

# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN FITOSANIDAD

ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

## RELACIÓN DE LA CARGA DE INÓCULO Y LA EFICIENCIA DE TRANSMISIÓN DEL VIRUS DE LA LEPROSIS (CiLV-C) EN DIFERENTES ESPECIES DE CÍTRICOS POR ADULTOS DE *Brevipalpus yothersi*

RENATA RODRÍGUEZ RAMÍREZ

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

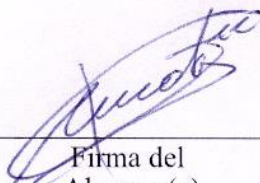
2019

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Renata Rodríguez Ramírez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Ma. Teresa Santillán Galici, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Relación de la carga de inóculo y la eficiencia de transmisión del virus de la leprosis (CiLV-C) en diferentes especies de cítricos por adultos de Brevipalpus yothersi

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 11 de febrero de 2019

  
Firma del  
Alumno (a)

  
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Relación de la carga de inóculo y la eficiencia de transmisión del virus de la leprosis (CiLV-C) en diferentes especies de cítricos por adultos de *Brevipalpus yothersi***, realizada por la alumna: **Renata Rodríguez Ramírez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD  
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

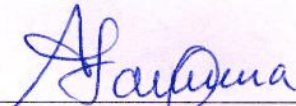
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



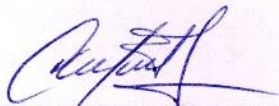
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia

ASESORA



\_\_\_\_\_  
Dra. Laura D. Ortega Arenas

ASESOR



\_\_\_\_\_  
Dr. Ariel W. Guzmán Franco

ASESOR



\_\_\_\_\_  
Dr. Saúl Sánchez Soto

Montecillo, Texcoco, Estado de México, febrero de 2019

**RELACIÓN DE LA CARGA DE INÓCULO Y LA EFICIENCIA DE TRANSMISIÓN  
DEL VIRUS DE LA LEPROSIS (CiLV-C) EN DIFERENTES ESPECIES DE  
CÍTRICOS POR ADULTOS DE *Brevipalpus yothersi***

**Renata Rodríguez Ramírez, M. en C.**

**Colegio de Postgraduados, 2019**

**RESUMEN**

La leprosis de los cítricos es considerada una de las principales enfermedades virales que afecta la producción de cítricos, el agente causal (CiLV-C) es transmitido por ácaros del género *Brevipalpus*. En este estudio se determinó la eficacia que tiene el ácaro *B. yothersi* para adquirir y transmitir el virus, en función de la carga viral dada por el tiempo de adquisición (alimentación) de 1, 12, 24, 36 y 48 h, y la capacidad para invadir y establecerse en diferentes especies de cítricos (naranja, mandarina, toronja y limón). Los resultados indican que los adultos de *B. yothersi* adquirieron CiLV-C en todos los tiempos evaluados, aunque la carga viral, no estuvo definida por el tiempo de adquisición. Se seleccionó el periodo de adquisición de 24 h para el experimento de transmisión. Las hembras adultas de *B. yothersi* se establecieron (formación de colonias con presencia de huevos, larvas, ninfas y adultos) y transmitieron CiLV-C a todas las especies de cítricos evaluadas, pero hubo mayor preferencia en naranja-mandarina que en toronja-limón persa.

**Palabras clave:** *Brevipalpus yothersi*, carga de inóculo, CiLV-C, cítricos, transmisión.

**RELATIONSHIP BETWEEN VIRUS CONCENTRATION AND TRANSMISSION  
OF THE CiLV-C ON DIFFERENT CITRUS SPECIES BY *Brevipalpus yothersi***

**Renata Rodríguez Ramírez, M. en C.**

**Colegio de Postgraduados, 2019**

**ABSTRACT**

The citrus leprosis is one of the main viral diseases affecting the citrus production. One of the main causative agents is the Citrus leprosis virus C (CiLV-C), transmitted by mites within the genus *Brevipalpus*. We determined the efficiency of *B. yothersi* to acquire and transmit CiLV-C to different species of citrus (orange, mandarin, grapefruit and lime). Mites were allowed to feed on infected orange tissue during 1, 12, 24, 36 and 48 h. In addition, the establishment of the mite in these citrus species based on their population increase was assessed.

No relationship between acquisition time and virus concentration in *B. yothersi* were found. We selected an acquisition time of 24 h for the transmission experiment. The females of *B. yothersi* transmitted the virus to all citrus species evaluated but at different rates. The proportion of infected leaves was greater in orange and mandarin compared to grapefruit and lime. Population of *B. yothersi* successfully established (developed colonies with eggs, larvae, nymph and adults) in orange and mandarin but not in grapefruit and lime trees.

**Key words:** *Brevipalpus yothersi*, virus concentration, CiLV-C, citrus, transmission.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca y el apoyo otorgado para la realización de mi Posgrado.

Al Colegio de Postgraduados, por abrirme sus puertas y permitirme realizar mis estudios de Maestría.

Al Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Chiapas y a la DGSV-SENASICA por el apoyo otorgado mediante el proyecto “Distribución y rango de hospedantes del virus de la leprosis de los cítricos, citoplasmático y nuclear, y su relación con la especie del ácaro vector: Información para determinar el riesgo de dispersión del virus y generar una propuesta de manejo y contención”.

A la Dra. Ma. Teresa Santillán Galicia, por brindarme la oportunidad de ser su estudiante; asimismo por su confianza, motivación, apoyo, enseñanzas y buen consejo, sobre todo por su entusiasmo y reafirmarme que todo trabajo bien logrado por pequeño que parezca, es valioso.

A la Dra. Laura D. Ortega Arenas, por su disponibilidad, confianza, enseñanzas y motivación en todo momento; así como sus sugerencias y apoyo brindado en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Ariel W. Guzmán Franco, por su paciencia, disponibilidad, enseñanzas y motivación; así como sus sugerencias y apoyo brindado en la realización del presente trabajo.

Al Dr. Saúl Sánchez Soto, por el apoyo otorgado, disponibilidad y sugerencias hechas al presente trabajo.

Al Dr. Héctor González Hernández, por su motivación y disponibilidad; así como sus sugerencias y apoyo brindado en la revisión del presente trabajo.

A los profesores del Colpos, por sus valiosas enseñanzas, lo cual contribuyo en mi formación académica; así como al personal administrativo y de laboratorio por el apoyo brindado.

A mis amig@s y compañer@s del laboratorio de Acarología, Patología de insectos, Biología Molecular General, cubículo y de asignatura, por su apoyo durante mi estancia en el Colpos.

A mi familia, seres queridos y amig@s, por su apoyo y amistad, por siempre tener una palabra alentadora para continuar ¡Gracias por estar!

A Néstor Jorge por ser en todo momento mi soporte y gran apoyo durante este periodo ¡Gracias por estar!

A la vida, al universo, al Creador, por permitirme llegar hasta este momento ¡Gracias!

## **DEDICATORIA**

A mi hermosa madre, la Sra. Ma. Guillermina J. Ramírez Ayala y a mi querido padre, el Sr. Arturo Rodríguez Quenel, por siempre contar con su amor y apoyo ¡Los amo!

“Toda persona que pueda enseñarnos a dar un paso más adelante  
en el sendero de la vida, es nuestro maestro”

**J. A. Martínez García**



## CONTENIDO

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE CUADROS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	5
2.1 Objetivo general .....	5
2.2 Objetivos específicos .....	5
2.3 Hipótesis .....	5
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
3.1 Leptosia de los cítricos.....	6
3.1.1 Agente causal .....	7
3.1.2 Síntomas y daños .....	12
3.1.3 Distribución geográfica.....	15
3.1.4 Métodos de diagnóstico de la leptosis .....	16
3.1.4.1 Microscopia electrónica .....	16
3.1.4.2 Anticuerpos .....	17
3.1.4.3 Detección por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	18
3.1.4.4 PCR con transcripción inversa (RT-PCR) .....	19
3.1.4.5 Detección por PCR en tiempo real .....	20
3.2 Ácaro vector <i>Brevipalpus</i> spp. ....	22
3.2.1 Hospederos.....	23
3.3 Mecanismos de transmisión.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
4.1 Localización de experimentos .....	29
4.2 Material vegetal .....	29
4.2.1 Con síntomas de CiLV-C .....	29
4.2.2 Sin síntomas de CiLV-C .....	30
4.2.3 Diagnóstico para material vegetal mediante RT-PCR .....	30

4.2.4 Obtención y mantenimiento de las plantas de las diferentes especies de cítricos.....	31
4.3 Ácaro vector <i>Brevipalpus yothersi</i> .....	32
4.3.1 Establecimiento de la colonia.....	32
4.3.2 Diagnóstico de CiLV-C en <i>B. yothersi</i> mediante ensayos de RT-PCR .....	33
4.4 Cuantificación de la carga de inóculo del virus mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR) .....	34
4.4.1 Establecimiento de la curva estándar .....	34
4.4.2 Comparación de sensibilidad .....	35
4.5 Relación del periodo de adquisición y la carga de inóculo de CiLV-C .....	36
4.5.1. Análisis de datos .....	37
4.6 Capacidad de transmisión de CiLV-C por hembras de <i>B. yothersi</i> y su establecimiento en diferentes especies de cítricos .....	38
4.6.1 Análisis de datos .....	41
5. RESULTADOS .....	42
5.1 Relación del periodo de adquisición y la carga de inóculo de CiLV-C .....	42
5.2 Capacidad de transmisión de CiLV-C por hembras de <i>B. yothersi</i> y su establecimiento en diferentes especies de cítricos .....	43
6. DISCUSIÓN .....	47
7. CONCLUSIONES.....	57
8. LITERATURA CITADA.....	58

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos para determinar la capacidad de transmisión de CiLV-C por hembras de <i>B. yothersi</i> .....	39
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cría de <i>Brevipalpus yothersi</i> en frutos de naranja. ....	33
Figura 2. Arenas experimentales para las pruebas de adquisición de CiLV-C por hembras adultas <i>B. yothersi</i> .....	37
Figura 3. Pruebas de transmisión de CiLV-C por <i>B. yothersi</i> en cuatro especies de cítricos en condiciones de invernadero. ....	41
Figura 4. Concentración de CiLV-C en hembras de <i>B. yothersi</i> expuestas a diferentes periodos de adquisición. ....	42
Figura 5. Proporción de hojas infectadas con CiLV-C en diferentes especies de cítricos en las pruebas de transmisión con <i>B. yothersi</i> .....	43
Figura 6. Número de huevos de <i>B. yothersi</i> que se desarrollaron durante 60 días en hojas de diferentes especies de cítricos.....	44
Figura 7. Número de inmaduros de <i>B. yothersi</i> que se desarrollaron durante 60 días en hojas de diferentes especies de cítricos.....	45
Figura 8. Número de hembras adultas de <i>B. yothersi</i> que se desarrollaron durante 60 días en hojas de diferentes especies de cítricos.....	46

## 1. INTRODUCCIÓN

La leprosis de los cítricos es considerada una de las principales enfermedades virales que afectan la producción de cítricos, sobre todo a países de Sudamérica, de donde se considera endémica (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010; NAPPO, 2015).

Esta enfermedad se asocia con dos grupos de virus que producen partículas virales baciliformes, principalmente en el citoplasma o en el núcleo de células de las plantas infectadas: Citrus leprosis virus C (CiLV-C) y Citrus leprosis virus N (CiLV-N), respectivamente (Roy *et al.*, 2015; SENASICA, 2016). La leprosis tipo citoplasmática (CiLV-C) es la más frecuente y distribuida, siendo miembro del género *Cilevirus* (Bastianel *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2015; Choudhary *et al.*, 2015; Arena *et al.*, 2016a; SENASICA, 2016). Ésta se caracteriza por causar lesiones en hojas, ramas y frutos, ocasionando la caída de la fruta o la pérdida del valor estético de la misma para consumo en fresco (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010; NAPPO, 2015; Tassi *et al.*, 2017; Chabi-Jesus *et al.*, 2018). Bajo altas condiciones de inóculo, puede causar la muerte de plantas jóvenes susceptibles (Bastianel *et al.*, 2010).

Los virus causales de la leprosis son transmitidos por ácaros del género *Brevipalpus* (Fam. Tenuipalpide) (Colariccio *et al.*, 1995; Bastianel *et al.*, 2010; Arena *et al.*, 2016a; Garita *et al.*, 2014; Sánchez-Velázquez *et al.*, 2015; Choudhary *et al.*, 2015).

Se han relacionado varias especies, destacando *B. obovatus*, *B. californicus* y *B. phoenicis sensu lato* (Bastianel *et al.*, 2006; Rodrigues y Childers 2013).

Entre los virus transmitidos por los ácaros *Brevipalpus*, el tipo citoplasmático (CiLV-C) ha recibido más atención debido a su mayor prevalencia e importancia (Rodrigues *et al.*, 2003; Rodrigues y Childers 2013; Tassi *et al.*, 2017). El CiLV-C es transmitido por las larvas, ninfas y adultos, de manera persistente, circulativa, no propagativa (Tassi *et al.*, 2017).

En el 2015, se realizó una revisión del estatus de la especie de *B. phoenicis*, de lo cual se derivan ocho nuevas especies, entre las que destacan *B. hondurani* Evans, *B. papayensis* Baker, *B. phoenicis sensu stricto* (Geijskes) y *B. yothersi* (Beard *et al.*, 2015). Dentro del grupo de especies que transmiten el virus, *B. yothersi* [anteriormente *B. phoenicis sensu lato* (Geijskes)] se considera como el principal vector (Arena *et al.*, 2016a; Tassi *et al.*, 2017); y es la especie más común en huertos de cítricos en Brasil y México (Sánchez- Velázquez *et al.*, 2015; Tassi *et al.*, 2017).

Las especies de *Citrus* son hospedantes naturales, las cuales varían en su susceptibilidad para CiLV-C, desde la naranja dulce altamente susceptible (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) a la mandarina (*C. reticulata* Blanco) y pomelo (*C. paradisi* McFarl.) moderadamente susceptible y al limón que prácticamente se considera inmune (*C. limon* L.) (Bastianel *et al.*, 2010; Garita *et al.*, 2013; Garita *et al.*, 2014).

En naranja dulce, como en hospedantes alternos y plantas indicadoras se han llevado a cabo varios trabajos de transmisión de CiLV-C mediante la inoculación mecánica y a través del ácaro vector, principalmente en Brasil, con la finalidad de comprender mejor la relación virus-vector-hospedante (Tassi *et al.*, 2017). Por otra parte, León (2013) determinó tiempos de adquisición y transmisión de CiLV por *B. phoenicis*, encontrando que los ácaros requieren un mínimo de 30 min de alimentación sobre hojas de naranja Valencia con lesiones de leprosis y un período mínimo de 10 min para transmitirlo a la misma especie cítrica. En otro estudio realizado por García-Escamilla *et al.* (2017), se reporta que *Brevipalpus yothersi* adquirió CiLV-C y lo transmitió sólo a cultivares cítricos dulces (naranja, mandarina y toronja), mientras que *B. californicus* no fue capaz de adquirirlo ni transmitirlo.

En México se reportó oficialmente la presencia de la leprosis en 2004 en huertos comerciales y de traspatio de naranja dulce en Chiapas. Para el 2016, la enfermedad se extendió hacia estados del sureste y centro (SENASICA, 2016); por lo que, actualmente, se encuentra presente prácticamente en la mayoría de los estados citrícolas del país (SENASICA, 2017; González-García *et al.*, en prensa). La leprosis ha afectado seriamente a las naranjas dulces, principalmente, provocando manchado en hojas y fruta, caída temprana de fruta o de las hojas y muerte de ramas, que han puesto en riesgo las 573 mil ha de cítricos que se tienen establecidas en el país, las cuales producen alrededor de 7,843 millones de toneladas anuales, con un valor de la producción de 17,311 millones de pesos (SIAP, 2017).

Reportes recientes indican que *B. yothersi* se encuentra en todas las regiones productoras de cítricos de México (Sánchez-Velázquez *et al.*, 2015; Salinas-Vargas *et al.*, 2016), por lo que es factible que la leprosis se disemine en todas las áreas citrícolas, lo que pone en riesgo la producción nacional. En este escenario es importante determinar la eficacia que tiene este ácaro vector para transmitir el virus de la leprosis a diferentes especies de cítricos (dulces y ácidos), determinada por ciertos parámetros como el tiempo de adquisición y concentración del CiLV-C en *B. yothersi* y en la planta (carga de inóculo), información que provee las bases para ampliar el conocimiento de las interacciones planta-virus-vector, lo cual es fundamental para el establecimiento de programas de prevención y manejo de la enfermedad.



## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivo general

Determinar la eficacia de hembras adultas de *B. yothersi* para transmitir CiLV-C a diferentes especies de cítricos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar la carga viral de CiLV-C que pueden adquirir hembras adultas de *B. yothersi* durante diferentes tiempos de adquisición.
- Determinar la capacidad de hembras adultas de *B. yothersi* para transmitir CiLV-C y establecerse en diferentes especies de cítricos.

### 2.3 Hipótesis

La capacidad de transmisión de CiLV-C por hembras de *B. yothersi* está relacionada con la concentración del virus que el ácaro adquiere al momento de alimentarse de una planta infectada, independientemente de la especie de cítrico hospedante.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Leptosia de los cítricos

La leptosis de los cítricos es considerada una de las principales enfermedades virales que afectan a la producción de cítricos, principalmente en Brasil (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010; NAPPO, 2015), debido a los altos costos para el control químico de su vector, ácaros del género *Brevipalpus*; además, esta enfermedad es considerada endémica en varios países de Sudamérica (Bastianel *et al.*, 2010; NAPPO, 2015; Chabi-Jesus *et al.*, 2018). Su importancia mundial aumentó significativamente en los últimos años, con la dispersión del virus a otros países de Centroamérica y Sudamérica (Bastianel *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2013; León *et al.*, 2014), por lo que esta enfermedad es considerada de carácter cuarentenario, es decir con restricciones, con lo cual se busca proteger la industria cítrica de países citricultores que aún no están afectados (León *et al.*, 2014; León *et al.*, 2017).

La leptosis fue descrita por primera vez en Florida (E.U.A.) en 1901 (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010; NAPPO, 2015), en donde fue nombrada “corteza escamosa” debido a los síntomas característicos de lesiones en el tallo y la descamación de la corteza. Sin embargo, hasta ahora, la enfermedad ya no se ha reportado en los Estados Unidos (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010). En 1926, la enfermedad fue llamada “leptosia” por Fawcett y Lee (Bastianel *et al.*, 2010). En América del Sur, fue identificada en Paraguay, y se le nombró "lepra

explosiva". En un corto período, esta enfermedad también se observó en Argentina y Uruguay; y en 1931 en Brasil (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010).

La enfermedad se asoció con la presencia de ácaros de la Familia Tenuipalpidae y se sugirió que los síntomas observados eran en respuesta a la inyección de toxinas presentes en las glándulas salivales del ácaro o de un posible virus transmitido por los mismos (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010). Después de la observación de viriones en tejido sintomático a través de microscopía de transmisión de electrones (TEM) y la expansión de la lesión sobre corteza a tejido vegetal sano en tallo mediante injerto en un cítrico; así como la transmisión a hospedantes alternos a través de la inoculación mecánica, la etiología viral fue confirmada (Kitajima *et al.*, 1972; Bastianel *et al.*, 2006).

### **3.1.1 Agente causal**

La leprosis de los cítricos es causada por miembros de un grupo heterogéneo de virus con ssARN baciliformes asignados a los géneros *Cilevirus*, *Higrevirus* y *Dichorhavirus*. En las células vegetales infectadas, los virus de los dos primeros géneros se replican en el citoplasma, mientras que los *Dichorhavirus* se replican y acumulan en el núcleo, lo cual es un rasgo que identifica a los dos tipos, la leprosis citoplásmica y la nuclear (Chabi-Jesus *et al.*, 2018).

La leprosis tipo citoplasmática está ampliamente distribuida en las principales áreas comerciales de cítricos en América Latina. A la fecha se conocen dos virus citoplasmáticos causantes de la leprosis por el género *Cilevirus*: Citrus leprosis virus

C (CiLV-C), que es el más prevalente en huertas de naranja dulce, y el Citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2) que se encontró en Colombia (Bastianel *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2013; Choudhary *et al.*, 2015; Arena *et al.*, 2016a). Otro virus, del género *Higrevirus*, que se considera como potencial agente causal de la leprosis es Hibiscus green spot virus 2 (HGSV 2), el cual infecta principalmente a plantas de hibiscus. El HGSV 2, está asociado con síntomas parecidos a la leprosis observados en limones *C. volkameriana* Tan. y Pasq. y en plantas de naranja dulce Navel en Hawaii (Chabi-Jesus *et al.*, 2018).

La leprosis tipo nuclear es menos frecuente, pero se reporta afectando varias especies cítricas comerciales, como naranja dulce, limón [(*Citrus x limón*) (L.) Burm. F.], naranja agria (*C. aurantium*), pomelo o toronja [(*C. x paradise*) Macfadyen], lima [(*C. aurantifolia*) (Christm.) Swingle], mandarina [(*C. reticulata*) Blanco] y limón persa [(*C. x latifolia*) Tanaka] (Cruz-Jaramillo *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2015; Chabi-Jesus *et al.*, 2018). Actualmente, dos *Dichorhavirus* causan la leprosis tipo nuclear, cepas de Orchid fleck virus (OFV-citrus) han sido reportadas en huertas de México y Colombia. Asimismo, se han detectado focos aislados de CiLV-N en áreas con cítricos no comerciales en Brasil (Chabi-Jesus *et al.*, 2018).

Los viriones de CiLV-C son partículas baciliformes cortas con 50–55 × 120–130 nm, que contienen un genoma de 13,731 nucleótidos, con dos moléculas de ARN monocatenario de sentido positivo (+), las cuales contienen estructuras de cap 5' y colas poli (A) 3'. El ARN1 (8745 nt) contiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs), que corresponden a una proteína de 286-kDa con cuatro dominios putativamente

implicados en la replicación, y una proteína de 29-kDa de la cubierta de la misma. El ARN2 (4,986 nt) contiene cuatro ORFs que corresponden a 15-, 61-, 32- y 24-kDa, codificando la proteína de movimiento putativo (MP) (Bastianel *et al.*, 2010; Choudhary *et al.*, 2015; Arena *et al.*, 2016a).

El Citrus leprosis virus tipo nuclear (CiLV-N) produce partículas baciliformes (40-50 x 100-110 nm) que pueden encontrarse en el núcleo o citoplasma y con frecuencia son asociadas a las membranas. Una característica del núcleo de las células infectadas es la presencia de un viroplasma. El genoma de CiLV-N está compuesto de ARN 1 ( $\approx$ 6.4 kb) y ARN2 ( $\approx$ 6.0 kb), cercanamente parecido al Orchid fleck virus (OFV), con un 92-95% similitud de secuencia a nivel nucleótido y 96-98% a nivel aminoácido. Esto sugiere que al aislado mexicano del virus tipo nuclear puede considerarse una cepa de OFV infectando cítricos, en lugar de un virus diferente (Dietzgen *et al.*, 2014), como fue demostrado por Roy *et al.* (2013) al analizar muestras de cítricos con leprosis del estado de Querétaro, México, en donde la secuencia del genoma obtenido correspondió a CiLV-N con un ARN1 (6,268 nt) y ARN2 (5,847 nt) y ambos ARN con 3'-cola terminal poli (A). Asimismo, el tamaño y estructura del genoma de CiLV-N asemeja la organización del genoma del virus OFV (Roy *et al.*, 2013; NAPPO, 2015), excepto por tener pequeñas 3'-regiones no traducidas (UTR) en ARN1 (53 nt) y ARN2 (35 nt) excluyendo la cola poli (A). El ARN1 contiene cinco marcos de lectura (ORF), donde el ORF1 codifica la proteína nucleocápside (N), mientras que el ORF5 contiene glicoproteína (G). Los ORF2, ORF3, y ORF4 codifican la fosfoproteína (P), la proteína de movimiento de célula a célula y la proteína de matriz (M), respectivamente. El ARN2 contiene un solo ORF

que codifica la replicación del ARN polimerasa (RdRp) dependiente de ARN (Roy *et al.*, 2013). Cabe resaltar, que el CiLV-N se identificó como la probable causa de la forma templada de la enfermedad de la leprosis de los cítricos en Florida, USA (Roy *et al.*, 2013; Dietzgen *et al.*, 2014).

En Colombia se encontró un nuevo tipo de virus de la leprosis, el cual se clasificó dentro del género *Cilevirus*, denominado virus de la leprosis de los cítricos tipo C2 (CiLV-C2). El genoma completo de CiLV-C2 contiene en sus ARN 1 y 2 un total de 8,717 y 4,989 nucleótidos, respectivamente. El ORF1 codifica el módulo de replicación y contiene en su ARN1, máximo de 60% de nucleótidos y aminoácidos idénticos a los que posee el ORF1 de CiLV-C; la proteína putativa (CPG) p29, del CiLV-C2, tiene en su secuencia únicamente 48% de nucleótidos y 33% de aminoácidos idénticos a los de la secuencia de la p29 del CiLV-C. Además, el ARN2, que codifica la proteína de movimiento (MP), contiene un ORF adicional y una proteína hipotética (p7) más que el ARN2 del CiLV-C (León *et al.*, 2014).

El Orchid fleck virus (OFV) es un patógeno viral importante de las orquídeas, ya que causa manchas cloróticas o necróticas en las orquídeas de varias especies y tiene una distribución global. Las partículas de OFV se asemejan superficialmente a los Rhabdovirus de plantas, pero son significativamente más pequeñas (40 x 100-150 nm) y no tienen una envoltura lipídica claramente distinguible (Dietzgen *et al.*, 2014). En secciones del tejido vegetal infectado, algunos viriones están dispuestos radialmente, rodeados por una membrana. Esta configuración llamada "ruedas de radios" es una característica típica de OFV. Los efectos citopáticos causados por

OFV se asemejan a los de los nucleorhabdovirus al desarrollar una inclusión (viroplasma) en los núcleos de las células infectadas (Dietzgen *et al.*, 2014).

El genoma (-) ssRNA de los aislamientos de OFV So y NHHS1 consta de dos moléculas, RNA 1 (6,413 nt) y RNA 2 (6,001 nt), con una capacidad de codificación total de  $\approx$ 12,4 kb. Las secuencias genómicas de ambos aislamientos secuenciados son 98.5% idénticas. El ARN 1 codifica, en sentido complementario, con cinco proteínas siguientes: la proteína nucleocápside (ORF1/N), la fosfoproteína putativa (ORF2/P), la proteína de movimiento putativo (ORF3/3), la proteína de matriz putativa (ORF4/M) y la glicoproteína putativa. (ORF5/G). El ARN 2 codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (ORF6/L). Por lo anterior, a pesar de tener un genoma dividido, el orden genético de OFV se asemeja al de los rhabdovirus de plantas, todos los cuales tienen un genoma monopartito de 11-13 kb y el orden genético general de 3'-NP-3M-GL-5' (Dietzgen *et al.*, 2014).

Con base en las similitudes de secuencia de la proteína nucleocápside, los genes de la glicoproteína putativa (G) y la ARN polimerasa (L) dependientes de ARN, con los de los nucleorhabdovirus (Género *Nucleorhabdovirus*), se ha sugerido que OFV es un miembro de una nueva especie para ser incluido en un nuevo género rhabdoviral (*Dichorhavirus*) o como miembro de un género de flotación libre no identificado fuera del orden Mononegavirales (Dietzgen *et al.*, 2014).

El Citrus chlorotic spot virus (CiCSV) provoca manchas cloróticas locales que se asemejan a lesiones tempranas de la leprosis de los cítricos, las cuales se han

observado en hojas de naranja dulce en Brasil. Estas manchas son más grandes y menos brillantes que las típicas de leprosis y muestran una necrosis casi nula (Chabi-Jesus *et al.*, 2018). En tejidos sintomáticos, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se observó la presencia de viroplasmos en los núcleos de las células parenquimatosas infectadas y las partículas en forma de barra con un tamaño promedio de 40 x 100 nm, que se semejan, a las de un *Dichorhavirus*. Éste cuenta con genoma bipartito putativo con ARN1 de 6,518 nt y ARN2 de 5,987 nt; cinco ORFs detectados en la orientación 3' a 5' de la molécula de RNA1, nombrados como genes N, P, MP, M y G, mientras que, un sexto detectado en el RNA2 sobre el genoma entero, fue identificado como el RNA dependiente-RNA polimerasa putativo (Chabi-Jesus *et al.*, 2018). También se encontró CiCSV en hojas de la planta ornamental hibisco de playa [*Talipariti tiliaceum* (L.) Fryxell]. El análisis de su genoma en estructura y filogénicamente, indica una relación cerrada con CoRSV y otros miembros del género *Dichorhavirus*. Los síntomas de CiCSV se parecen más a infecciones de CoRSV en hojas de café y frutillas que a los típicos de la leprosis de los cítricos (Chabi-Jesus *et al.*, 2018).

### **3.1.2 Síntomas y daños**

Los virus transmitidos por los ácaros del género *Brevipalpus* inducen la aparición de lesiones cloróticas o necróticas locales (zona de alimentación) en sus plantas hospedantes (Bastianel *et al.*, 2006).

La infección por CiLV-C produce lesiones cloróticas o necróticas alrededor de los sitios de alimentación del ácaro, debido a que el virus no se disemina



sistémicamente en ninguno de sus hospedantes conocidos, por lo que se limita a lesiones locales donde las partículas virales se acumulan (Bastianel *et al.*, 2010; Choudhary *et al.*, 2015; Arena *et al.*, 2016a y b; Chabi-Jesus *et al.*, 2018). Se caracteriza por los síntomas localizados sobre las hojas, frutas, ramas y tallos; también provoca caída significativa de fruta prematura y hojas; lo que resulta en una reducción de la producción y vida útil de las plantas de cítricos (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010; NAPPO, 2015; Tassi *et al.*, 2017; Chabi-Jesus *et al.*, 2018). El virus puede causar la muerte de plantas jóvenes susceptibles infectadas con una alta concentración de virus (Bastianel *et al.*, 2010; Choudhary *et al.*, 2015). Los síntomas pueden variar de acuerdo con la especie hospedante y la etapa de desarrollo de la planta, ya que estos síntomas muestran un patrón común, pero extremadamente variable entre las especies y variedades de cítricos (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010).

En las hojas, las lesiones son a menudo superficiales, pero visibles en ambos lados. Las lesiones típicas son cloróticas o necróticas, variando en color de amarillo claro a marrón oscuro, y son con frecuencia circulares con un diámetro de 5 a 12 mm, localizados sólo en los sitios de alimentación del ácaro vector. A veces, es posible observar un punto central más oscuro en lesiones viejas; así como manchas anulares (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010).

En tallos jóvenes, los síntomas suelen aparecer como lesiones pequeñas, cloróticas, poco profundas que se vuelven marrones oscuras o rojizas. Las lesiones

más viejas pueden coalescer y en tallos viejos ser muy grandes (Bastianel *et al.*, 2006).

Es común observar hasta 30 lesiones por fruto, cubriendo una parte significativa de la cáscara. Estas lesiones frecuentemente son oscuras y deprimidas, aunque sólo afectan la parte externa del fruto. Estos síntomas, se asocian con frecuencia con una caída intensa de fruta que provoca pérdidas comerciales significativas (Bastianel *et al.*, 2006; NAPPO, 2015). En algunos casos, las lesiones pueden ser de color amarillo claro a verde claro, con apariencia plana. Las frutas sintomáticas tienden a cambiar de color tempranamente, se marchitan y llegan a ser más susceptibles a putrefacciones (Bastianel *et al.*, 2006).

Una comparación de los síntomas causados por CiLV-C y CiLV-N demuestra que las lesiones causadas por el tipo nuclear son generalmente más pequeñas cuando maduran, que las causadas por el tipo citoplasmático, con un pequeño centro necrótico y un halo clorótico, sin formar un patrón anular como es comúnmente observado en el tipo citoplasmático (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010). Las manchas en los anillos, generalmente asociadas con la leprosis causada por CiLV-C, no se observan en plantas infectadas con CiLV-N (Bastianel *et al.*, 2010).

En Brasil, cuando el inóculo está presente en una zona y no se aplican acaricidas, la enfermedad normalmente se propaga normalmente dentro del huerto y alcanza niveles perceptibles en campo de 2 a 3 años. Esto debido a que la incidencia y severidad de la enfermedad no son tan altas como las de otras enfermedades en

los cítricos; sin embargo, la leprosis es considerada una enfermedad poligénica, ya que la cantidad de tejido infectado, así como la del inóculo inicial, aumentan anualmente (Bastianel *et al.*, 2010).

### **3.1.3 Distribución geográfica**

En 1999, la leprosis se reportó en Venezuela, en el 2000 llegó a Panamá y Costa Rica. Actualmente, se ha confirmado la enfermedad en Guatemala, Bolivia, Colombia y Honduras; así como en la mayoría de los países que integran al OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria), como son México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá, con excepción de la República Dominicana (Bastianel *et al.*, 2006; Bastianel *et al.*, 2010; León *et al.*, 2014; NAPPO, 2015).

La distribución de la leprosis citoplasmática es mayor que la del tipo nuclear (Bastianel *et al.*, 2006; León *et al.*, 2014). En Brasil, en las plantaciones de cítricos, el tipo citoplasmático es más frecuente que el tipo nuclear (León *et al.*, 2014), ya que el tipo nuclear se ha encontrado en lugares con clima más frío (Bastianel *et al.*, 2006).

En México la leprosis se detectó en el año 2004 en huertos comerciales y de traspatio de naranja dulce en Chiapas. Para el 2016, la enfermedad se reportó en los estados citrícolas de Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz (Ramírez, 2016). Actualmente, la

leprosis ocurre en las principales regiones productoras de cítricos del país (SENASICA, 2017; González-García *et al.*, en prensa).

### **3.1.4 Métodos de diagnóstico de la leprosis**

El diagnóstico de la leprosis puede realizarse por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Rodrigues *et al.*, 2003; NAPPO, 2015), pruebas moleculares altamente específicas basadas en la RT-PCR (Locali *et al.*, 2003; NAPPO, 2015) o ensayos (inmunodiagnósticos) serológicos. Sin embargo, la RT-PCR y la serología son más útiles para el monitoreo a gran escala del CiLV-C (NAPPO, 2015). Igualmente, las herramientas moleculares más usadas para la detección de CiLV-C (Bastianel *et al.*, 2010) son el PCR de punto final y en tiempo real.

#### **3.1.4.1 Microscopia electrónica**

La microscopía electrónica de tejidos de lesiones con leprosis, a menudo revela un efecto citopático del tipo citoplásmico (partículas cortas, baciliformes en el retículo endoplásmico y viroplasmas densos en el citoplasma) o el tipo nuclear (similar a una barra) con partículas desnudas en el núcleo o citoplasma y viroplasma en el núcleo (Rodrigues *et al.*, 2003; NAPPO, 2015).

Las partículas virales se producen principalmente en las células del parénquima del área afectada por una lesión, las cuales son cortas, baciliformes, 120–130 nm de largo y 50–55 nm de ancho, provistas por una membrana dentro del lumen del retículo endoplásmico (Rodrigues *et al.*, 2003). Asimismo, en el citoplasma se encuentran partículas densas y vacuoladas, parecidas a viroplasmas, por lo regular,

con forma elíptica, de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Rodrigues *et al.*, 2003). El viroplasma y las partículas se encuentran en la misma célula, pero es frecuente encontrarse células con solo partículas o viroplasma (Rodrigues *et al.*, 2003). Este tipo de alteración celular asociada con la infección por CiLV, se conoce como el “tipo citoplásmico” y también se ha observado en otros casos de virus transmitidos por *Brevipalpus* (Rodrigues *et al.*, 2003).

#### **3.1.4.2 Anticuerpos**

Las pruebas serológicas se basan en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de tal manera que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática (Orozco-Santos *et al.*, 2014). La más empleada es ELISA (término en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Ramos-González *et al.*, 2011; Orozco-Santos *et al.*, 2014).

Para los tipos de ELISA en placa de uso más común están el sándwich de doble anticuerpo (DAS - double antibody sándwich), el sándwich de triple anticuerpo (TAS - Triple antibody sándwich) y de placa sensibilizada con antígeno (ACP - antigen coated plate) (González-Garza, 2017).

Para el caso de la leprosis de los cítricos, se desarrolló un anticuerpo para detectar a CiLV-C en tejidos sintomáticos infectados, utilizando el ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada en forma de sándwich y que utiliza un anticuerpo doble (DAS-ELISA), formatos de ELISA indirecta e inmunoensayo puntual (DBIA) (NAPPO, 2015).

### **3.1.4.3 Detección por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La PCR es un método para amplificar exponencialmente secuencias de ADN específicas mediante la síntesis *in vitro* del mismo (Henson y French, 1993), y es la más utilizada para la detección de patógenos (Orozco-Santos *et al.*, 2014).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad de la enzima ADN polimerasa para sintetizar fragmentos de ADN de interés del genoma del patógeno, lo cual conlleva a una desnaturalización térmica a altas temperaturas para separar las hebras del ADN; ocurre hibridación de los primers a su secuencia complementaria en sus dos hebras de ADN y cuya temperatura depende del tamaño y composición del primer; así como la extensión del primer para formar la cadena complementaria por la ADN polimerasa y una extensión final de 5 ó 10 min a una misma temperatura (Ramos-González *et al.*, 2011; Orozco-Santos *et al.*, 2014; González-Garza, 2017). En cada ciclo las nuevas hebras de ADN sirven de plantilla para los ciclos siguientes, repitiéndose los tres primeros pasos de 30 a 40 veces en un termociclador generando millones de nuevos fragmentos de ADN amplificadas, las cuales pueden ser visualizadas en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que revela el amplicon obtenido mediante la observación de bandas de diferentes tamaños (pesos moleculares) (Ramos-González *et al.*, 2011; Orozco-Santos *et al.*, 2014; González-Garza, 2017). Los cebadores o primers se derivan de secuencias de ADN amplificado o clonado (cADN) o ARN del microorganismo a detectar (Henson y French, 1993).

La sensibilidad, la velocidad y la versatilidad de la PCR son factores primarios en su amplia aceptación en la fitopatología (Henson y French, 1993; González-Garza, 2017), tanto en la investigación básica como en la aplicada (Henson y French, 1993). Se usa con una variada gama de materiales, incluidos ácidos nucleicos purificados, células o tejidos intactos, muestras ambientales complejas, entre otros (Henson y French, 1993).

Locali *et al.* (2003) realizaron la caracterización molecular de CiLV-C mediante la extracción de moléculas de dsRNA a partir de hojas de cítricos sintomáticos con leprosis demostrando así la naturaleza viral de tales moléculas. La secuenciación parcial del genoma CiLV-C, lo que permitió diseñar dos pares de cebadores para amplificar regiones del genoma putativo de CiLV con similitud para los genes que codifican la replicasa y la proteína de movimiento de otros virus fitopatógenos. Con ello, se desarrolló un método específico para la diagnosis de CiLV-C a través de la RT-PCR, el cual permite una rápida y eficiente detección del virus.

#### **3.1.4.4 PCR con transcripción inversa (RT-PCR)**

Hay virus con genoma ARN, de cadena simple o doble que requieren en la PCR de un paso previo, la retrotranscripción de la hebra de ARN, en ADN complementario (cADN), mediante la utilización de la enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa (Henson y French, 1993; Ramos-González *et al.*, 2011; Orozco-Santos *et al.*, 2014; González-Garza, 2017). Una vez transcrito en ADN complementario, se realiza la PCR convencional para su amplificación, a este proceso se le nombra RT-PCR (González-Garza, 2017).

### 3.1.4.5 Detección por PCR en tiempo real

La RT-PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) se ha convertido en una de las herramientas más utilizadas para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos (Faggioli *et al.*, 2017).

La qPCR combina los pasos de amplificación de ADN y la detección en un único ensayo, evitando el uso de geles de electroforesis, esto a través del monitoreo *in situ* de los productos generados a través del tiempo (González-Garza, 2017), es decir, se sigue paso a paso el curso de la reacción, en donde el equipo para la PCR en tiempo real realiza en cada ciclo una cuantificación de la fluorescencia que se genera (Ramos-González *et al.*, 2011).

Se pueden utilizar fluoróforos generales o no específicos, como es el SYBR Green I (reportero), el cual es el más usado, éste es una molécula cargada positivamente que cuando está en solución, no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une a un dsADN genérico, emite fluorescencia en proporción a la concentración de dsADN (Faggioli *et al.*, 2017; González-Garza, 2017).

Los fluoróforos específicos, como la sonda TaqMan, siguen el principio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o quencher), los cuales emiten fluorescencia de diferente longitud de onda, ya que cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero y cuando se separan, la fluorescencia del



reportero no puede ser absorbida por el apagador, por lo que puede ser detectada por el fotodetector (González-Garza, 2017).

De cada muestra procesada en PCR en tiempo real se genera un valor numérico Ct (siglas en inglés cycle threshold), el cual es el ciclo a partir de la fluorescencia emitida que sobrepasa el valor de corte y es inversamente proporcional a la concentración de la muestra. El valor de Ct es altamente reproducible debido a que está asociado a la fase exponencial de la síntesis del amplicón (Ramos-González *et al.*, 2011).

La cuantificación de fitopatógenos en plantas enfermas es deseable, especialmente con fitopatógenos que están presentes en plantas aparentemente sanas, en cuestión del grado de infección o infestación. Los cambios en los niveles de inóculo de patógenos también podrían monitorearse mediante PCR cuantitativa (Henson y French, 1993).

Actualmente, la PCR en tiempo real (qPCR) se ha aplicado en la investigación para la detección de viroides, evaluación de la resistencia de plantas, transmisión y determinación de genotipos (Faggioli *et al.*, 2017). Asimismo, Barragán-Valencia *et al.* (2008) mencionan que mediante la PCR en tiempo real se detectan virus y se evalúa la concentración viral, lo cual es un indicador del grado de infección de una enfermedad; así como para determinar si una infección está activa y para obtener información de la interacción huésped-virus.

### 3.2 Ácaro vector *Brevipalpus* spp.

El género *Brevipalpus* comprende más que 280 especies conocidas de ácaros planos o falsas arañas (Beard *et al.*, 2015; Chabi-Jesus *et al.*, 2018). En la transmisión de virus sólo cinco especies se han implicado, principalmente de la leprosis de los cítricos (Beard *et al.*, 2015; Chabi-Jesus *et al.*, 2018), por lo que estas especies de la familia Tenuipalpidae las más importantes. Por lo anterior, su importancia está asociada a su capacidad para transmitir virus, aunque también pueden causar lesiones directas en hojas y frutos, debido a la acción de las toxinas presentes en su saliva. Las especies *B. obovatus*, *B. californicus* y *B. phoenicis* son polípagos y de distribución cosmopolita, reportadas como vectores de CiLV (Bastianel *et al.*, 2006; NAPPO, 2015).

Las cepas de OFV-citrus que infectan a cítricos, pueden transmitirse por *B. californicus* (Banks) (García-Escamilla *et al.* 2017; Chabi-Jesus *et al.*, 2018) y la transmisión de CiLV-N se ha obtenido con ácaros virulíferos de *B. phoenicis sensu stricto* (Geijskes) (Ramos-González *et al.*, 2017; Chabi-Jesus *et al.*, 2018). *B. obovatus* Donnadieu fue considerado también vector del virus de la leprosis de los cítricos (Chabi-Jesus *et al.*, 2018). La transmisión de la leprosis tipo C involucra a *B. yothersi* (Baker) y *B. papayensis* (Baker) (Chabi-Jesus *et al.*, 2018). En México, *B. yothersi* y *B. californicus* se presentan en las huertas de cítricos y en árboles infectados por CiLV-C (González-García *et al.*, en prensa). En Colombia, la transmisión de CiLV-C y CiLV-C2 es realizada por *B. yothersi* (León *et al.*, 2017; Chabi-Jesus *et al.*, 2018).

Las especies de *Brevipalpus* son haploides y las hembras poseen dos cromosomas (Pijnacker *et al.*, 1980; Bastianel *et al.*, 2006). Se reproducen por partenogénesis tipo telitoquia, ya que las hembras no fertilizadas producen hembras que son genéticamente similares (Helle *et al.*, 1980; Bastianel *et al.*, 2006); es decir poblaciones clonales en campo (Bastianel *et al.*, 2006). Las poblaciones de adultos son esencialmente hembras debido a la presencia de la bacteria endosimbionte *Cardinium* sp. y rara vez se producen machos (Groot y Breeuwer, 2006; Arena *et al.*, 2016a) y cuando se presentan, son incapaces de reproducirse. La presencia de bacterias endosimbiontes afecta la formación de la glándula androgénica del ácaro, bloqueando la producción de la hormona durante las primeras etapas del desarrollo del individuo, dando un número muy bajo de machos y, comúnmente menos del 1% de estos se encuentra en la población (Bastianel *et al.*, 2006).

Los ácaros del género *Brevipalpus* ocurren casi en cualquier área productora de cítricos, pero sólo cuando el virus está presente en el sistema se consideran plagas importantes para el cultivo (Bastianel *et al.*, 2006).

### **3.2.1 Hospederos**

Las especies de *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) son polífagas y cosmopolitas debido a que poseen gran número de plantas hospederas (León *et al.*, 2014). Al menos 40 especies de plantas que van desde cultivos principales como los cítricos y el café, hasta plantas de importancia económica como las orquídeas y maracuyá; así como plantas ornamentales (Bastianel *et al.*, 2010; Arena *et al.*, 2016 a y b).

Algunas plantas se han identificado como reservorios potenciales de *B. phoenicis sensu lato* en huertos de cítricos en Brasil. Incluyen barreras rompevientos como *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth, *Malvaviscus arboreus* Cavanillas y malezas como *Bidens pilosa* L. Asimismo, se reportan 928 especies, pertenecientes a 513 géneros y 139 familias como plantas hospedantes de una o más especies de *Brevipalpus* (Bastianel *et al.*, 2006; NAPPO, 2015). *Brevipalpus phoenicis sensu lato* se ha encontrado colonizando a 486 especies de plantas de 118 géneros y 64 familias (Bastianel *et al.*, 2006; León *et al.*, 2014; NAPPO, 2015).

### **3.3 Mecanismos de transmisión**

Un aspecto importante de las interacciones hospedante-patógeno es el conocimiento de sus mecanismos de transmisión, para lo cual los fitopatógenos desarrollan diferentes estrategias, entre ellas, la penetración a través de heridas sobre las capas superficiales de la planta (inoculación por daño mecánico) o mediante vectores (García, 2018).

La mayoría de los virus fitopatógenos dependen de la transmisión eficiente de un vector, para lo cual los insectos destacan (García, 2018). Los insectos del orden Hemiptera transmiten la mayoría de virus con un 55%, destacando los áfidos (Aphididae), mosquitas blancas (Aleyrodidae), chicharritas (Cicadellidae), saltahojas (Delphacidae), entre otros (Hogenhout *et al.*, 2008; García, 2018). Los trips del orden Thysanoptera; ácaros del orden Trombidiformes, de las familias Eriophyidae y Tenuipalpidae; así como algunos nematodos de los géneros

*Xiphinema*, *Longidorus* y *Trichodorus*; también son transmisores de virus (Hogenhout *et al.*, 2008; García, 2018).

Se han descrito tres mecanismos de transmisión: no persistente, persistente y semipersistente, dependiendo de las interacciones bioquímicas para la compatibilidad virus-vector, ya que hay características que determinan el tiempo necesario para la adquisición de un virus, el tiempo de retención de virus por el vector y el tiempo requerido para la inoculación a una planta sana (Hogenhout *et al.*, 2008; García, 2018). Para el caso de las especies de *Brevipalpus* que transmiten los virus de la leprosis pertenecientes al género *Cilevirus*, se señala que su transmisión es de manera persistente circulativa (Freitas-Astúa *et al.*, 2018).

Varios patosistemas han sido estudiados ampliamente; sin embargo, en otros se requiere comprender más las interacciones planta-virus-vector, como el caso de la enfermedad de la leprosis (Nicolini-Teixeira, 2008). En naranja dulce, como en hospedantes alternos y plantas indicadoras se han llevado a cabo varios trabajos de transmisión del virus CiLV-C, ya sea mediante la inoculación mecánica, por injerto y a través del ácaro vector.

Knorr (1968) demostró que la leprosis es transmitida a través de la inserción de brotes sintomáticos por injerto de punta a plantas sanas y por ácaros *Brevipalpus* spp. Por otro lado, Chagas y Rossetti (1984) confirmaron la transmisión de la leprosis por injerto en plantas de naranja dulce.

Por su parte, Chiavegato y Salibe (1984), a través de la transferencia de individuos de *B. phoenicis sensu lato* infectados, colectados en huertas con presencia de leprosis, lograron reproducir síntomas de la leprosis en plantas sanas jóvenes de naranja Valencia. Algo similar lograron, Rodrigues *et al.* (2000), reportaron la transmisión experimental de la leprosis de los cítricos (CiLV-C) de mandarina Cleopatra a plantas sanas de mandarina Cleopatra y de naranja dulce a mandarina injertada en lima Rangpur mediante ácaros virulíferos de *B. phoenicis sensu lato* colectados en campo.

Colariccio *et al.* (1995) mediante la inoculación mecánica, obtuvieron síntomas de leprosis en naranja dulce y en plantas herbáceas indicadoras (*Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn., *C. quinoa* Willd., y *Gomphrena globosa* L.).

Garita *et al.* (2013) evaluaron el uso del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) como planta indicadora para estudios de transmisión por *B. phoenicis sensu lato*. Posteriormente, se demostró que CiLV-C tiene un amplio rango de hospedantes experimentales, tras inocular un gran número de especies de plantas con *B. phoenicis sensu lato* virulíferos, donde 40 especies de 18 familias resultaron positivas (Garita *et al.*, 2014).

En experimentos realizados se ha demostrado la transmisión por ácaros virulíferos a *Solanum violaefolium*, *Phaseolus vulgaris* y a otras especies que se utilizan como setos y rompevientos en huertos de cítricos (Bastianel *et al.*, 2010).

Asimismo, se han reportado dos casos de infección natural de plantas no cítricas *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merrill, utilizada como seto en Colombia (Bastianel *et al.*, 2010; Garita *et al.*, 2013; Tassi *et al.*, 2017) y *Commelina benghalensis* L., que es una maleza presente en los huertos de cítricos en Brasil, con posibles implicaciones en la epidemiología de esta enfermedad (Garita *et al.*, 2013; Tassi *et al.*, 2017).

Arena *et al.* (2016 a y b) evaluaron a *Arabidopsis thaliana* como planta modelo para ser utilizada en los estudios de las interacciones planta-patógeno de los virus transmitidos por *Brevipalpus* spp., así como, como hospedante experimental de CiLV-C.

Experimentalmente se ha demostrado que *B. yothersi* transmite la leprosis de manera eficiente a un gran número de especies vegetales (Tassi *et al.*, 2017). León (2013), determinó un tiempo mínimo de 30 min para la adquisición de CiLV y de 10 min para la transmisión del mismo, en función del tiempo de aparición de síntomas en plantas de naranja dulce.

Tassi *et al.* (2017), por su parte determinaron que el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. 'IAC Una' resultó ser una planta indicadora útil para pruebas de transmisión de CiLV-C.

Aunque, actualmente se tienen avances importantes sobre la relación virus-vector y se ha incrementado el desarrollo de herramientas moleculares para la detección

de CiLV-C (Bastianel *et al.*, 2010), existen interrogantes en la interacción leprosis-vector-hospedante que requieren investigarse para comprender la epidemiología de la enfermedad (Tassi *et al.*, 2017).



## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Localización de experimentos**

La investigación se desarrolló en el laboratorio e invernadero del Área de Acarología del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, de mayo de 2017 a septiembre de 2018.

### **4.2 Material vegetal**

#### **4.2.1 Con síntomas de CiLV-C**

De una huerta comercial (17° 58' 13.4" N y 93° 24' 40.1" O sobre 24 msnm) de naranja dulce con presencia de leprosis del municipio de Cárdenas, Tabasco, se seleccionaron hojas con síntomas (lesiones cloróticas con un diámetro aproximado de 2 a 4 cm), sobre la nervadura central de la hoja. Las hojas se guardaron en bolsas de polipapel, mismas que se colocaron dentro de una hielera y se trasladaron a las instalaciones del laboratorio de Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo; en donde se almacenaron en un cuarto frío con temperatura de 6°C, hasta ser utilizadas. Las hojas seleccionadas, se lavaron con agua corriente y enjuagaron con agua destilada, algunas de éstas fueron utilizadas para confirmar la presencia de CiLV-C mediante la extracción de ARN y la RT-PCR (como se indica en el punto 4.2.3). Las hojas restantes, se revisaron bajo microscopio estereoscópico para descartar la presencia de ácaros o insectos, y que posteriormente se utilizaron para elaborar arenas experimentales.

#### **4.2.2 Sin síntomas de CiLV-C**

También se colectaron hojas de árboles de naranja dulce de traspatio sin síntomas de leprosis, de las localidades de San Luis Huexotla y San Diego, municipio de Texcoco, Estado de México. Este material se procesó y uso de la misma forma a lo descrito en el punto anterior (4.2.1), con la diferencia que la extracción de ARN y la RT-PCR se realizó para descartar la presencia de CiLV-C.

#### **4.2.3 Diagnóstico para material vegetal mediante RT-PCR**

Fragmentos de material vegetal (100 mg) se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se dejaron enfriar en nitrógeno líquido durante 15 min. Posteriormente, el tejido se trituró dentro del tubo Eppendorf con un micropistilo. La extracción de ARN del tejido molido se realizó con el kit RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. La obtención del cADN complementario se realizó con el kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Cada reacción de transcripción reversa se realizó en un volumen final de 20 µL, el cual contenía 4 µL de buffer de reacción 5X, 1 mM de cada dNTP, 5 µM de hexámeros aleatorios, 1 µL de la enzima RevertAid M-MuLV RT (200 U/µL) y 10 µL de agua libre de nucleasas, todo incluido en el kit del fabricante, adicionando 2 µL de ARN (aprox. 80 ng) de cada muestra al final. Asimismo, los tubos se incubaron a 25 °C durante 5 min, luego por 60 min a 42 °C, seguido por un paso final de 5 min a 70 °C en un termociclador MyCycler™ (BIORAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).

La presencia del virus de la leprosis (CiLV-C) se confirmó mediante PCR convencional usando el cADN obtenido. Se utilizaron los oligonucleótidos desarrollados por Locali *et al.*, (2003) (MPF: TAT TGG CGT TGG ATT TCT GAC y MPR: TGT ATA CCA AGC CGC CTG TGA ACT). La reacción de PCR se realizó en un volumen de reacción de 25  $\mu\text{L}$ , el cual contenía de 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer de PCR 10X (Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 8.7), 0.18  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0.2 mM de dNTPs, 0.2  $\mu\text{L}$  de Taq ADN polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ ) (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) y 3  $\mu\text{L}$  de cADN. Las amplificaciones por PCR se realizaron con un termociclador MyCycler™ (BIORAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), usando las siguientes condiciones: un ciclo de 5 min a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 57 °C, 60 s a 72 °C y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 % en buffer TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) y fotografiados con un fotodocumentador. El tamaño esperado de las bandas para CiLV-C fue de 339 pb. Aún, cuando las bandas que se observaron en los geles tenían los tamaños respectivos que el positivo del virus que se incluyó en cada corrida, los productos de PCR se enviaron a Macrogen Inc. (Geumchen-gu, Seoul, Korea del Sur) para su secuenciación directa para confirmar la identidad de los fragmentos amplificados.

#### **4.2.4 Obtención y mantenimiento de las plantas de las diferentes especies de cítricos**

Las especies de cítricos utilizadas para las pruebas de transmisión fueron naranja valencia (variedad Campbell + portainjerto naranja agrio), limón persa (variedad

limón persa + portainjerto C-35), mandarina (portainjerto Volkameriana) y toronja (variedad toronja blanca + portainjerto Volkameriana), las cuales fueron adquiridas en el vivero certificado Cazonas, ubicado en Cazonas, Ver., y fueron mantenidas en confinamiento para garantizar que estuvieran libres de CiLV-C (condiciones de invernadero). El riego se realizó cada tres días con agua del grifo, con alrededor de 600 – 700 mL por planta. La fertilización se realizó en tres ocasiones, en las que se aplicó el fertilizante YaraMila Complex (12 – 11 - 18), 2 g/L por planta y regulando el pH de la mezcla.

### **4.3 Ácaro vector *Brevipalpus yothersi***

#### **4.3.1 Establecimiento de la colonia**

La colonia de ácaros se estableció, utilizando frutos de naranja dulce y/o agria con textura de regular a fina, de color verdoso a verde amarillento de árboles sin leprosis o lesiones de la enfermedad. Estos frutos antes de ser usados, se lavaron con agua y jabón en polvo utilizando una esponja suave, dejándose secar al aire libre. Una vez limpios y secos, se sumergieron en parafina líquida hasta la mitad, dejando que ésta se solidificará. En el área sin parafina, se colocó una capa delgada de una mezcla de harina, yeso y arena con igual proporción, de acuerdo a la metodología descrita por Salinas-Vargas *et al.* (2016), con ligeras modificaciones. En esta área con la mezcla, mediante un pincel de cerdas finas, se colocaron hembras adultas y ninfas de *B. yothersi* de una cría ya establecida en el laboratorio de Acarología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, la cual no había estado expuesta al virus de la leprosis de los cítricos.

Los frutos con los ácaros se colocaron de manera individual, en charolas de plástico con una base de unicel, las cuales se mantuvieron a temperatura promedio de  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de  $60 \pm 10\%$  (Figura 1). Los frutos se cambiaron conforme se observaban deshidratados, transfiriendo los ácaros a nuevos frutos, con lo cual se garantizó el desarrollo de la cría y la cantidad requerida de hembras adultas para realizar los experimentos de adquisición y transmisión.



Figura 1. Cría de *Brevipalpus yothersi* en frutos de naranja.

#### 4.3.2 Diagnóstico de CiLV-C en *B. yothersi* mediante ensayos de RT-PCR

Para la detección del virus de la leprosis (CiLV-C) en el ácaro vector, se extrajo el ARN de tres individuos mediante el kit de extracción Quick-RNA™ Tissue/Insect Microprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN complementario (cADN) se obtuvo mediante una reacción de transcriptasa inversa con el kit Sensiscript® (QIAGEN®, Hilden, Germany). Las reacciones de reversa transcriptasa se realizaron en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ , que contenía 2  $\mu\text{L}$  de buffer RT 10X buffer, 0.5 mM de cada dNTP, 10 unidades de un

inhibidor de RNAsas, 1  $\mu$ L de transcriptasa reversa y 7  $\mu$ L de agua libre de RNAsas. Adicionalmente, se agregó 1  $\mu$ M de Oligo (dT) 18 primer (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) y 5  $\mu$ L de ARN (0.5-1.3 ng/ $\mu$ L). Finalmente, los tubos se incubaron durante 60 min a 37 °C en un termociclador MyCycler™ (BIORAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). La presencia del virus de la leprosis (CiLV-C) se confirmó mediante PCR convencional usando el cADN obtenido. Asimismo, se utilizaron los mismos oligonucleótidos y métodos para la obtención de los productos de PCR, tal y como se describió en el apartado 4.2.3.

#### **4.4 Cuantificación de la carga de inóculo del virus mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR)**

La concentración del virus se determinó en las muestras de cADN obtenidas mediante RT-PCR, tanto de ácaros como de material vegetal con y sin síntomas, utilizados en los experimentos de adquisición y transmisión.

##### **4.4.1 Establecimiento de la curva estándar**

La curva estándar para el ensayo de la qRT-PCR, se generó a través de la síntesis *in vitro* de los transcriptores de ARN de CiLV-C de la región del gen MP, los cuales se ajustaron a  $10^{10}$  copias por  $\mu$ L. Se prepararon seis diluciones seriales de 10, desde  $10^9$  a  $10^3$  copias del ARN traducido *in vitro*, preparados con agua libre de nucleasas (Choudhary *et al.*, 2015).

En la qRT-PCR para cada concentración y muestra, se colocaron dos réplicas técnicas, a lo cual cada reacción incluyó: 7.5  $\mu$ L de 2x Quantifast qPCR Master Mix con SYBR Green I (PROMEGA, Madison, WI, USA), 0.24  $\mu$ L de primer A, 0.24  $\mu$ L de primer B, 4.02  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y 3  $\mu$ L de cADN, obteniendo un volumen final de 15  $\mu$ L. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 95 °C durante 5 min, 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s y 72 °C por 30 s por 40 ciclos. Se utilizó equipo de PCR en tiempo real CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler (BIORAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) (Chen *et al.*, 2016). El valor Ct, la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV) se calcularon respectivamente mediante el paquete estadístico GenStat (Payne *et al.*, 2007).

El software Bio-Rad CFX Manager™ (2013 Bio-Rad Laboratories, Inc. Versión 3.1) trazo la intensidad de la fluorescencia contra el número de ciclos, proporcionando el valor del umbral del ciclo ( $C_t$ ) de manera automática.

#### **4.4.2 Comparación de sensibilidad**

Las diluciones de la curva estándar y las muestras de los experimentos de adquisición y transmisión se procesaron por PCR convencional y qPCR, respectivamente, para comparar sus sensibilidades (Chen *et al.*, 2016).

#### **4.5 Relación del periodo de adquisición y la carga de inóculo de CiLV-C**

En este experimento, se analizó la relación que se da entre el periodo de adquisición (eficiencia) y la cantidad del virus (carga de inóculo) en hembras adultas de *B. yothersi* sometidas a diferentes periodos de alimentación sobre material vegetal (hojas) con síntomas de la leprosis tipo citoplasmático.

Para realizar las pruebas de adquisición se utilizó el método descrito por García-Méndez (2016), con ligeras modificaciones. De la cría existente, se colectaron hembras adultas de *B. yothersi* con una edad aproximada de 10 días con una coloración de naranja a rojo brillante (en grupos de 100), las cuales se pusieron en pequeñas cajas Petri ( $\varnothing$  4.0 cm) para someterlas a un ayuno de 4 h. Transcurrido el tiempo y con la ayuda de un pincel de pelo de camello, los ácaros se transfirieron en el envés de un disco de hoja de naranja (con y sin síntomas de CiLV-C) expuesto, colocado previamente dentro de una caja Petri ( $\varnothing$  4.0 cm) que contenía una base de 3 mm de agua-agar (ReasoI<sup>®</sup>) diluido a 2.0 %; la caja se cubrió con malla fina para mantenerla ventilada (Figura 2). Tanto en discos sanos (testigo) como enfermos (tratamientos), los ácaros se confinaron en un área aproximada de 2.5 cm, colocando una línea delgada de resina sintética (Insect Glue Tree, Agralan Ltd, Ashton Keynes, Wiltshire, UK), para el caso de los discos con leprosis el área abarcó la lesión. Después de la introducción de los ácaros, las cajas se mantuvieron en condiciones controladas y dispusieron en un diseño de bloques al azar. En total se evaluaron cinco periodos de adquisición (1, 12, 24, 36 y 48 horas) y se hicieron cinco repeticiones (50 individuos por repetición), además se incluyó un testigo donde a 50 individuos se les dio un periodo de 48 h.



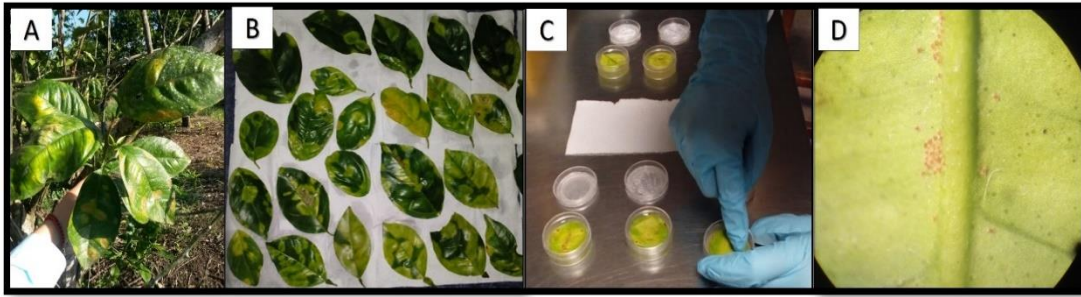


Figura 2. Arenas experimentales para las pruebas de adquisición de CiLV-C por hembras adultas *B. yothersi*.

Al término de cada tiempo de adquisición, se tomaron 10 individuos de cada una de las repeticiones de los diferentes tratamientos, y se colocaron en tubos para PCR de 0.2 mL, los cuales se almacenaron a -20 °C, con el objeto de cuantificar posteriormente la carga de inóculo de CiLV-C mediante PCR en tiempo real. Asimismo, el material vegetal que se usó para alimentar a los ácaros en los diferentes tratamientos y el testigo se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 µL con 20 µL de RNA later® (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA USA) y almacenaron a -20 °C, para la medición del título viral de CiLV-C a través de qPCR.

#### 4.5.1. Análisis de datos

El experimento se realizó bajo un diseño de bloques al azar, donde cada arena con material vegetal (hojas) con o sin síntomas de leprosis se constituyó como unidad experimental. Los datos se analizaron por ANOVA, donde la variable determinada fue la cantidad de copias del virus que se estimó mediante qPCR, los tratamientos fueron los tiempos de adquisición y a las repeticiones se les consideró como bloques. Para el análisis, los datos primero se transformaron a log10 para obtener

una distribución normal de los mismo; así como se utilizó el paquete estadístico GenStat (Payne *et al.*, 2007).

#### **4.6 Capacidad de transmisión de CiLV-C por hembras de *B. yothersi* y su establecimiento en diferentes especies de cítricos**

El experimento se inició de la misma manera que el experimento del punto anterior (4.5), pero considerando un sólo tiempo de adquisición de 24 h. Asimismo, en las arenas experimentales con hojas con presencia de CiLV-C, se colocaron alrededor de 300 hembras adultas por arena (de 10 días de edad aproximadamente) para que adquirieran el virus.

De cada arena experimental se tomaron cinco hembras al azar, que se colocaron en tubos para PCR de 0.2 mL y se almacenaron a -20 °C, para realizar la extracción de ARN y confirmar la adquisición del virus a través de la RT-PCR. Las hembras restantes fueron transferidas a los diferentes tratamientos (especies de cítricos: naranja, toronja, mandarina y limón persa) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos para determinar la capacidad de transmisión de CiLV-C por hembras de *B. yothersi*.

<b>Tratamientos</b>	<b>Descripción</b>	<b>No. de repeticiones por especie de cítrico</b>	<b>No. de individuos por repetición</b>
T1 (naranja)	Ácaros con virus	9	10
T2 (mandarina)	Ácaros con virus	9	10
T3 (toronja)	Ácaros con virus	9	10
T4 (limón persa)	Ácaros con virus	9	10
Testigo (naranja, mandarina, toronja y limón persa)	Sin ácaros	9	0

En cada planta/especie de un año de edad, se seleccionaron tres hojas (repeticiones), las cuales se lavaron con agua destilada, se secaron y marcaron por el haz, con un marcador de tinta permanente, indicando el número de hoja y bloque. Enseguida, el envés de cada hoja, fue cubierto con una mezcla compuesta de harina, yeso y arena de igual proporción, a lo largo de la vena central, para crear un refugio para los ácaros. También se colocó una línea delgada de resina sintética (Agralan Ltd, Ashton Keynes. Wiltshire, UK) en la periferia de la hoja, para confinar a los ácaros. Esta acción se realizó en todos los tratamientos y el testigo.

Antes de transferir los ácaros a las hojas marcadas, de todos los tratamientos y el testigo, de cada planta se tomó una hoja de referencia, la inmediata superior o inferior a las hojas marcadas, con la finalidad de confirmar la presencia o ausencia de CiLV-C mediante la RT-PCR. Para ello, las hojas se lavaron con agua de grifo, se enjuagaron con agua destilada y se fotografiaron para tenerlas como referente.

Posteriormente, con un sacabocados ( $\varnothing$  1.0 cm) se tomaron de ocho a 10 muestras de las mismas que se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5  $\mu$ L y se almacenaron a -20 °C para la posterior extracción de ARN.

En cada hoja marcada de cada uno de los tratamientos se transfirieron 10 ácaros mediante un pincel de cerdas finas. Cabe señalar, que se hizo una reinfestación de ácaros a los tres días posteriores a la primera infestación, siguiendo el procedimiento mencionado con anterioridad, colocando cinco individuos en las hojas marcadas, para todos los tratamientos, excepto el testigo. Esto con la finalidad de asegurar el establecimiento de *B. yothersi* en las hojas de las diferentes especies de cítricos y, por ende, la transmisión del virus.

Los ácaros se mantuvieron en las plantas por un periodo de 60 días posteriores a la infestación. Se realizaron revisiones cada 15 días para monitorear el establecimiento y desarrollo poblacional de los ácaros (presencia de adultos, inmaduros y huevos) y la posible aparición de síntomas de la enfermedad. Se tomaron fotografías de todas las hojas infestadas de los respectivos tratamientos; así como del testigo. Transcurrido este periodo, todas las hojas marcadas en todos los tratamientos y los testigos fueron desprendidas de las plantas y revisadas para verificar la presencia y ausencia de síntomas. Asimismo, se contó el número total de individuos (adultos e inmaduros) y huevos, los cuales, a excepción de los huevos, se retiraron de las hojas y colocaron por separado en tubos para PCR de 0.2 mL debidamente etiquetados y se almacenaron a -20 °C, para corroborar posteriormente la presencia o ausencia de CiLV-C mediante PCR.

Tanto las hojas marcadas, como las de referencia final, se lavaron con agua de grifo, se enjuagaron con agua destilada y se fotografiaron. Asimismo, mediante un sacabocados ( $\varnothing$  1.0 cm) se tomaron de ocho a 10 muestras de las mismas, se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5  $\mu$ L y se almacenaron a -20 °C, para la posterior detección y cuantificación del virus mediante qPCR.



Figura 3. Pruebas de transmisión de CiLV-C por *B. yothersi* en cuatro especies de cítricos en condiciones de invernadero.

#### 4.6.1 Análisis de datos

El diseño experimental fue en bloques completos al azar, con un total de tres bloques, en donde cada bloque estuvo conformado por dos plantas de naranja, toronja, mandarina y limón persa (Figura 3).

Los datos se analizaron mediante regresión logística con una estructura factorial jerárquica. Sólo se determinó la presencia o ausencia de CiLV-C mediante PCR en tiempo real de las hojas de las plantas en donde fueron colocadas las hembras de *B. yothersi*, por lo que cada hoja representó una repetición. Primero se comparó entre categorías (naranja-mandarina vs toronja-limón persa), posteriormente entre limón persa vs toronja y mandarina vs naranja. El paquete estadístico utilizado fue GenStat (Payne *et al.*, 2007).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Relación del periodo de adquisición y la carga de inóculo de CiLV-C

Los resultados indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (tiempo de adquisición) y la concentración de CiLV-C ( $F_{4,20}=0.58$ ,  $P=0.0679$ ). El promedio de copias por grupo de ácaros (tres individuos) fue de 138000, 25666, 502216, 23133 y 210000 para los tratamientos de 1, 12, 24, 36 y 48 h de los tiempos de adquisición respectivamente. Sin embargo, en el tratamiento de 24 h, se observó la mayor concentración de CiLV-C ( $502216 \mu\text{L}^{-1}$ ) (Figura 4).

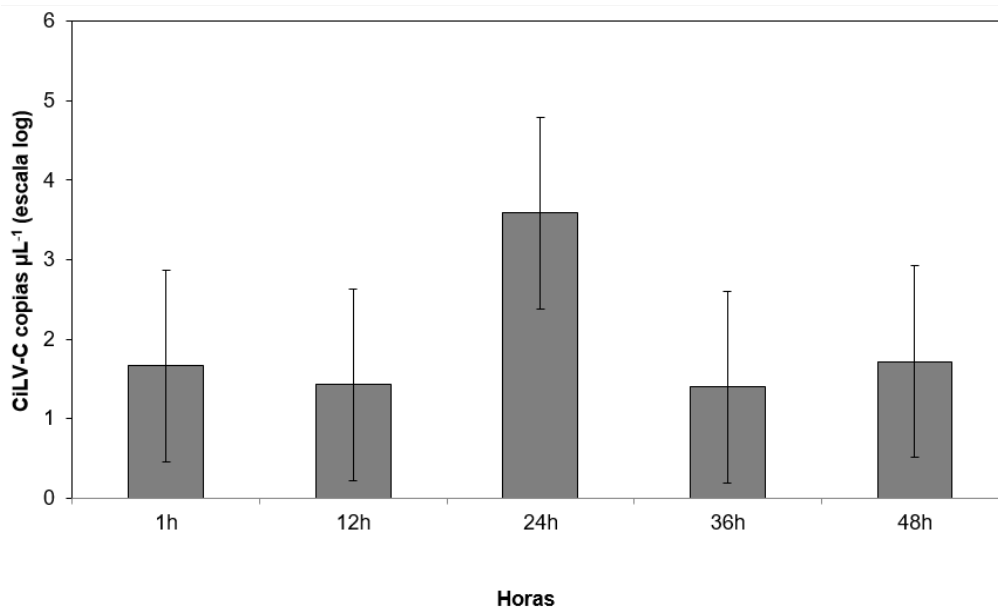


Figura 4. Concentración de CiLV-C en hembras de *B. yothersi* expuestas a diferentes periodos de adquisición.

## 5.2 Capacidad de transmisión de CiLV-C por hembras de *B. yothersi* y su establecimiento en diferentes especies de cítricos

Los resultados de la presencia de CiLV-C entre los diferentes tratamientos (especies de cítricos) mostraron que la transmisión del virus se dio en todos éstos, pero ésta fue mayor en las especies de cítricos dulces como naranja-mandarina, en comparación con toronja-limón persa ( $X^2_1= 16.33$ ,  $P<0.001$ ). No se observaron diferencias en el número de hojas con CiLV-C entre naranja y mandarina ( $X^2_1= 1.5771$ ,  $P<0.209$ ). Asimismo, el número de hojas infectadas entre toronja y limón persa fue similar ( $X^2_1= 1.1891$ ,  $P<0.0.276$ ) (Figura 5).

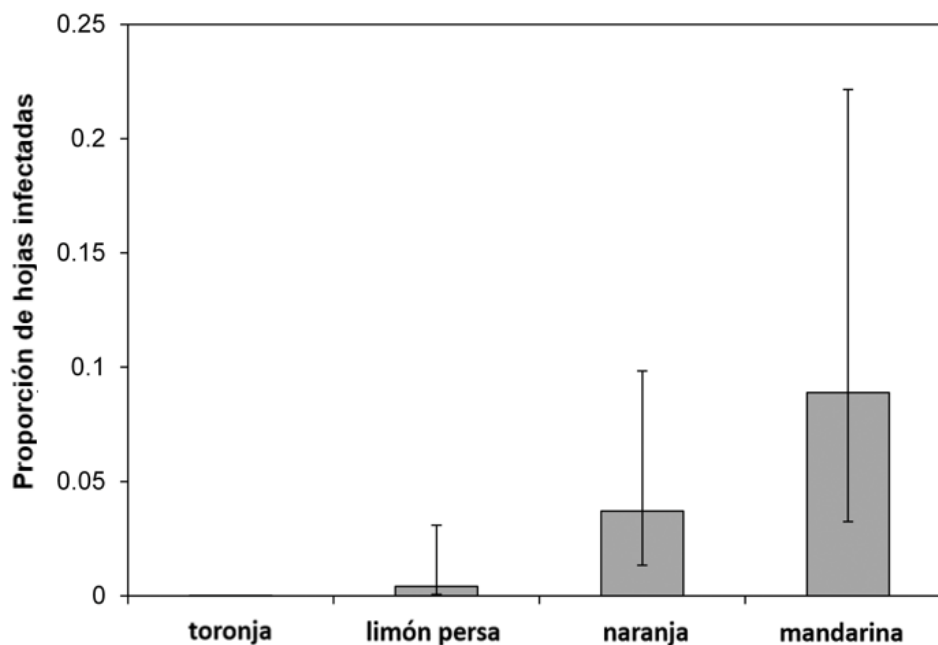


Figura 5. Proporción de hojas infectadas con CiLV-C en diferentes especies de cítricos en las pruebas de transmisión con *B. yothersi*.

Con respecto al establecimiento y desarrollo del ácaro vector de CiLV-C que fue colocado en los diferentes tratamientos (especies de cítricos), se observó que en todos éstos se estableció (formación de colonias). Por lo que, al comparar el número

de huevos entre naranja-mandarina y toronja-limón persa, hubo diferencias significativas entre ambos grupos ( $F_{1,24}= 9.40$ ,  $P= 0.005$ ). El promedio de huevos más alto se observó en mandarina con 17.33/hoja y el más bajo fue de 4.83/hoja en toronja. No se encontraron diferencias significativas al comparar el número de huevos depositados entre naranja y mandarina ( $F_{1,24}= 1.05$ ,  $P= 0.316$ ) y entre toronja y limón persa ( $F_{1,24}= 0.26$ ,  $P= 0.613$ ). La mayor cantidad de huevos se registró en naranja y mandarina (Figura 6).

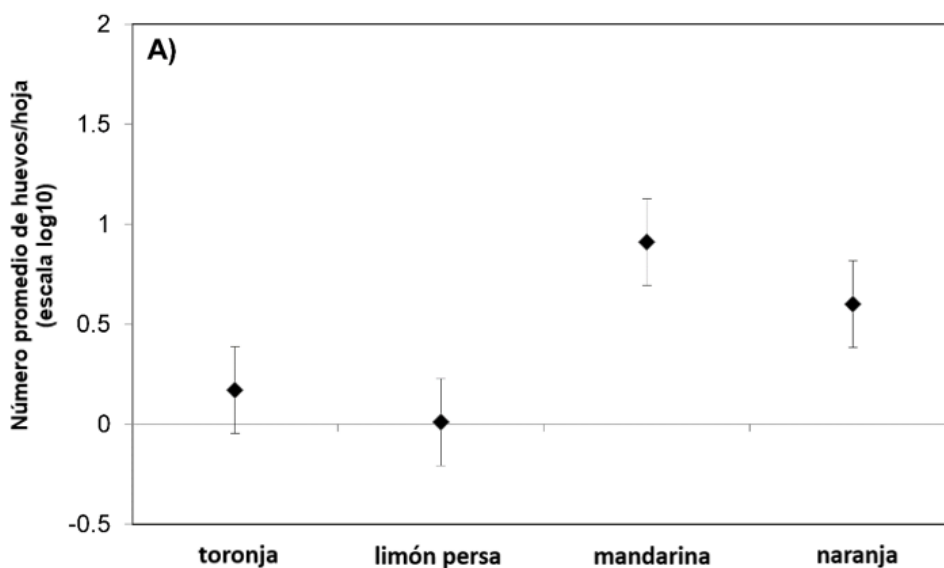


Figura 6. Número de huevos de *B. yothersi* que se desarrollaron durante 60 días en hojas de diferentes especies de cítricos.

Cuando se comparó el número de estados inmaduros (larvas, protoninfas y deutoninfas) entre naranja-mandarina y toronja-limón persa, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ( $F_{1,24}= 13.34$ ,  $P= 0.001$ ). El promedio más alto de inmaduros, se dio en mandarina con 17.11/hoja y el más bajo en toronja, con 1.33/hoja. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre



naranja y mandarina ( $F_{1,24}= 3.91$ ,  $P= 0.059$ ) y entre toronja y limón persa ( $F_{1,24}= 0.03$ ,  $P= 0.854$ ). La mayor cantidad de estados inmaduros se presentó en naranja y mandarina (Figura 7).

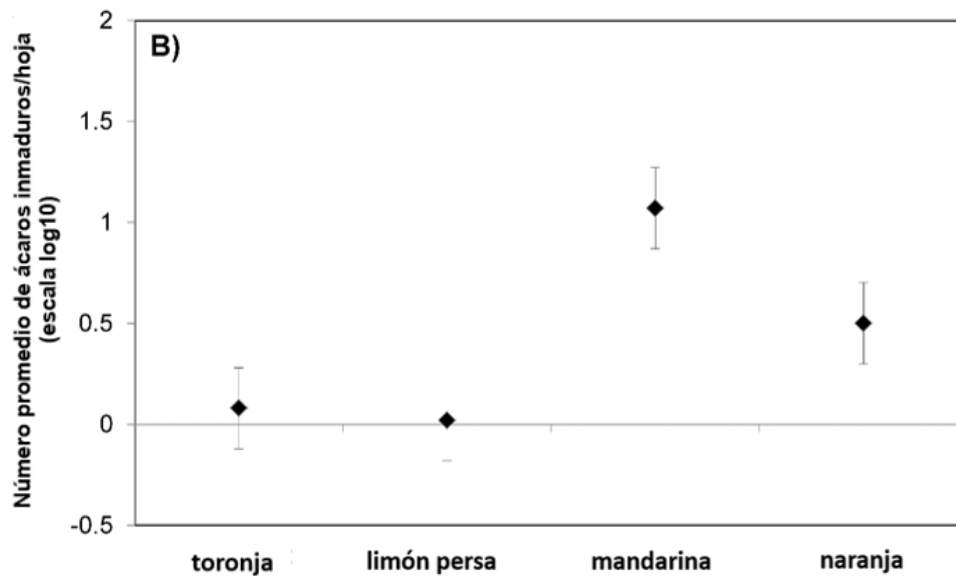


Figura 7. Número de inmaduros de *B. yothersi* que se desarrollaron durante 60 días en hojas de diferentes especies de cítricos.

Finalmente, al contrastar el número de hembras adultas entre naranja-mandarina y toronja-limón persa, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ( $F_{1,24}= 21.91$ ,  $P<0.001$ ). El promedio más alto de hembras adultas, se dio en mandarina con 13.67/hoja y el más bajo en toronja, con 2.06/hoja. Mientras que, al comprar el número de hembras adultas entre naranja y mandarina ( $F_{1,24}= 1.17$ ,  $P= 0.290$ ) y entre toronja y limón persa ( $F_{1,24}= 0.19$ ,  $P= 0.668$ ), no se encontraron diferencias significativas. La mayor cantidad de hembras adultas se obtuvo en naranja y mandarina (Figura 8).

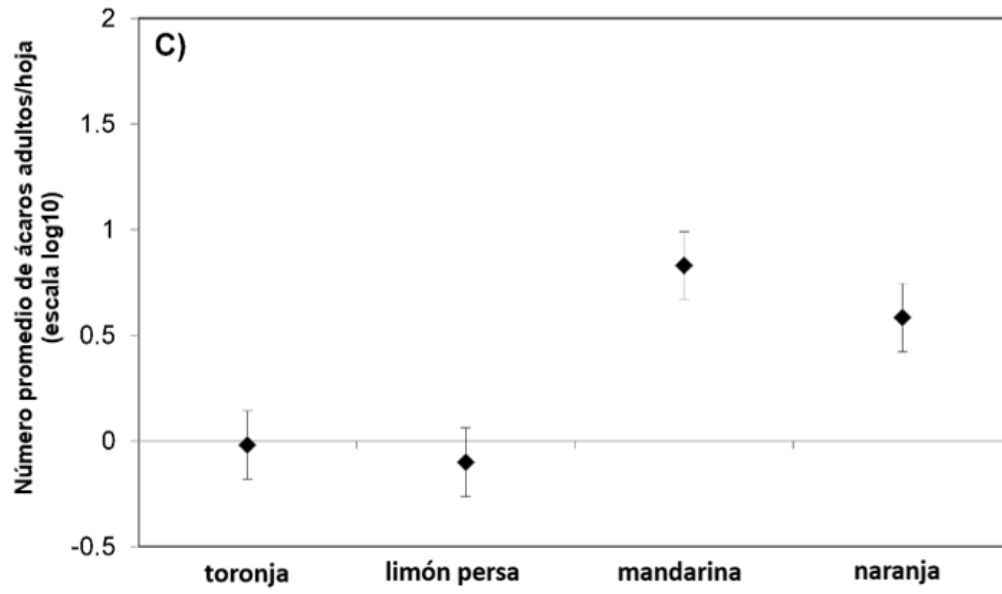


Figura 8. Número de hembras adultas de *B. yothersi* que se desarrollaron durante 60 días en hojas de diferentes especies de cítricos.

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados indican que no hubo diferencias significativas entre los diferentes tiempos de adquisición (tratamientos) y la concentración de CiLV-C; aun cuando, en el tratamiento de 24 h, se observó la mayor concentración del virus. Lo anterior coincide con lo citado por Nicolini-Teixeira (2008); Bastianel *et al.* (2010); León (2013); Garita *et al.* (2014); Tassi *et al.* (2017); Freitas-Astúa *et al.* (2018) quienes reportan que el virus es transmitido de manera persistente circulativo por *B. yothersi*; es decir, que el virus no se replica en éste; por lo que no hay un aumento en la cantidad de partículas virales a través del tiempo, aunado a que los ácaros posiblemente no se alimenten de manera constante en todo el tiempo en que fueron expuestos a hojas infectadas con el virus, a lo cual, García-Escamilla *et al.* (2017) señalan que la cantidad de partículas virales ingeridas por un ácaro puede ser muy pequeña o que no todos los ácaros adquieren el virus, a pesar de estar expuestos al mismo, situación que analizó León (2013) sobre grupos de ácaros *B. phoenicis*, que sólo el 40% de la población adquirió el virus de la leprosis, los cuales se mantuvieron sobre hojas de naranja con síntomas de la enfermedad por 5 días .

Las diferencias observadas entre los tiempos de adquisición de CiLV-C usados en el presente trabajo; así como del porque no se obtuvieron cargas de inóculo diferenciales en función de los diferentes periodos de alimentación y lo realizado por Freitas-Astúa *et al.* (2008), Tassi *et al.* (2017); Bastianel *et al.* (2018), por mencionar algunos, puede deberse a que la fuente de inóculo fue diferente, así como la variación natural que tienen los ácaros para alimentarse, entre otros aspectos. Por

ejemplo, en este trabajo, previó al inicio de la alimentación, los ácaros se sometieron a un periodo de ayuno por 4 h, lo que pudo contribuir a que las hembras adultas de *B. yothersi* iniciaran casi inmediatamente su alimentación sobre el material vegetal enfermo con leprosis, propiciando y facilitando la adquisición del virus en un corto periodo de 1 h extendiéndose a periodos más largos de 48 h. Otro aspecto a resaltar es el hecho de que el ayuno, propicia que los receptores quedan disponibles para el ensamble de las partículas virales, aunque, Czosnek *et al.* (2001) mencionan que la cantidad de viriones que un insecto puede adquirir de una planta infectada durante un sólo evento de alimentación es finita; encontraron que en *Bemisia tabaci* los receptores para los virus se saturan dentro de las 12 h posteriores a la adquisición del geminivirus, por lo cual no registraron un incremento significativo en la concentración de viriones a mayores tiempos de alimentación. De igual manera, se señala, que la manipulación continua de los ácaros puede generar cierto grado de estrés, lo cual puede provocar cambios en su comportamiento como el hecho de que no se adapten al nuevo sitio, que el periodo de exploración en el nuevo sitio retrase el inicio de alimentación (gasto de energía en moverse), que no sea de su agrado el material vegetal para satisfacer sus requerimientos alimenticios, por mencionar algunos. Se utilizaron hojas como fuente de inóculo debido a que fue más factible su uso, por la distancia en la que se encuentran las huertas infectadas con leprosis y el laboratorio en donde se realizaron los experimentos, aunado a que las hojas con síntomas de leprosis están presentes en la mayor parte del año, a diferencia de los frutos, lo cual quizás afectó la mayor adquisición de partículas de CiLV-C por los ácaros. Sin embargo, Tassi *et al.* (2017) señalan que el material vegetal utilizado como fuente de inóculo para la adquisición de CiLV-C por *B.*

*yothersi*, no es un factor que impida el proceso, ya que CiLV-C puede adquirirse de lesiones en hojas, frutos y tallos; situación que se presentó en el trabajo de León (2013), que uso hojas de naranja Valencia con lesiones de leprosis para sus pruebas de adquisición, afirmando que *B. phoenicis*, adquiere eficientemente el virus después de 30 min de alimentación y de García-Escamilla *et al.* (2017) quienes utilizaron hojas de naranja con síntomas de leprosis tipo citoplasmático, detectando CiLV-C en larvas, ninfas y adultos de *B. yothersi* alimentadas por 24 y 48 h.

Aunque en este estudio no se encontraron diferencias significativas en la concentración de CiLV-C en los diferentes tiempos de adquisición probados, se consideró el periodo de 24 h para realizar el experimento de transmisión, ya que en este periodo fue en el que se adquirió la mayor carga viral, lo cual además coincide con lo observado por León (2013), quien obtuvo 100% de hojas de naranja Valencia expuestas con síntomas de leprosis después de que a los ácaros (*B. phoenicis*) se les permitió alimentarse por un periodo de 24 h.

El tiempo de aparición de las lesiones de leprosis, es sin duda otro indicador que determina el establecimiento del virus en la planta, a lo cual se reportan rangos que van de días a meses (de 15 a 60 días) (Chiavegato y Salibe, 1984; Freitas-Astúa *et al.*, 2008; León, 2013; Garita *et al.*, 2013; Arena *et al.*, 2016a; Tassi *et al.*, 2017), aspecto contrario a lo encontrado en este estudio pues no se observó algún tipo de síntoma de la leprosis en los tratamientos, aun cuando los ácaros de *B. yothersi* permanecieron sobre las plantas hasta por 60 días. Estos hallazgos se contraponen a lo reportado por Arena *et al.*, (2016a) quienes utilizando plantas de *Arabidopsis*

*thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) y naranja var. Pera y a través de la medición de la carga viral a través qRT-PCR en el material vegetal infestado encontraron que el virus fue detectado a las 6 h después de la infestación (hdi) y que la carga viral aumento alrededor de  $10^4$  veces después de los 25 días de infección, momento en el cual las lesiones típicas cloróticas y necróticas de la leprosis de los cítricos se hicieron evidentes. En consecuencia, es probable que la falta de expresión de síntomas en las pruebas realizadas se deba a que la concentración viral no fue suficiente para que los síntomas se expresaran en los diferentes hospederos, como ha sido demostrado en la relación virus *Potato yellow vein virus* (PYVV) y la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* (Hernández-Guzmán y Guzmán- Barney, 2014) y *Papaya meleira virus* PMeV-Mx y la chicharrita *Empoasca papayae* (García, 2018). Nicolini-Teixeira (2008) también comenta que la manifestación de síntomas está relacionada con el nivel de resistencia de las especies de cítricos en evaluación puesto que encontró que el tangor Murcott y la lima Dorada, considerados resistentes a la leprosis, soportaron una baja concentración del virus y en consecuencia no expresan síntomas. Sin embargo, Freitas-Astúa *et al.* (2008), indican que la inoculación de un patógeno, es dependiente de la eficiencia en la adquisición e inoculación por el vector, aunque pueden ocurrir variaciones en la respuesta del hospedante y en la aparición de síntomas; coincidiendo, Rodrigues y Childers (2013), quienes afirman que el éxito de la adquisición y transmisión de virus, ésta en función del proceso de alimentación de los ácaros *Brevipalpus*. Igualmente, señalan que la presencia de simbiosis en los ácaros podría influir en el comportamiento del vector y afectar directa o indirectamente la capacidad de

adquirir o transmitir el patógeno durante el proceso de alimentación (Rodrigues y Childers, 2013).

Asimismo, Bastianel *et al.* (2006), señalan que todas las fases activas de los ácaros, son capaces de transmitir el virus de la leprosis y que las diferencias en la eficiencia de transmisión, están en función de las diferentes oportunidades de adquirir el virus; a lo cual sugieren que las larvas son más eficientes que los adultos, que probablemente a que tienen menor movimiento y permanecen más tiempo sobre las lesiones, incrementando el período de infección. García (2018), indica que el estado de desarrollo del vector es un factor importante en la transmisión de un virus y que la eficiencia de transmisión es alta, cuando los vectores adquieren un virus como ninfas que como adultos. Lo anterior, se contrapone, a lo realizado en el presente trabajo, en donde se emplearon adultos en lugar de ninfas, con el supuesto de evaluar su eficiencia en la adquisición y transmisión de CiLV-C. Tal vez ambos estados de desarrollo debieron evaluarse como en el estudio llevado a cabo por Tassi *et al.* (2017), con el cual confirmó que las diferentes etapas de desarrollo de *B. yothersi* adquieren y transmiten CiLV-C. Sin embargo, ninfas y adultos requieren necesariamente una gran aportación de energía, dada por la alimentación, para en el caso de las ninfas llegar al estado adulto y reproducirse; así como los adultos para la producción de huevos viables y con ello garantizar su sobrevivencia.

La presencia de CiLV-C entre las diferentes especies de cítricos mostró que la transmisión del virus por *B. yothersi* se dio tanto en las especies dulces como es la naranja, mandarina y toronja, como en las ácidas, caso limón persa. Sin embargo,

se sigue generando la misma tendencia de estar en mayor proporción en naranja que en el resto de las especies de cítricos utilizadas. Con esto se confirma que CiLV-C afecta a sus hospedantes naturales de la familia Rutacea reportados, pero en diferente grado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por García-Escamilla *et al.* (2017), quienes con la infestación de ácaros virulíferos de *B. yothersi* alimentados sobre hojas de naranja con síntomas de leprosis por 72 h, transmitieron CiLV-C a diferentes cultivares cítricos (naranja Valencia, naranja Campbell, naranja Marrs, mandarina Satsuma y mandarina Dancy), señalando que las plantas manifestaron los síntomas característicos de la enfermedad, con la diferencia de que, en este trabajo, no hubo la manifestación de síntomas durante 60 días en las hojas de las plantas infestadas con ácaros virulíferos (asintomáticas); sin embargo, la detección se logró a través de la PCR en tiempo real, resultando ser más sensible que la PCR convencional. Además, de la transmisión de CiLV-C a especies dulces se obtuvo a una ácida, como es el limón persa, resultado que no obtuvieron García-Escamilla *et al.* (2017) al evaluar esta misma especie. Asimismo, en las diferentes especies cítricas evaluadas no se obtuvieron síntomas de leprosis en un periodo de dos meses, en cambio, García-Escamilla *et al.* (2017) indican la observación de tales, pero no indican en que tiempo después de la infestación con ácaros virulíferos presentaron síntomas, aunque en este caso, las plantas fueron mantenidas durante un año.

En un estudio reciente llevado a cabo por Bastianel *et al.* (2018), con el objetivo de detectar la resistencia de varios genotipos del género *Citrus* a la leprosis (CiLV-C), después de 90 días de haber realizado la infestación con ácaros virulíferos de *B.*



*yothersi*, obtuvieron genotipos asintomáticos de naranja agria, limón (*C. limon*), pomelo (*C. paradisi* y *C. grandis*), mandarinas, tangelo y tangor, confirmado mediante RT-PCR; con lo cual ratificaron que la naranja dulce es altamente susceptible a la leprosis, al igual que varios genotipos de mandarinas de diferentes especies (*C. deliciosa*, *C. reticulata* y *C. clementina*), los cuales fueron sintomáticos. Además, presentan el primer informe de la leprosis por CiLV-C para satsumas, pomelo (*C. maxima*), kumquat (*Fortunella* spp.) y su híbrido. Comparado con los resultados generados con el presente trabajo, se confirma la transmisión de CiLV-C por *B. yothersi* a limón persa y toronja probados en este estudio, detectado mediante PCR en tiempo real. La falta de manifestación de síntomas se debió tal vez a que el tiempo de evaluación, de 60 días, fue insuficiente, comparado con el tiempo de evaluación considerado por Bastianel *et al.* (2018). También es posible que la falta de síntomas haya estado asociada a una baja carga viral transmitida por el ácaro, por tanto, se comprueba que CiLV-C afecta a limón persa, lo cual puede generar una alerta para México, ya que la superficie establecida con esta especie cítrica va en aumento. Roy *et al.* (2015) informó que los limones, además de otras seis especies de *Citrus*, son hospedantes naturales de OFV-citrus, causando síntomas similares a la leprosis en México (observaciones en campo). De manera igual, mencionan que no hay informes confirmados de toronjas infectadas con CiLV-C, aunque tal especie esta reportada como hospedante de OFV-citrus en nuestro país. Por lo que, este podría ser un primer reporte de la transmisión de CiLV-C a limón persa y toronja por *B. yothersi*.

Además, cabe destacar que en la mayoría de los trabajos de transmisión de CiLV-C, se ha utilizado a la naranja y en menor proporción mandarina u otras especies; así como, plantas indicadoras, posibles hospedantes alternos y los pocos que existen hacen referencia a la presencia de síntomas observados en campo (Freitas-Astúa *et al.*, 2008), por lo que es importante ampliar el conocimiento sobre el número de especies hospedantes de la leprosis, ya que esto podría derivar en cambios en los patrones de dispersión y abundancia de los ácaros y en consecuencia en el diseño de estrategias de manejo integrado de la enfermedad en el campo.

Desde la detección de la enfermedad con base a observaciones en campo; así como con varios trabajos realizados de transmisión, se ha ratificado que la especie naranja es la más susceptible a la leprosis, sin embargo, Freitas-Astúa *et al.* (2008) señalan que es factible encontrar fuentes de resistencia a la leprosis dentro del género *Citrus*, particularmente en las limas ácidas y limones, algunas tangerinas y sus híbridos, como el tangor 'Murcott', que presentan un alto grado de resistencia. También indican la posibilidad de que otras especies de rutáceas pueden ser susceptibles a CiLV, albergar el virus y ser asintomáticas por lo que es determinante generar esta información base para la definición de planes de manejo de la enfermedad.

De igual manera, en el estudio y comprensión de este patosistema (CiLV – ácaro vector *Brevipalpus* spp. – cítricos), es factible el uso de plantas indicadoras como *Aradiopsis* sp. y/o *Phaseolus vulgaris*, ya que en estas la manifestación de síntomas ocurre alrededor de cinco días (Tassi *et al.*, 2017), situación opuesta de los cítricos,

donde los síntomas aparecen en un periodo que oscila entre los 15 y 60 días después de la inoculación o en el caso del presente estudio, que después de dos meses no hubo registro de síntomas.

Para México es importante conocer la relación patógeno-hospedante, no solo con naranja dulce (cítrico con la mayor superficie en nuestro país), si no con el resto de las especies de cítricos, como son el limón persa, del cual en los últimos años ha incrementado la superficie establecida; así como con el limón mexicano que es una especie importante para la industria agroalimentaria y para mercado de exportación e interno del país. Esto debido a que la mayor parte de las investigaciones sobre esta enfermedad y su vector, se han hecho principalmente en Brasil, que es uno de los mayores productores de naranja en el mundo y donde los daños son más severos por la presencia de la enfermedad y del mismo vector (altas poblaciones en campo observadas), cultivo en el que se invierte alrededor de \$80 millones de USD en el control del ácaro, situación que para ellos es preocupante, por lo que han estado trabajando en el tema del mejoramiento genético para generar variedades resistentes a la enfermedad.

Asimismo, la eficiencia de transmisión de CiLV-C por hembras adultas de *B. yothersi* puede estar determinada por la preferencia que este ácaro vector tiene por algún hospedante cítrico, ya que se observó que esta especie, se estableció mejor en cítricos dulces que en agrios, lo que conlleva a que su comportamiento alimenticio fue mejor en naranja dulce y mandarina que en limón persa, por lo anterior pudo haber más posibilidades de la transmisión del virus a la hojas infestados con los

ácaros virulíferos, sin considerar que existió la posibilidad de que cierto porcentaje de individuos portaba el virus, como lo obtuvieron Rodrigues y Childers (2013), quienes obtuvieron una tasa de transmisión no superior al 11% por hembras adultas de *B. phoenicis*; así como una supervivencia y establecimiento en las plantas infestadas de naranja del 80%.

Después de dos meses de la infestación de ácaros virulíferos, Freitas-Astúa *et al.*, (2008), encontraron ácaros de diferentes estados de desarrollo biológico, de huevo a adulto, en todos sus genotipos evaluados, lo cual coincide con lo obtenido en este estudio, ya que tanto los cítricos dulces como ácidos se estableció *B. yothersi* (formó colonias en las hojas infestadas), en mayor proporción en naranja y mandarina; lo cual también observaron Freitas-Astúa *et al.*, (2008), una variación en el número de ácaros en cada una de las plantas experimentales. Esto demuestra que no hubo resistencia a la presencia del ácaro vector por parte de las especies de cítricos evaluadas. Aunque, Freitas-Astúa *et al.* (2008), sugieren que es necesario mayor tiempo de evaluación para confirmar una respuesta diferencial entre genotipos, en cuanto a la colonización y al establecimiento del vector.

## 7. CONCLUSIONES

Las hembras adultas de *B. yothersi* adquirieron CiLV-C en todos los tiempos evaluados, aunque la carga viral del mismo no estuvo definida por el tiempo de adquisición (alimentación), debido a que no hubo diferencias significativas entre los diferentes tiempos evaluados. No obstante, a 24 h de adquisición se registró la mayor concentración del virus ( $502216.66 \mu\text{L}^{-1}$ ).

Las hembras adultas de *B. yothersi* son capaces de transmitir CiLV-C a diferentes especies cítricas, tanto dulces como ácidas (confirmado por PCR en tiempo real), con preferencia en naranja-mandarina que en toronja-limón persa ( $X^2_1= 16.33$ ,  $P<0.001$ ).

Las hembras adultas de *B. yothersi* tienen la capacidad para establecerse y desarrollarse (formación de colonias con presencia de huevos, larvas, ninfas y adultos) en las diferentes especies de cítricos evaluadas, aunque mantiene preferencia hacia los cítricos dulces como naranja y mandarina, debido a que el número de individuos contabilizados fue mayor en éstas.

## 8. LITERATURA CITADA

- Arena, G. D., Ramos-González, P. L., Nunes, M. A., Ribeiro-Alves, M., Camargo, L. E. A., Kitajima, E. W., Machado, M. A., Freitas-Astúa, J. 2016a. Citrus leprosis virus C infection results in hypersensitive-like response, suppression of the JA/ET plant defense pathway and promotion of the colonization of its mite vector. *Frontiers in Plant Science*. doi.org/10.3389/fpls.2016.01757
- Arena, G. D., Ramos-González, P. L., Nunes, M. A., Jesus, C. C., Calegario, R. F., Kitajima, E. W., Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J. 2016b. *Arabidopsis thaliana* as a model host for *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. *Scientia Agricola*, 74 (1): 85-89.
- Barragán-Valencia, G., Morales-Loredo, A., Álvarez-Ojeda, M. G., Peña-del Río, M. A., Quintero-Zapata, I. 2008. Detección cuantitativa del virus psorosis de cítricos mediante RT-PCR tiempo real. *Agrociencia*, 42: 225-232.
- Bastianel, M., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E.W., Machado, M. A. 2006. The citrus leprosis pathosystem. *Summa Phytopathologica*, 32 (3): 211-220.
- Bastianel, M., Novell, V. M., Kitajima, E. W., Kubo, K. S., Bassanezi, R. B., Machado, M. A., Freitas-Astúa, J. 2010. Citrus leprosis: Centennial of an unusual mite-virus pathosystem. *Plant Disease*, 94: 284–292.
- Bastianel, M., Pereira-Martin, J. A., Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Nunes, M. A. 2018. Citrus leprosis resistance within the citrus group. *Virus Disease*, 29 (4): 491-498. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0489-6>.
- Beard, J. J., Ochoa, R., Braswell, W. E., Bauchan, G. R. 2015. *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari:Tenuipalpidae)-a closer look. *Zootaxa*, 3944 (1): 001-067. DOI: <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3944.1.1>.
- Bermúdez-Guzmán, M. J., Orozco-Santos, M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A. 2014. Diagnóstico de Enfermedades. Pp: 345-355. *In*: Orozco-Santos, M., Robles-González, M. M., Velázquez-Monreal, J. J., Manzanilla-Ramírez, M. A. (eds.). *El Limón Mexicano (Citrus aurantifolia)*. Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán, Tecomán, Colima, México.
- Chabi-Jesus, C., Ramos-González, P. L., Tassi, A. D., Guerra-Peraza, O., Kitajima, E. W., Harakava, R., Beserra Jr., J. E. A., Salaroli, R. B., Freitas-Astúa, J. 2018. Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. *Plant Disease*, doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1425-RE.

- Chagas, C. M., Rossetti, V. 1984. Pp: 215-217. *In*:Transmission of leprosis by grafting. Internacional Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings, University of California Riverside, USA.
- Chen, H., Zhou, Y., Wang, X., Zhou, C., Yang, X., Li, Z. 2016. Detection of *Citrus yellow vein clearing virus* by Real-Time RT-PCR, Horticultural Plant Journal, doi: 10.1016/j.hpj.2016.07.001.
- Chiavegato, L. G., Salibe, A. 1984. Transmissibility of leprosis symptoms by *Brevipalpus phoenicis* to young citrus plants under laboratory conditions. Pp: 218-221. *In*: Internacional Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings, University of California Riverside, USA.
- Choudhary, N., Wei, G., Govindarajulu, A., Roy, A., Li, W., Picton, D. D., Nakhla, M. K., Levy, L., Brlansky, R. H. 2015. Detection of Citrus leprosis virus C using specific primers and TaqMan probe in one-step real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Virology Methods, 224: 105-9.
- Colariccio, A., Lovisolo, O., Chagas, C. M., Galetti, S. R., Rossetti, V., Kitajima, E. W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. 1995. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 20: 208-213.
- Czosnek, H., Ghanim, M., Morin, S., Rubinstein, G., Fridman, V., Zeidan, M. 2001. Whiteflies: Vectors, and Victims (?), of Geminiviruses. Advances in Virus Research, (57): 291-322.
- Cruz-Jaramillo, J. L., Ruiz-Medrano, R., Rojas-Morales, L., López-Buenfil, J. A., Morales-Galván, O., Chavarín-Palacio, C., Ramírez-Pool, J. A., Xoconostle-Cázares, B. 2014. Characterization of a proposed dichorhavirus associated with the citrus leprosis disease and analysis of the host response. Viruses, 6: 2602–22.
- Dietzgen, R. G., Kuhn, J. H., Clawson, A. N., Freitas-Astúa, J., Goodin, M. M., Kitajima, E. W., Kondo, H., Wetzel, T., Whitfield, A. E. 2014. *Dichorhavirus*: a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. Archives of Virology, 159: 607–619. DOI 10.1007/s00705-013-1834-0.
- Faggioli, F., Luigi, M. and Boubourakas, I. N. 2017. Viroid Amplification Methods: RT-PCR, Real-Time RT-PCR, and RT-LAMP. Viroids and Satellites. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00036-X>.
- Freitas-Astúa, J., Fadel, A. L., Bastianel, M., Novelli, V. M., Antonioli-Luizon, R. e Machado, M. A. 2008. Resposta diferencial de espécies e de híbridos de citros à leprose. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43 (7): 809-814.

- Freitas-Astúa, J., Ramos-González, P. L., Arena, G. D., Tassi, A. D., Kitajima, E. W. 2018. Brevipalpus-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? *Current Opinion in Virology*, 33: 66-73.
- García C., G. I. 2018. Evidencia de la transmisión del *Papaya meleira virus* (PMeV) por insectos en *Carica papaya*. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán, México. 123 p.
- García-Escamilla, P., Duran-Trujillo, Y., Otero-Colina, G., Valdovinos-Ponce, G., Santillán-Galicia, M. T., Ortiz-García, C. F., Velázquez-Monreal, J. J., Sánchez-Soto, S. 2017. Transmission of viruses associated with cytoplasmic and nuclear leprosis symptoms by *Brevipalpus yothersi* and *B. californicus*. *Tropical Plant Pathology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0195-8>.
- García-Méndez, V. H., Ortega-Arenas, L. D., Villanueva-Jiménez, J. A., Sánchez-Arroyo, H. 2016. Susceptibilidad de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae) a insecticidas en Veracruz, México. *Agrociencia*, 50: 355-365.
- Garita, L. C., Tassi, A. D., Calegario, R. F., Kitajima, E. W., Carbonell, S. A. M., Freitas-Astúa, J. 2013. Common bean: Experimental indicator plant for Citrus leprosis virus C and some other cytoplasmic-type *Brevipalpus*-transmitted viruses. *Plant Disease*, 97:1346-1351.
- Garita, L. C., Tassi, A. D., Calegario, R. F., Freitas-Astúa, J., Salaroli, R. B., Romão, G. O., Kitajima, E. W. 2014. Experimental host range of Citrus leprosis virus C (CiLV-C). *Tropical Plant Pathology*, 39 (1): 043-055.
- González-Garza R. 2017. Evolution of diagnostic technics for plant viruses. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35 (3): 591-610. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-1.
- Groot, V. M. T., Breeuwer, A. J. J. 2006. *Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Experimental and Applied Acarology*, 39: 257–271. DOI 10.1007/s10493-006-9019-0.
- Helle, W., Bolland, H. R., Heitmans, W. R. B. 1980. Chromosomes and types of parthenogenesis in false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). *Genetica*, 54: 45–50.
- Henson, J. M., French, R. 1993. The Polymerase Chain Reaction and Plant Disease Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31: 81-109.
- Hernández-Guzmán, A. K., Guzmán-Barney, M. M. 2014. Detección del virus del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de la papa en diferentes órganos



- de *Solanum tuberosum* grupo Phureja cv Criolla Colombia utilizando RT-PCR convencional y en tiempo real. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16 (1): 74-85.
- Hogenhout, S. A., Ammar, D., Whitfield, A. E., Redinbaugh, M. G. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 46: 327-359. DOI: 10.1146/annurev.phyto.022508.092135.
- Kitajima, E. W., Müller, G. W., Costa, A. S., Yuki, W. 1972. Short, rod-like particles associated with citrus leprosis. *Virology*, 50: 254-258.
- Knorr, L. C. 1968. Pp: 332-341. Studies on the etiology of leprosis in citrus. *In: Internacional Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings*, University of California Riverside, USA.
- 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. Tesis de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Escuela de Posgrado, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. 121 p.
- León, M. 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 Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 15(2): 207-217.
- León, G. M., Roy, A., Choudhary, N., Brlansky, Y. R. 2017. Parámetros de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos por *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 43(2): 215-222. DOI: 10.25100/socolen.v43i2.5946.
- Locali, E. C., Freitas-Astúa, J., de Souza, A. A., Takita, M. A., Astua-Monge, G., Antonioli, R., Kitajima, E. W., 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.
- NAPPO, 2015. Informe de plaga: Leprosis de los cítricos. North American Plant Organization (Organización Norteamericana de Protección a las Plantas). Consultado en línea: en noviembre de 2018, en: [https://www.nappo.org/files/6214/4977/5211/CT\\_06\\_Leprosis\\_de\\_los\\_citricos\\_s\\_26-11-2015-s.pdf](https://www.nappo.org/files/6214/4977/5211/CT_06_Leprosis_de_los_citricos_s_26-11-2015-s.pdf)
- Nicolini-Teixeira, F. 2008. Leprose do citros: interações planta x vírus x vetor. Tesis de Doutor em Agronomia – Área de concentração em Fitopatologia. Universidade de Passo Fundo Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. 148 p.

- Payne, R. W., Harding, S. A., Murray, D. A., Soutar, D. M., Baird, D. B., Welham, S. J., Kane, A. F., Gilmour, A. R., Thompson, R., Webster, R., Tunnicliffe, W., G. 2007. GenStat Release 10 Reference Manual. VSN International; Hemel Hempstead, UK.
- Pijnacker, L. P., Ferwerda, M. A., Bolland, H. R., Helle, W. 1980. Haploid female parthenogenesis in the false spider mite *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). *Genetica*, 51: 221–214.
- Ramos-González, P. L., Hernández-Rodríguez, L., Banguela-Castillo, A. 2011. Plataformas genéricas para el diagnóstico a gran escala en fitopatología. *Revista CitriFrut*, 28 (1): 25-37.
- Ramos-González, P. L., Chabi-Jesus, C., Guerra-Peraza, O., Tassi, A. D., Kitajima, E. W., Harakava, R., Salaroli, R. B., Freitas-Astúa, J. 2017. Citrus leprosis virus N: A new Dichorhavirus causing citrus leprosis disease. *Phytopathology*, 107: 963-976.
- Rodrigues, J. C. V., Machado, M. A., Kitajima, E. W., Müller, G. W. 2000. Transmission of Citrus Leprosis Virus by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). Pp: 174-178 In: Fourteenth IOCV Conference, 2000-Other Viruses.
- Rodrigues, J. C. V., Kitajima, E. W., Childers, C. C., Chagas, C. M. 2003. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 30: 161–179.
- Rodrigues, J. C. V., Childers, C. C. 2013. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. *Experimental and Applied Acarology*, 59: 165 -175. DOI 10.1007/s10493-012-9632-z.
- Roy, A., Stone, A., Otero-Colina, G., Wei, G., Choudhary, N., Achor, D., Shao, J., Levy, L., Nakhla, M. K., Hollingsworth, C. R., Hartung, J. S., Schneider, W. L., Brlansky, R. H. 2013. Genome assembly of citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with orchid fleck virus. *Genome Announcements*, 1(4): e00519-13. doi:10.1128/genomeA.00519-13.
- Roy, A., Stone, A. L., Shao, J., Otero-Colina, G., Wei, G., Choudhary, N., Achor, D., Levy, L., Nakhla, M. K., Hartung, J. S., Schneider, W. L., Brlansky, R. H. 2015. Identification and molecular characterization of nuclear citrus leprosis virus, a member of the proposed Dichorhavirus genus infecting multiple citrus species in Mexico. *Phytopathology*, 105: 564–75.
- Salinas-Vargas, D., Santillán-Galicia, M. T., Guzmán-Franco, A. W., Hernández-López, A., Ortega-Arenas, L. D., Mora-Aguilera, G. 2016. Analysis of genetic variation in *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae) populations from four

species of citrus host plants. PLoS ONE 11(10): e0164552. doi:10.1371/journal.pone.0164552.

Sánchez-Velázquez, E. J., Santillán-Galicia, M. T., Novelli, V. M., Nunes, M. A., Mora-Aguilera, G., Valdez-Carrasco, J. M. 2015. Diversity and genetic variation among *Brevipalpus* populations from Brazil and Mexico. PLoS ONE, 10 (7): e0133861. doi:10.1371/journal.pone.0133861.

SENASICA. 2013. Leprosis de los cítricos (*Citrus leprosis virus C*). Dirección General de Sanidad Vegetal - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No.35, 27 p.

SENASICA. 2016. Manual operativo de la Campaña contra la Leprosis de los Cítricos (CiLV). Dirección de Protección Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 24 p. Consultado en línea en noviembre de 2018: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/176138/Manual\\_de\\_la\\_campa\\_a\\_Leprosis\\_CiLV.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/176138/Manual_de_la_campa_a_Leprosis_CiLV.pdf).

SENASICA. 2017. Leprosis de los cítricos (*Citrus leprosis virus*). Dirección General de Sanidad Vegetal – Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Con la colaboración del Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LaNREF). Ciudad de México. Ficha Técnica No.35, 24 p.

SIAP, 2017. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA. Consultado en línea: enero de 2017, en: [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/identidad/index.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/identidad/index.jsp).

Tassi, A. D., Garita-Salazar, L. C., Amorim, L., Novelli, V. M., Freitas-Astúa, J., Childers, C. C., Kitajima, E. W. 2017. Virus-vector relationship in the Citrus leprosis pathosystem. *Experimental and Applied Acarology*, 71: 227-241.