de responsabilidad

Esta investigación fue financiada mediante convenio UF 12251 suscrito entre la University of Florida y Corpoica. Hace parte del proyecto "Transmission of the Emerging Citrus Pathogen Cytoplasmic Citrus Leprosis Virus by *Brevipalpus mites*", que fue adelantado con el mismo convenio. Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Referencias

- Bastianel M, Bassanezi R, Freitas J, Kitajima E, Kubo K, Machado M. 2010. Citrus leprosis: centennial of an unusual mite – virus pathosystem. *Plant Dis.* 94(3):284-293.
- Bastianel M, Freitas A, Rodrigues V, Arrivabem F, Antonioli L, Machado M. 2004. Resposta do tangor 'Murcott' à inoculação do vírus da leprose dos citros em campo e em casa de vegetação. *Laranja.* 25(2):337-348.
- Becerra H, López V, Matheus H, Bastidas A. 2007. Monitoreo de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) vector de la leprosis de los cítricos en el Meta y Casanare. Resumen presentado en: XXXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología Socolen; Cartagena, Colombia.
- Boaretto M, Chiavegato L. 1994. Transmissão da leprose por ácaros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) temporariamente mantidos em hospedeiros intermediários, em condições de laboratório. *Científica.* 22(1):81-93.
- Boaretto M, Chiavegato L, Silva C. 1993. Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. *Científica.* 21(2):245-253.
- Chagas C, Rosseti V. 1983. Transmission of leprosis symptoms by a grafting infected tissue. Paper presented at: Ninth Conference of the International Organization of Citrus Virologists; Riverside, EE. UU.
- Chagas C, Rosseti V, Chiavegato L. 1983. Influence of the biological cycle of *Brevipalpus phoenicis* on leprosis transmission. Paper presented at: Ninth Conference of the International Organization of Citrus Virologists; Riverside, EE. UU.
- Chiavegato L. 1996. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. *Laranja.* 17(1):229-235.
- Childers C, Rodrigues J, Welbourn W. 2003. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. *Exp Appl Acarol.* 30(1-3):29-105.
- Colariccio A, Lovisolo O, Chagas C, Galetti S, Rossetti V, Kitajima E. 1995. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. *Fitopatol Bras.* 20(2):208-213.
- Domingues A, Rodrigues J. 1999. Ocorrência de leprose dos citros em Paraíso do Tocantins (TO). *Laranja.* 20(1):35-50.
- Flat Mites of the World. 2015. Fort Collins (CO), USA: Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; [consultado 2015 ago]. <http://idtools.org/id/mites/flatmites/>.
- Freitas J, Cavalcante M, Locali E, Antonioli R, Domingues A, Machado M. 2004. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. *Virus Rev Res.* 9(1 Suppl):246-247.
- Freitas J, Kitajima E, Locali E, Antonioli L, Bastianel M, Machado M. 2005. Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. Ponencia presentada en: XLV Annual Meeting of the American Phytopathological Society. Caribbean Division; San José, EE. UU.
- Garita L, Tassi A, Calegario R, Freitas J, Salaroli R, Romão G, Kitajima W. 2014. Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). *Trop Plant Pathol.* 39(1):43-55.
- [GBIF] Global Biodiversity Information Facility. 2013. GBIF Backbone Taxonomy. Denmark; [consultado 2015 ago]. <http://www.gbif.org>.
- Kitajima E, Chagas C, Rodrigues J. 2003. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. *Exp Appl Acarol.* 30(1):135-160.

- Kitajima E, Ferreira P, Freitas J, Machado M. 2004. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. *Summa Phytopathol.* 30:68.
- León G. 2012. Current status of the citrus leprosis virus (CiLV-C) and its vector *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). *Agron Colomb.* 30(2):242-250.
- León G, Becerra H, Salarolli R, Kitajima E. 2008. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus Cytoplasmatic type (CiLV-C) in Colombia. *Plant Dis.* 92(9):1364.
- León G, Kitajima E, Freitas J. 2006. Diagnóstico y recomendaciones de manejo para la leprosis de los cítricos. *Boletín Técnico.* 47:1-24.
- León G, Kitajima E, Freitas A, Childers C, Achor D, Salarolli R, Mesa C. 2006a. Occurrence of Citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. *Plant Dis.* 90(5):682.
- León G, Kitajima E, Freitas A, Machado M, Meza N. 2006b. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria.* 7(2):67-72.
- León G, Roy A, Choudhary N, Brlansky R. 2014. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo 2 citoplasmático (CiLV-C2) en los departamentos de Meta y Casanare. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria.* 15(2):207-217.
- Locali E, Freitas A, Souza A, Takita M, Astúa G, Antonioli R, Kitajima E, Machado M. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to Citrus production in the Americas. *Plant Dis.* 87(11):1317-1321.
- Locali E, Freitas A, Machado M. 2004. Leprose dos citros: biologia e diagnóstico. *Laranja.* 25(1):53-68.
- Lovisollo O, Colariccio A, Masenga V. 2000. New experimental hosts and further information on citrus leprosis virus. Ponencia presentada en: Fourteenth IOCV Conference, 2000-Other Viruses; Riverside, EE. UU.
- Maia A, Oliveira C. 2002. Capacidade de colonização de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) em cercas vivas, quebra-ventos e plantas daninhas. Ponencia presentada en: XIX Congresso Brasileiro de Entomologia; Manaus, Brasil.
- Maia A, Oliveira C. 2005. Transmissibilidade do vírus da leprose de cercas-vivas, quebra-ventos e plantas daninhas para laranjeiras através de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). *Bragantia.* 64(3):417-422.
- Nunes M, De Oliveira C, De Oliveria M, Kitajima E, Hilf M, Gottwald T, Freitas J. 2012. Transmission of citrus leprosis virus C by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to alternative host plants found in citrus orchards. *Plant Dis.* 96(7):968-972.
- Oliveira C. 1996. Ácaro vetor da leprose dos citros: aspectos biológicos. *Laranja.* 17(1):229-295.
- [ONPP] Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. 2005. Detección de la Leprosis en el estado de Chiapas, México. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Sistema de Alerta Fitosanitaria; [consultado 2015 ago]. <http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=165>.
- Rodrigues J, Childers C, Kitajima E, Machado M, Nogueira N. 2001. Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. *Laranja.* 22(2):412-423.
- Roy A, Choudhary N, Leon G, Shao J, Govindarajulu A, Achor D, Wei G, Picton DD, Levy L, Nakhla M, et al. 2013. A novel virus of the genus Cilevirus causing symptoms similar to citrus leprosis. *Phytopathology.* 103(5):488-500.
- Roy A, Hartung J, Schneider W, Shao J, León G, Melzer M, Beard J, Otero-Colina G, Bauchan GR, Ochoa R, et al. 2015. Role bending: complex relationships between viruses, hosts and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. *Phytopathology.* 105(7):1013-1025
- Roy A, León G, Stone A, Schneider W, Hartung J, Brlansky R. 2014. First report of *Citrus leprosis virus* nuclear type in sweet orange in Colombia. *Plant Dis.* 98(8):1162.
- Salvo F A. 1997. Notas sobre o tratamento fitossanitário em citros. *Laranja.* 18:155-163.
- Ulian F, Oliveira C. 2002. Leprosis citrus mite *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, behavior on different plants species, used as wind-break in citrus orchards. *Rev Agric (Piracicaba).* 77(1):103-112.