

Parámetros de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos por *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae)

Transmission parameters of citrus leprosis virus by *Brevipalpus yothersi* (Acari: Tenuipalpidae)

GUILLERMO LEON M.¹, AVIJIT ROY², NANDLAL CHOUDHARY³ y RONALD BRLANSKY⁴

Resumen: La leprosis de los cítricos, causada por virus (Citrus Leprosis Virus, *CiLV*), es un problema fitosanitario de importancia económica y cuarentenaria para la citricultura de países productores. En Colombia su presencia fue confirmada en 2004 en los departamentos del Meta y Casanare; el ácaro *Brevipalpus yothersi* Baker (antes identificado como *Brevipalpus phoenicis* Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae), se reconoce como el principal vector del virus en el país. Se determinaron los parámetros: período de acceso para adquisición, período de acceso para inoculación y porcentaje de ácaros infectados con *CiLV*, por medio de pruebas de transmisión y análisis moleculares en el Centro de Investigación “La Libertad” de CORPOICA, Meta, Colombia. Al probar períodos de adquisición entre 10 minutos y 72 horas, se encontró que *B. yothersi* adquiere el virus después de 30 minutos de alimentación sobre hojas de naranja Valencia (*Citrus sinensis* L.) Osbeck con lesiones de leprosis. El período mínimo requerido por los ácaros para transmitir el virus hacia plantas de *C. sinensis* fue de 10 minutos. Para períodos de transmisión desde 10 minutos hasta 24 horas, los porcentajes de infección variaron entre 25 y 68,75 % en las hojas receptoras. De acuerdo a pruebas de transmisión y análisis RT-PCR, después de tres días de alimentación sobre lesiones de leprosis, el 40 % de las poblaciones del ácaro evaluadas adquirió el virus *CiLV-C2*. Los resultados obtenidos amplían el conocimiento de las interacciones planta - virus - vector, lo cual es fundamental para el establecimiento de programas de prevención y manejo de la enfermedad.

Palabras clave: Lesiones, adquisición, ácaros, vectores.

Abstract: Citrus leprosis, caused by (Citrus Leprosis Virus, *CiLV*) is an important, economic and quarantine phytosanitary problem for citrus industry in producer countries. Presence of *CiLV* in Colombia was confirmed in 2004 at Meta and Casanare states; the red flat mite *Brevipalpus yothersi* Baker (formerly identified as *Brevipalpus phoenicis* Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae), is recognized as the principal vector of this virus in the country. Transmission parameters as acquisition access period, inoculation access period and percentage of viruliferous mites with *CiLV*, were carried out through transmission tests and molecular analysis at CORPOICA “La Libertad” Research Center, Meta, Colombia. By testing acquisition periods between 10 minutes and 72 hours, it was found *B. yothersi* mites needs 30 minutes feeding to acquire the virus on Valencia orange leaves (*Citrus sinensis* L.) Osbeck with symptomatic lesions. The minimum period required by mites to transmit the virus to *C. sinensis* plants was 10 minutes. For transmission periods between 10 minutes to 24 hours, receptor leaves show leprosis lesions percentages between 25 % and 68.75 %. According to transmission and RT-PCR tests, 40 % of mite population acquired the *CiLV-C2* after three days of feeding on leprosis lesions. This results increase knowledge of plant - virus - vector interactions, which is essential for establishment of prevention and disease management programs.

Key words: Lesions, acquisition, mites, vectors.

Introducción

El virus de la leprosis de los cítricos (*CiLV*), es un limitante fitosanitario de importancia cuarentenaria y económica, que significa millones de dólares en pérdidas para la citricultura de los países donde se ha establecido; afecta principalmente naranjos y mandarinos y únicamente se encuentra reportado en Suramérica, Centro América (Rodrigues *et al.* 2001) y el sur de México (NAPPO, 2005). La relevancia del *CiLV*, radica en que además de afectar la producción citrícola, genera restricciones para el mercadeo internacional de cítricos y algunos productos agropecuarios hospederos del ácaro vector, especialmente con países de Norteamérica, Europa y Asia donde no se ha registrado *CiLV*.

Childers *et al.* (2003a) y USDA (2004) afirman que la enfermedad fue descrita en Florida, Estados Unidos por primera vez en 1901 y se denominaba “escama de la corteza”; esta enfermedad, casi destruye la citricultura de la Florida antes de 1925, y no se volvió a registrar hasta 1968.

En Sur América fue identificada inicialmente en Paraguay por Spegazzini (1920), quien la denominó “lepra explosiva”; luego la enfermedad fue observada en Argentina y en 1931 se registró en hojas de naranjo (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) variedad “Bahía” en Sao Paulo, Brasil, (Bastianel *et al.* 2006).

La leprosis de los cítricos, ha causado pérdidas económicas en Brasil, Argentina, Paraguay, Venezuela, Honduras, Costa Rica y Panamá; se registró en Bolivia por Gómez *et al.* (2005), Costa Rica por Araya (2000), Panamá por Saavedra *et al.* (2001), Guatemala por Mejía *et al.* (2005) y en Honduras por Rodrigues *et al.* (2007); la leprosis de los cítricos se detectó en naranjos dulces en México, 2005 (NAPPO 2005; Castillo *et al.* 2011) y en Belice, año 2013 (CABI/EPPPO, 2013). Según Bastianel *et al.* 2006, Freitas-Astua *et al.* (2004) y Rodrigues *et al.* (2001), en Brasil se considera la enfermedad viral más importante en cítricos y los costos de control del ácaro transmisor suman alrededor de 100 millones de dólares/año.

¹ Investigador Ph. D. CORPOICA, Centro de Investigación La Libertad, Km. 17 vía Puerto López, Villavicencio, Colombia, gleon@corpoica.org.co, autor para correspondencia. ^{2,3,4} Ph. D. University of Florida, IFAS, Plant Pathology Department, Citrus Research and Education Center, 700 Experiment Station Road, Lake Alfred, FL 33850, EE. UU. rhby@crec.ifas.ufl.edu.

En Colombia, el virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático (CiLV-C) fue detectado en 2004 (León *et al.* 2006b; 2006c) y para 2005, la enfermedad se encontraba distribuida en los departamentos del Meta y Casanare (Becerra *et al.* 2007; León *et al.* 2006c; León 2012). Posteriormente, se reportó virus de la leprosis en Ibagué, Tolima (Bastianel *et al.* 2010). En el Meta, el área sembrada en cítricos es cerca de 4.300 ha, y la producción se calcula en \$180.000 millones de pesos/año; por tanto se requiere desarrollar programas de control, MADR-ASOHOFrucOL (2002).

Algunas especies de ácaros del género *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) se han reconocido como vectores del CiLV. La primera referencia de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos por ácaros fue registrada en Argentina por Frezzi (1940) y la especie fue identificada como *Tenuipalpus pseudocuneatus* Blanchard, 1940, un sinónimo de *B. obovatus* Donnadieu. Posteriormente, Musumeci y Rossetti (1963) encontraron a *B. phoenicis* Geijskes (ahora *B. yothersi* Baker) como vector en Brasil. El ácaro rojo plano *B. phoenicis*, es la especie más diseminada y reportada como vector de este virus, es una especie polífaga, dispersa en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo (Chagas *et al.* 1983; Maia y Oliveira 2002; Childers *et al.* 2003b; Carvalho *et al.* 2008). Aun cuando el género *Brevipalpus* tiene más de 300 especies, únicamente las especies *B. phoenicis*, *B. obovatus* y *B. californicus* (Banks), están registradas como vectores del CiLV.

Para entender la transmisión del virus, además de los factores biológicos intrínsecos del vector, se debe estudiar la eficacia de la transmisión del CiLV, determinada por parámetros como tiempos de adquisición y transmisión, persistencia del virus en la planta y capacidad de diseminación de la enfermedad (Bastianel *et al.* 2006; Rodrigues y Childers 2013); Rodrigues (2000), también afirma que es necesario entender las formas de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos, además de conocer la biología del ácaro vector y sus hábitos de alimentación.

Según Haramoto (1969), la longevidad de *Brevipalpus* spp. es más larga que la mayoría de especies de tetraníquidos. Bajo condiciones ambientales favorables (25 °C y 65-70 % HR), el ciclo de vida de *B. phoenicis* dura alrededor de 25 días; las hembras ponen hasta cuatro huevos por día, aproximadamente durante 20 días, con lo cual se presentan varias generaciones por año.

El ácaro *B. phoenicis* pasa por los estados de huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto. El adulto de *B. phoenicis* mide, aproximadamente, 0,3 mm de largo, es de color rojo oscuro con manchas un poco más claras sobre el dorso de su cuerpo; cuerpo aplanado, ovalado y con su parte anterior más ancha que la posterior; viven en el envés de las hojas y en los frutos; durante los estados de ninfa y adulto poseen ocho patas, mientras en su estado larval solo seis patas. Los huevos son color anaranjado, redondos y puestos individualmente en los rebrotes, frutos o en el envés de las hojas (Chiavegato 1996).

León *et al.* (2006a), encontraron que a temperatura de $27,6 \pm 0,7$ °C y humedad relativa de $69 \pm 7,9$ %, la duración del *B. phoenicis* fue: huevo 4 a 6 días; larva 3 a 4 días; protoninfa 5 a 7 días; deutoninfa 6 a 8 días y adulto 21 a 24 días. De acuerdo a estos datos, el ciclo de huevo a adulto demora entre 18 a 25 días y el estado adulto dura en promedio más de 21 días; se deduce que el ciclo de vida está influenciado por la temperatura y la humedad relativa. El tiempo

de desarrollo de *B. phoenicis* en limón (*Citrus lemon*) según Sadana y Kumari (1991), se acorta a temperaturas de 25 a 30 °C y humedad relativa de 70 %; el período de ovoposición se alarga y la fecundidad, así como la viabilidad de los huevos es mejor.

El ácaro *B. phoenicis* se asocia con la roña *Elsinoe fawcettii*, o con lesiones en la superficie de las hojas ramas o frutos para encontrar protección contra la lluvia y los enemigos naturales (Knorr y Denmark 1970; Rodrigues *et al.* 2003) con lo cual su desarrollo es mejor que en hojas sanas y completa su fase inmadura en menos tiempo: 14,4 días sobre frutos y 17,6 días sobre hojas de naranja "Pera de Río"; la fecundidad fue mayor en frutos que en hojas, con promedios de 39,2 y 8,6 huevos por hembra, respectivamente (Chiavegato 1996). *B. phoenicis* vive en todos los órganos aéreos de las plantaciones, prefiere los frutos; en Brasil durante las épocas lluviosas, el número de ácaros tiende a disminuir (Oliveira 1996; Rodrigues *et al.* 2001). La capacidad de dispersión de *B. phoenicis* comparada con otras especies de ácaros en cítricos es relativamente limitada. El ácaro rojo plano se mueve menos de 1 cm al día y solo el 3 % alcanza distancias de 40 a 50 cm (Alves *et al.* 2005).

Algunos autores sugieren que el ácaro *B. phoenicis* puede transmitir el virus durante toda su vida, cuando inyecta y succiona saliva en frutos, hojas, ramas y otros tejidos de numerosas plantas (Chagas y Rossetti 1983; Kitajima *et al.* 2003). Por su parte, Nicolini *et al.* (2007) manifiestan que el virus circula pero no se replica dentro del ácaro vector, lo cual coincide con afirmaciones de Kitajima y Alberti (2014) quienes, basados en información citopatológica, transmisión por estados inmaduros del ácaro y el corto período de latencia del virus, confirman que este es del tipo circulativo. Recientemente, Roy *et al.* (2015) presentan evidencias preliminares de que el virus es de este tipo y se puede replicar dentro del cuerpo del ácaro. Según Chagas *et al.* (1983), dos días de alimentación son suficientes para que el ácaro adquiera y transmita el virus; las larvas transmiten la enfermedad con un 48,3 % y las ninfas y adultos son menos eficientes. Boaretto *et al.* (1993) afirman que no hay transmisión transovárica del virus de hembras adultas infectada hacia su descendencia.

De acuerdo a Chiavegato (1996), los síntomas se tornan visibles de 15 a 60 días después que la infección ha sido transmitida. Según León *et al.* (2006a) las lesiones crecen de 5-7 mm cada 15-20 días; cuando la severidad es mayor al 30 %, la caída de las hojas afectadas ocurre en promedio 70 días después de la aparición de la primera lesión. Los ácaros del género *Brevipalpus* que transmiten virus, inducen en las plantas hospederas lesiones con apariencia de clorosis o necrosis localizadas en el sitio de alimentación (Colariccio *et al.* 1995; Rodrigues *et al.* 2003; Kitajima *et al.* 2004).

Los tejidos de hojas sintomáticas presentan partículas virales, que no se observaron en las áreas asintomáticas cercanas (Kitajima *et al.* 2003), lo cual fue corroborado por medio de pruebas de RT-PCR (Locali *et al.* 2004) e indica que el virus no se disemina sistémicamente en el hospedero. Dentro de una plantación, la dispersión del virus ocurre a través del movimiento de los ácaros virulíferos y es una consecuencia de sus hábitos de alimentación (Rodrigues *et al.* 2001).

En Colombia, el principal transmisor del virus de la leprosis de los cítricos se conocía como *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) denominado común-

mente ácaro rojo plano. Esta especie se encuentra diseminada por todas las regiones geográficas del país y ha sido reportada desde hace más de tres décadas en varias zonas cítricas (León *et al.* 2006a; León 2012). Recientemente (Beard *et al.* 2015; Roy *et al.* 2015), determinaron que la especie *B. phoenicis*, procedente de Colombia corresponde a *Brevipalpus yothersi* Baker, 1949 (Acari: Tenuipalpidae). Teniendo en cuenta que los ácaros identificados como *B. yothersi* para este estudio provienen de muestras de huertos de cítricos del piedemonte llanero y de las colonias establecidas en el laboratorio, nos referiremos para efectos de metodología y resultados a la especie *B. yothersi* en lugar de *B. phoenicis*. Se aclara además que la especie *B. yothersi* está fuertemente asociada con el complejo *CiLV* y que es vector de varios tipos de virus de leprosis detectados en Colombia, como el citoplasmático (*CiLV-C*) y el citoplasmático tipo2 (*CiLV-C2*), presentes en los departamentos del Meta y Casanare (León *et al.* 2014); posterior a este estudio, se detectaron también el tipo nuclear (*CiLV-N*) y el *Hibiscus green spot virus 2* (*HGSV-2*), que también producen lesiones de leprosis y están relacionados con *B. yothersi* (Roy *et al.* 2014; Roy *et al.* 2015).

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

Materiales y métodos

Por medio de pruebas controladas de adquisición y transmisión del virus de la leprosis de los cítricos, con ácaros *B. yothersi* y plantas de naranja Valencia *C. sinensis*, se estudiaron los parámetros de transmisión del *CiLV* por el ácaro vector *B. yothersi*, en el Centro de Investigación La Libertad de CORPOICA, Departamento del Meta, Colombia. Para ello se siguieron las siguientes etapas:

Establecimiento de colonias de ácaros *B. yothersi*. Se recolectaron ácaros *B. yothersi* en árboles sin síntomas de leprosis del huerto experimental de *C. sinensis* del C.I. La Libertad. Los ácaros recolectados, se llevaron al laboratorio de entomología y con la ayuda de pinceles finos y estereoscopios se ubicaron sobre frutos de naranja Valencia previamente lavados. Para establecer las colonias, los ácaros se colocaron en la parte superior de los frutos de naranjo, con lesiones de roña o daños de insectos, lo cual favorece el establecimiento y la reproducción de los ácaros y es modificación del método utilizado por Locali *et al.* (2004). Los frutos se demarcaron previamente con una línea de tinta indeleble en su parte ecuatorial y sobre dicha línea se aplicó una franja de vaselina para lograr el confinamiento de los ácaros en la parte superior de cada fruto. Los frutos se dispusieron en bandejas de plástico y se mantuvieron en el laboratorio a temperatura promedio de 25 +/- 4 °C y humedad relativa de 80 +/- 8 %.

Para garantizar el establecimiento de colonias con ácaros libres del virus de la leprosis, se utilizó como colonia madre la progenie descendiente de la población recolectada en

campo. Cada vez que los frutos iniciaron su deshidratación, se reemplazaron por frutos más frescos, sobre los cuales se trasladaron los ácaros, para dar continuidad a la colonia. Siguiendo el método descrito, se garantizó el establecimiento y desarrollo de las poblaciones libres del virus, así como la cantidad de individuos requeridos para las pruebas de transmisión.

Siembra y mantenimiento del material vegetal. La planta receptora utilizada para estos estudios fue *C. sinensis* de tres meses de edad. Los árboles requeridos para las pruebas de transmisión, se sembraron individualmente por semilla en macetas y se mantuvieron en confinamiento libres de leprosis bajo condiciones de casa de malla en el C.I. La Libertad de CORPOICA. Una vez establecidas las colonias del ácaro y las plantas receptoras disponibles, se procedió a realizar las pruebas de transmisión del *CiLV*, para determinar los parámetros más importantes del proceso de transmisión del virus.

Determinación de los parámetros de transmisión. En este estudio, las lesiones de leprosis encontradas en las plantas receptoras se definen como causadas por el complejo *CiLV*, sin embargo las pruebas moleculares se realizaron con iniciadores para detección del *CiLV-C2*, puesto que al momento del estudio, la metodología de diagnóstico para el *CiLV-C* presente en la región no estaba aún estandarizada (Roy *et al.* 2013) y los *CiLV-N* y *HGSV-2*, que pudieron estar presentes, se detectaron y secuenciaron posteriormente (Roy *et al.* 2014; Roy *et al.* 2015).

Para determinar la efectividad de las pruebas de transmisión, se realizaron observaciones periódicas sobre las plantas utilizadas como receptoras, en busca de lesiones de leprosis. Las hojas que presentaron síntomas de la enfermedad, se recolectaron y codificaron para efectuar posteriormente análisis moleculares RT-PCR para detección del virus citoplasmático tipo 2 (*CiLV-C2*). Los ácaros utilizados en la prueba de transmisión para determinar el tiempo de adquisición y el porcentaje de población virulífera se recolectaron y almacenaron en etanol 90 % y, posteriormente, se efectuó sobre ellos detección molecular del *CiLV-C2*. Los parámetros analizados en este trabajo relacionados con la transmisión del virus fueron: período de adquisición, período de transmisión y porcentaje de población virulífera; las pruebas se desarrollaron de la siguiente manera:

Período de acceso para adquisición. El tiempo requerido para que un ácaro adquiriera partículas virales al alimentarse de tejido infectado con *CiLV-C2*, se determinó bajo condiciones de confinamiento en el laboratorio de entomología del C.I. La Libertad de CORPOICA. Se evaluaron nueve tratamientos correspondientes a diferentes períodos de adquisición (0, 10, 30, 60 minutos; 2, 6, 24, 48 y 72 horas), en un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental (UE) se constituyó por una hoja de *C. sinensis* con lesiones de leprosis, colectada de árboles positivos a *CiLV-C2* e infestada con 10 ácaros *B. yothersi*. Los ácaros se ubicaron sobre las lesiones de cada hoja, con la ayuda de estereoscopios y pinceles de punta fina. El peciolo de las hojas se delimitó con vaselina, para confinar los ácaros; las hojas se colocaron sobre viales de vidrio con agua destilada para mantener humedad durante el tiempo de experimentación.

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

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

Período de acceso para inoculación. El tiempo requerido para que el ácaro *B. yothersi* pueda transmitir el virus de la leprosis después de su adquisición, se evaluó en el C.I. La Libertad bajo condiciones de invernadero, en plantas de *C. sinensis*. Los ácaros utilizados en estas pruebas, se alimentaron previamente durante 48 horas sobre hojas de *C. sinensis* positivas al *CiLV-C2*, para permitir la adquisición del virus. Luego de este período, los ácaros se trasladaron a las plantas de *C. sinensis* sanas, para evaluar diferentes tiempos de transmisión del virus. El experimento, consistió de ocho tratamientos correspondientes a diferentes períodos de transmisión (0, 10, 20, 30, 60 minutos; 2, 6 y 24 horas), en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Cada unidad experimental la constituyó una planta de naranja. Para efectuar las transmisiones, se utilizaron las cuatro hojas más jóvenes de cada planta; cada hoja constituyó una unidad de muestreo y sobre cada una de ellas se ubicaron 10 ácaros, con ayuda de un pincel de punta fina. Los ácaros se confinaron mediante la aplicación de vaselina en la base de las hojas expuestas para evitar su escape.

Luego de cumplido el período de acceso para inoculación de cada tratamiento, los ácaros se retiraron con un pincel y las plantas se dejaron en observación durante dos meses, o hasta la aparición de síntomas de leprosis. Los datos obtenidos se analizaron inicialmente mediante una prueba de dependencia de Chi² y se ajustó un modelo de regresión logística, para establecer el efecto del período de transmisión sobre la probabilidad de aparición de síntomas. Para el tiempo de aparición de síntomas se efectuó análisis de varianza y prueba de Tukey. Las hojas sintomáticas, se colectaron posteriormente por cada tratamiento, para realizar pruebas moleculares RT-PCR y comprobar la presencia del *CiLV-C2* en ellas.

Porcentaje de población virulífera. Este porcentaje de población virulífera, se refiere a la proporción de ácaros que luego de un tiempo de adquisición prudencial presentan partículas virales de *CiLV-C2* detectables por medio de RT-PCR dentro de su cuerpo. Para esta prueba se utilizaron 10 grupos de 50 ácaros *B. yothersi* por grupo, provenientes de las colonias del laboratorio. Cada grupo se colocó en alimentación sobre hojas de *C. sinensis* positivas al *CiLV-C2*, bajo condiciones de confinamiento en el laboratorio de entomología de CORPOICA en el C.I. La Libertad. Los ácaros se situaron sobre las lesiones durante cinco días para asegurar la probabilidad de adquisición del *CiLV-C2* y cumplido este tiempo, los grupos se recolectaron en viales de vidrio con etanol 90

%, para evaluar el porcentaje de virulencia de cada grupo mediante técnica RT-PCR según metodología desarrollada por Kubo *et al.* (2011).

Resultados y discusión

Período de acceso para adquisición. Para determinar el período de acceso para adquisición del virus de la leprosis por ácaros *B. yothersi*, se efectuó la prueba de detección RT-PCR a los ácaros luego de los tiempos de adquisición correspondientes a cada tratamiento. Previamente a la detección molecular, se permitió un período de acceso para inoculación de tres días sobre plantas de *C. sinensis* sanas y luego se evaluó la aparición de síntomas sobre las plantas receptoras. La detección molecular para *CiLV-C2*, efectuada en los ácaros mediante prueba RT-PCR, únicamente resultó positiva para ácaros con períodos de adquisición de 2 y 6 horas; los demás tratamientos no mostraron amplificación para *CiLV-C2*, según se observa en las columnas 5 y 6 de la figura 1.

Sin embargo, cuando los ácaros se trasladaron a plantas sanas de *C. sinensis* para observar si lograban transmitir el virus, las plantas receptoras mostraron aparición de lesiones de leprosis, en los tratamientos en que los ácaros *B. yothersi* se alimentaron por más de 30 minutos sobre hojas sintomáticas, a pesar de que el diagnóstico molecular no fue positivo sobre estos grupos de ácaros. Dado que en este trabajo se utilizaron iniciadores específicos para la detección de *CiLV-C2* por RT-PCR, esto explica por qué no fue posible detectar molecularmente otros tipos de virus, que pudieron causar los síntomas de leprosis observados en las plantas receptoras finales; dichos tipos de virus que también producen lesiones de leprosis, como el citoplasmático (*CiLV-C*), el nuclear (*CiLV-N*) o el hibiscus green spot virus (*HGSV*), se detectaron y secuenciaron en investigaciones posteriores al presente trabajo (Roy *et al.* 2014; Roy *et al.* 2015).

De acuerdo con la aparición de síntomas, se encontró que siete de los ocho tratamientos de ácaros que recibieron diferentes períodos de adquisición del virus, lograron causar lesiones visibles de la leprosis en las plantas receptoras, con excepción del tratamiento de 10 minutos de adquisición, estos resultados permiten afirmar que el ácaro *B. yothersi* puede adquirir el virus de la leprosis después de un período de acceso para adquisición de 30 minutos; así, para los tratamientos de 30 min y 2 h de adquisición, se observó aparición de lesiones de la enfermedad en 75 % de las hojas expuestas al ácaro; en los tratamientos de 60 min, 6 h, 48 h y 72 h, de período de adquisición, el 50 % de las hojas mostró aparición de síntomas del virus, y únicamente el tratamiento de 24 h de adquisición, presentó 100 % de las hojas expuestas al ácaro, con lesiones de leprosis de los cítricos (Tabla 1). Estos resultados complementan los estudios de Chagas *et al.* (1983), quienes observaron que un período de dos días de alimentación es suficiente para que el ácaro adquiera el virus.

Con base en el análisis de regresión logística para la aparición de lesiones de leprosis en función del período de acceso para adquisición ($\chi^2 = 0,0272$; $Pr > \chi^2 = 0,8690$), se logró establecer que no existe efecto significativo del tiempo de adquisición, sobre la probabilidad posterior de aparición de síntomas en hojas expuestas a los ácaros *B. yothersi* que han adquirido el virus. Esto implica que el ácaro vector consigue adquirir el virus después de 30 minutos de alimentación sobre hojas de *C. sinensis* con síntomas de leprosis, y por



Figura 1. Detección de *CiLV-C2* en ácaros *B. yothersi* expuestos a diferentes períodos de acceso para adquisición. 1: Marcador de peso molecular hyperladder IV; 2: 10 min; 3: 30 min; 4: 60 min; 5: 2 horas; 6: 6 horas; 7: 24 horas; 8: 48 horas; 9: 72 horas; 10: Control positivo; 11: Control negativo.

consecuente lo podrá transmitir posteriormente. Una vez *B. yothersi* adquirió el virus y luego se alimentó durante tres días en plantas sanas de *C. sinensis*, las hojas de estas plantas receptoras presentaron las primeras lesiones de leprosis en un intervalo de 16 y 30 días, lo cual está de acuerdo con Locali *et al.* (2006), quienes observaron síntomas de leprosis en naranja “pera” después de 17 y 21 días de exposición a ácaros infectados.

Período de acceso para inoculación. Los resultados de las evaluaciones sobre el tiempo requerido por los ácaros *B. yothersi* para transmitir el *CiLV* hacia plantas de *C. sinensis*, después de un período de adquisición de 48 horas, muestran que hubo transmisión y aparición de lesiones de leprosis en todos los tiempos evaluados, con un intervalo entre 10 minutos y 6 horas de transmisión.

De acuerdo a la sintomatología desarrollada, el 25 % de las hojas de las plantas receptoras mostró lesiones de leprosis para períodos de transmisión de 10 y 20 minutos; 50 % de las hojas presentó síntomas de leprosis para los tratamientos de 30 y 60 minutos; cuando los ácaros tuvieron dos horas de transmisión, 56,25 % de las hojas presentó lesiones causadas por el virus; para el tratamiento de 24 horas de transmisión, 62,5 % de las hojas reveló sintomatología y en el tratamiento de seis horas de transmisión, el 68,75 % de las hojas mostró síntomas de infección por leprosis.

Tabla 1. Desarrollo de lesiones de leprosis en plantas de naranja Valencia *C. sinensis* expuestas a ácaros *B. yothersi* con diferente período de acceso para adquisición del virus.

| Período de acceso para adquisición | Plantas receptoras con lesiones de leprosis (%) |
|------------------------------------|---|
| T1 - 10 min | 0 |
| T2 - 30 min | 75 |
| T3 - 60 min | 50 |
| T4 - 2 h | 75 |
| T5 - 6 h | 50 |
| T6 - 24 h | 100 |
| T7 - 48 h | 50 |
| T8 - 72 h | 50 |

Mediante regresión logística, se logró explicar el efecto del tiempo de transmisión sobre la probabilidad de aparición de los síntomas del virus de la leprosis en las hojas de *C. sinensis* receptoras.

El modelo ajustado ($\alpha = 0,082$), corresponde a la siguiente expresión: $P = 1 / 1 + e^{(0,278 - 0,0007 t)}$

En donde: P = Probabilidad de aparición de síntomas y t = tiempo de transmisión. En la figura 2, se presenta la probabilidad de aparición de lesiones producidas por el virus de la leprosis, asociados con cada uno de los tiempos de transmisión del virus por ácaros *B. yothersi*.

Con base en el modelo desarrollado, se estableció entre 43,3 y 68,2 % el rango de probabilidad de aparición de lesiones de leprosis en plantas receptoras de *C. sinensis* para tiempos de transmisión entre 10 min y 24 h. De acuerdo al modelo ajustado, la probabilidad de aparición de síntomas se incrementa cuando el período de transmisión es mayor, especialmente luego de 24 horas. Para tiempos de transmisión entre 10 minutos y 6 horas, el porcentaje de plantas con lesiones de leprosis no aumenta de manera considerable (entre 43,3 y 49,6 %, respectivamente), mientras que a las 24 horas de transmisión, la probabilidad de aparición se incrementa hasta el 68,2 %. Los resultados permiten afirmar que el ácaro *B. yothersi* puede transmitir el virus de la leprosis de los cítricos con probabilidades superiores al 43,3 %, después de 10 minutos de permanencia sobre plantas sanas de naranja Valencia; cuando el ácaro infectado permanece durante de 24 horas sobre la planta receptora, las probabilidades de transmisión del virus se incrementan por encima de 62,5 %.

La prueba de detección molecular RT-PCR para *CiLV-C2*, sobre lesiones de leprosis en hojas de *C. sinensis* expuestas a diferentes períodos de transmisión del virus, resultó positiva para tiempos de transmisión de 20 min a 6 h, pero no amplificó para los tratamientos de 10, 30 min y 24 h. Esto se explica porque fueron utilizados iniciadores específicos para detección de *CiLV-C2* y por tanto no se logró diagnosticar otros virus que pudieron producir lesiones de leprosis en las plantas receptoras; dichos tipos de virus pudieron ser el *CiLV-N*, el *CiLV-C* o el *HGSV*, los cuales no habían sido detectados antes de la presente investigación; de igual manera, posteriormente a este estudio, también se comprobó infección mixta por más de un virus de leprosis (*CiLV-2* y *CiLV-N*) en plantas de *C. sinensis* y en ácaros *B. yothersi* en Colombia (Roy *et al.* 2014; Roy *et al.* 2015).

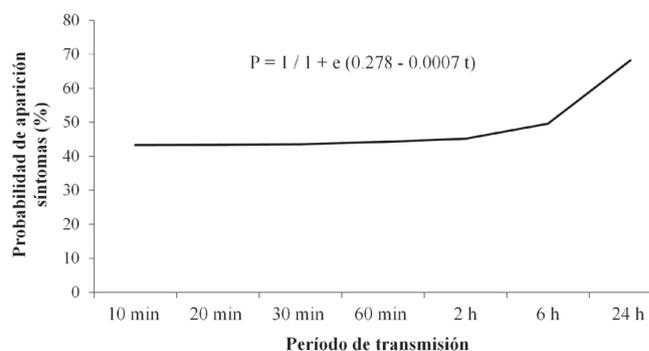


Figura 2. Probabilidad estimada de aparición de síntomas del virus de la leprosis de los cítricos en plantas de *C. sinensis* receptoras, en función del período de transmisión.

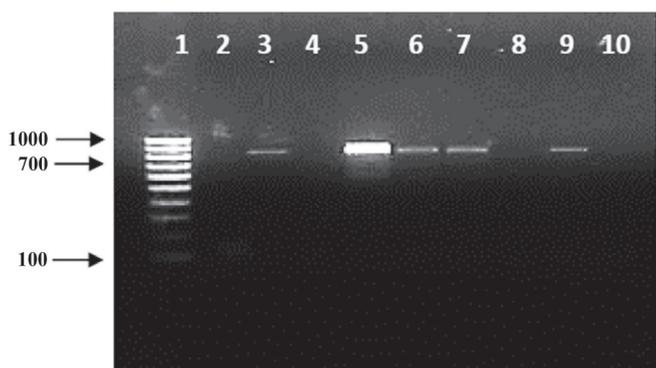


Figura 3. Detección de *CiLV-C2* en hojas de *C. sinensis* expuestas a diferentes períodos de transmisión. 1: Marcador de peso molecular “hyperladder IV”; 2: 10 min; 3: 20 min; 4: 30 min; 5: 60 min; 6: 2 h; 7: 6 h; 8: 24 h; 9: Control positivo; 10: Control negativo.

En la figura 3, se muestra el gel de agarosa 1 % de los siete períodos de transmisión evaluados y se observa amplificación positiva para *CiLV-C2* en las líneas 3, 5, 6, y 7 que representan los tratamientos con períodos de acceso para inoculación de 20 min, 60 min, 2 h y 6 h.

El diagnóstico molecular por RT-PCR para detección del *CiLV-C2* en ácaros *B. yothersi*, resultó positivo para las muestras de los mismos cuatro tratamientos que amplificaron en hojas, lo cual permite aseverar que los ácaros que lograron adquirir el virus, consiguieron la transmisión efectiva del *CiLV-C2* después de 20 minutos en período de transmisión (Fig. 4).

Los primeros síntomas de leprosis en hojas receptoras de *C. sinensis*, aparecen entre 14 y 32 días después de la transmisión del virus, luego de ser expuestas a ácaros *B. yothersi* con períodos de transmisión entre 10 minutos y 24 horas. El análisis estadístico sobre la variable dependiente días de aparición de síntomas, no mostró diferencias significativas al efectuar la prueba de Tukey con nivel de significancia del 95 % ($\alpha = 0,05$). Estas observaciones, sobre el tiempo de aparición de los primeros síntomas, amplían lo afirmado por Locali *et al.* (2006), quienes registran aparición de síntomas entre los 17 y 21 días. Otros autores (Knorr 1968; Freitas-Astua *et al.* 2004) reportan que los síntomas iniciales se pueden observar entre los 17 a los 60 días.

Porcentaje de población virulífera. Al efectuar el diagnóstico molecular mediante técnica RT-PCR, sobre 10 poblaciones de 50 ácaros *B. yothersi*, expuestos a un período de tres días de adquisición del complejo *CiLV*, se obtuvo que cuatro grupos (G3, G4, G5 y G10) resultaron positivos al *CiLV-C2* (líneas 4, 5, 6 y 11) (Fig. 5).

Este resultado de detección molecular para *CiLV-C2*, significa que del total de una población de ácaros *B. yothersi* que ha permanecido alimentándose durante tres días sobre hojas de *C. sinensis* con lesiones de leprosis, únicamente el 40 % adquiere el *CiLV-C2*. Los resultados complementan las observaciones de Rodrigues y Childers (2013), quienes encontraron que los porcentajes de transmisión para hembras adultas de *B. phoenicis* no superan el 11 %. Otros autores como Chagas *et al.* (1983) y Chiavegato (1996) reportaron porcentajes de transmisión cercanos al 8 %. La detección molecular del virus en el 40 % de la población de ácaros *B. yothersi*, contribuye a explicar lo observado por Bassanezi y Laranjeira (2007), quienes al estudiar la distri-

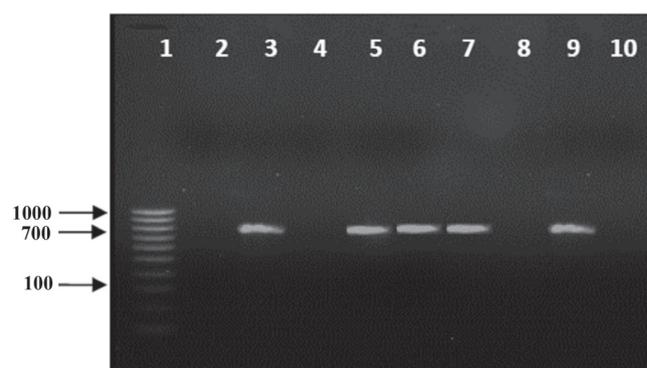


Figura 4. Detección del *CiLV-C2* en ácaros *B. yothersi* con período de adquisición de 48 h y diferentes períodos de transmisión. 1: Marcador de peso molecular “hyperladder IV”; 2: 10 min; 3: 20 min; 4: 30 min; 5: 60 min; 6: 2 h; 7: 6 h; 8: 24 h; 9: Control positivo; 10: Control negativo.

bución espacial del *CiLV* y su vector *B. phoenicis* en focos de huertos de cítricos encontraron muy baja correlación entre la enfermedad y el ácaro vector, debido a que solamente parte de la población es portadora del virus.

Kubo *et al.* (2011), manifiestan que la detección del *CiLV* en ácaros se debe utilizar como un instrumento importante para entender las relaciones entre virus y vector, así como para el monitoreo y diagnóstico del virus antes de la aparición de la enfermedad; por ello, los resultados de este estudio sobre la detección del *CiLV-C2* en poblaciones del ácaro, así como los tiempos de adquisición, transmisión y la eficiencia de transmisión del virus por *B. yothersi*, aportan bases útiles para el futuro manejo del virus y su vector.

Conclusiones

El ácaro *Brevipalpus yothersi* Baker (Acari: Tenuipalpidae), adquiere el virus de la leprosis de los cítricos (*CiLV-C2*), después de 30 minutos de alimentación sobre hojas de naranjo Valencia (*Citrus sinensis* L.) con lesiones de leprosis, de acuerdo a los períodos de acceso para adquisición del virus evaluados en este estudio. El ácaro *B. yothersi* puede transmitir el virus de la leprosis de los cítricos (*CiLV-C2*), después de 10 minutos de período de acceso para inoculación del virus sobre hojas de *C. sinensis* y de acuerdo a la sintomatología encontrada en hojas, los porcentajes de transmisión podrían variar entre 43,3 % y 68,2 %. De acuerdo a pruebas RT-PCR para detección en ácaros, se encontró que

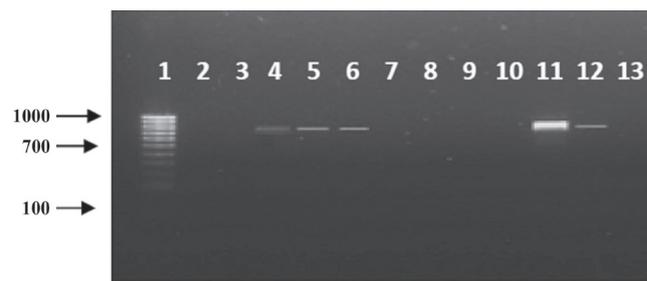


Figura 5. Detección del *CiLV-C2* para diez poblaciones de ácaros *B. yothersi*. 1: Marcador de peso molecular “hyperladder IV”; 2: G1; 3: G2; 4: G3; 5: G4; 6: G5; 7: G6; 8: G7; 9: G8; 10: G9; 11: G10; 12: Control positivo; 13: Control negativo.

el 40 % de una población de ácaros *B. yothersi* adquiere el virus de la leprosis de los cítricos (*CiLV-C2*), es decir se convierte en virulífera, luego de tres días de adquisición sobre hojas de *C. sinensis* con lesiones de leprosis. Los resultados del presente estudio proporcionan bases técnico científicas para ampliar el conocimiento de las interacciones que suceden con el virus de la leprosis de los cítricos y su vector *B. yothersi*, lo cual es fundamental para la formulación y ejecución de programas de prevención y manejo de la enfermedad en el país.

Literatura citada

- ALVES, B.; CASARIN, N.; OMOTO, C. 2005. Dispersal mechanisms of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) in citrus groves. *Neotropical Entomology* 34 (1) 89-96.
- ARAYA G. J. 2000. Informe sobre la prospección de la "leprosis de los cítricos" en la zona fronteriza (Costa Rica – Panamá). Panamá: Ministerio de Agricultura y Ganadería. 5 p.
- BASSANEZI, R. B.; LARANJEIRA, F. F. 2007. Spatial patterns of leprosis and its mite vector in commercial citrus groves in Brazil. *Plant Pathology* 56: 97-106.
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A. 2006. The citrus leprosis pathosystem. *Summa Phytopathologica* 32 (3): 211-220.
- BASTIANEL, M.; BASSANEZI, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.; KUBO, K.; MACHADO, M. 2010. Citrus leprosis Centennial of an unusual mite - virus pathosystem. *Plant Disease* 94 (3): 284 -293.
- BEARD, J. J.; OCHOA, R.; BAUCHAN, G. R.; TRICE, M. D.; REDFORD, A.; WALTERS, T.; MITTER, C. 2015. Flat mites of the world. 2nd ed. Ft. Collins, CO, EEUU: Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA. <http://idtools.org/id/mites/flatmites/factsheet.php?name=%3Cem%3EBrevipalpus+yothersi%3C%2Fem%3E> [Fecha consulta: agosto 2015].
- BECERRA, H.; LÓPEZ, V.; MATHEUS, H.; BASTIDAS, A. 2007. Monitoreo de *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) vector de la leprosis de los cítricos en el Meta y Casanare. pp. 142. En: Resúmenes XXXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología Socolen.
- BOARETTO, M. A. C.; CHIAVEGATO L. G.; SILVA, C. D. A. 1993. Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. *Científica, São Paulo* 21 (2): 245-253.
- CABI/EPPO, 2013. Citrus leprosis virus C. [Distribution map]. Distribution maps of plant diseases, No. April. Wallingford, RU: CABI, Map 801 (Edition 2). <http://www.cabi.org/isc/abstract/20133161819>. [Fecha consulta: febrero 2014].
- CARVALHO M.; JEFERSON L.; SATO, M.; RAGA, A.; ARTHUR, V. 2008. Population dynamics of phytophagous and predaceous mites on coffee in Brazil, with emphasis on *Brevipalpus phoenicis*. *Experimental and Applied Acarology* 44 (4): 277-291.
- CASTILLO, I.; ZERMEÑO, L.; MENDEZ, W; OTERO-C., G.; FREITAS-ASTÚA, J.; LOCALI-F., E; DE MORAES, G.; CALEGARIO, R.; TASSI, A.; KITAJIMA, W. 2011. Confirmación de la presencia del citrus leprosis virus C (*CiLV-C*) in Southern Mexico. *Tropical Plant Pathology* 36 (6): 400-403.
- COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.; GALETTI, S.; ROSSETTI, V.; KITAJIMA, E. 1995. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. *Fitopatologia Brasileira* 20: 208-213.
- CHAGAS, C.; ROSSETTI, V. 1983. Transmission of leprosis symptoms by a grafting infected tissue. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IX. Riverside, Annals. Riverside: IOCV, p.70.
- CHAGAS, C.; ROSSETTI, V.; CHIAVEGATO, L. 1983. Influence of the biological cycle of *Brevipalpus phoenicis* on leprosis transmission. pp. 69. En: Annals IX Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside.
- CHIAVEGATO, L. 1996. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes em citros. *Laranja* 17 (1): 229-235.
- CHILDERS, C.; RODRIGUES, J.; DERRICK, K.; ACHOR, D.; FRENCH, J.; WELBOURN, W.; OCHOA, R.; KITAJIMA, E. 2003a. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. *Experimental and Applied Acarology* 30 (1-3): 181-202.
- CHILDERS, C.; FRENCH, J.; RODRIGUES, J. C. 2003b. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis*, and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): A review of their biology, feeding injury and economic importance. *Experimental and Applied Acarology* 30 (1-3): 5-28.
- FREITAS-ASTUA, J.; CAVALCANTE, M.; LOCALI, E.; ANTONIOLI, R.; DOMINGUES, A.; MACHADO, M. 2004. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. *Virus Reviews and Research* 9 (1): 246-247.
- FREZZI, M. 1940. La lepra explosiva del Naranja - Investigaciones realizadas por el laboratorio de patología de Bella Vista (Corrientes). *Bol. Frutas y Hortalizas. Min. Agr. La Nación. Buenos Aires*. 5. 16 p.
- GÓMEZ, E.; VARGAS, R.; RIVADAMEIRA, C.; LOCALI, E.; FREITAS-A., J.; ASTÚA, G.; RODRIGUES, J.; MESA C.; KITAJIMA, E. 2005. First report of citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz, Bolivia. *Plant Disease* 89 (6): 686.
- HARAMOTO, P. 1969. Biology and control of *Brevipalpus phoenicis*. Hawaii Agricultural Experimental Station Technical Bulletin, Mānoa 68: 1-63.
- KITAJIMA, E.; ALBERTI, G. 2014. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* Mites (Tenuipalpidae) economically important plant-virus vectors. - Part 7: Ultrastructural detection of cytoplasmic and nuclear types of *Brevipalpus* transmitted viruses. *Zoologica* 160: 174-192.
- KITAJIMA, E.; CHAGAS, C.; RODRIGUES, J. 2003. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. *Experimental and Applied Acarology* 30 (1-5): 135-160.
- KITAJIMA, E.; FERREIRA, P.; FREITAS-A., J.; MACHADO, M. 2004. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (*CiLV-N*) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. *Summa Phytopathologica* 30: 68.
- KNORR, L. 1968. Studies on the etiology of leprosis in citrus. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IV, Annals. Gainesville: IOCV, 1968, p.332-341
- KNORR, L.; DENMARK, H. 1970. Injury to citrus by the mite *Brevipalpus phoenicis*. *Journal of Economic Entomology* 63 (6): 1996-1998.
- KUBO, K.; NOVELLI, V.; BASTIANEL, M.; LOCALI-F., E.; ANTONIOLI-L. R.; MACHADO, M.; FREITAS-A., J. 2011. Detection of *Brevipalpus* transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR. *Experimental and Applied Acarology* 54: 33-39.
- LEÓN M., G. 2012. Current status of the citrus leprosis virus (*CiLV-C*) and its vector *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). *Agronomía Colombiana* 30 (2): 242-250. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99652012000200012&script=sci_arttext. [Fecha consulta: octubre 2014].
- LEÓN M., G. A.; KITAJIMA, E. W.; FREITAS A., J. 2006a. Diagnóstico y recomendaciones de manejo para la leprosis de los cítricos. *Boletín Técnico No. 47. CORPOICA-MADR. Villaviecenio*. 24 p.
- LEÓN, G.; FREITAS-A., J.; KITAJIMA, E. W.; MEZA, N. C. 2006b. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7 (2): 67-72.
- LEON M., G. A.; REALPE, C. E.; GARZON, P. A.; RODRIGUEZ, J. A.; MORENO P., M. G.; CHILDERS, C. C.; ACHOR, D.; FREITAS-ASTUA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R., SALARO-

- LI, R. B.; MESA C., N. C.; KITAJIMA, E. W. 2006c. Occurrence of Citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. American Phytopathological Society. Plant Disease, Disease Note 90 (5): 682.
- LEÓN, G.; ROY, A.; CHOUDHARY, N.; BRLANSKY, R. 2014. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo 2 citoplasmático (*CiLV-C2*) en los departamentos de Meta y Casanare. Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria 15 (2): 207-217.
- LOCALI, E.; FREITAS-A., J.; SOUZA, A.; TAKITA, M.; ASTÚA, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.; MACHADO, M. 2003. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. Plant Disease 87 (11): 1317-1321.
- LOCALI, E.; FREITAS-A., J.; MACHADO, M. 2004. Leprose dos citros: Biología e diagnóstico. Laranja 25 (1): 53-68.
- LOCALI, E.; FREITAS-A., J.; SOUZA, A.; TAKITA, M.; ASTÚA, G.; ANTONIOLI-L., R.; RODRIGUES, V.; TARGON, N.; MACHADO, M. 2006. Complete nucleotide sequence genomic organization and phylogenetic analysis of citrus leprosis virus cytoplasmic type. Journal of General Virology 87: 2721-2729.
- MADR (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL), ASOHOFrucOL 2002. Acuerdo de competitividad de la cadena productiva de los cítricos. Bogotá. 79 p.
- MAIA, O.; OLIVEIRA, C. 2002. Capacidade de colonização de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae) em cercas vivas, quebra-ventos e plantas daninhas. pp. 249. En: Resúmenes XIX Congreso Brasileiro de Entomologia
- MEJIA, L.; PANIAGUA, A.; CRUZ, N.; PORRAS, M.; PALMIERI, M. 2005. Citrus leprosis, disease that endangers plantations in Guatemala. pp. 17-19. En: Annals 2005 Annual Meeting of American Phytopathological Society, Caribbean Division.
- MUSUMECI, M.; ROSSETTI, V. 1963. Transmissão de sintomas de leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. Ciência e Cultura 15 (3): 228.
- NAPPO, 2005. Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. Sistema de Alerta Fitosanitaria. Detección de la leprosis en el estado de Chiapas, México. <http://www.pestalert.org/espanol/oprDetail.cfm?oprID=165>. [Fecha consulta: agosto 2012].
- NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; FREITAS-A., J.; KITAJIMA, E.; KUBO, K.; ANTONIOLI-L., R.; SCHONS, J.; MACHADO, M. 2007. Evidence suggesting that *Brevipalpus phoenicis*-Citrus leprosis virus interaction may not be of the circulative propagative type. Page 156 in: XII Conf. international organization of citrus virologists IOCV, 2007. Adana, Turquía.
- OLIVEIRA, C. 1996. Ácaro vector da leprose dos citros: aspectos biológicos. Laranja, Cordeirópolis 17 (1): 229-295.
- RODRIGUES, J. 2000. Relações patógeno-vetor-planta no sistema leprose dos citros. Tese (Doutorado em Ciências), Centro de Energia Nuclear na Agricultura -Universidade de São Paulo, Piracicaba. 168 p.
- RODRIGUES, J.; CHILDERS, C. 2013. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. Experimental and Applied Acarology 59: 165-175.
- RODRIGUES, J.; CHILDERS, C.; KITAJIMA, E.; MACHADO, M.; NOGUEIRA, N. 2001. Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. Laranja 22 (2): 412-423.
- RODRIGUES, J.; KITAJIMA, E.; CHILDERS, C.; CHAGAS, C. 2003. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. Experimental and Applied Acarology 30 (1-3): 161-179.
- RODRIGUES, J. C. V.; ZUNIGA REYES, J. A.; ACHOR, D. S.; CHILDERS, C. C.; KITAJIMA, E. W. 2007. Occurrence and distribution of citrus leprosis virus in Honduras. Plant Pathology 56 (2): 344.
- ROY, A.; CHOUDHARY, N.; LEON M., G.; SHAO, J.; GOVINDARAJULU, A.; ACHOR, D.; WEI, G.; PICTON, D. D.; LEVY, L.; NAKHLA, M. K.; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R. H. 2013. A novel virus of the genus Cilevirus causing symptoms similar to citrus leprosis. Phytopathology 103 (5): 488-500.
- ROY, A.; LEON M., G.; STONE, A. L.; SCHNEIDER, W. L.; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R. H. 2014. First Report of citrus leprosis virus nuclear type in sweet orange in Colombia. Plant Disease. Disease Notes 98 (8): 1162.
- ROY, A.; HARTUNG, J. S.; SCHNEIDER, W. L.; SHAO, J.; LEÓN, G.; MELZER, M. J.; BEARD, J. J.; OTERO-COLINA, G.; BAUCHAN, G. R.; OCHOA, R.; BRLANSKY, R. H. 2015. Role bending: complex relationships between viruses, hosts and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. Phytopathology 105 (7): 1013-1025.
- SAAVEDRA, F.; BERNAL, A.; CHILDERS, C.; KITAJIMA, E. 2001. First report of Citrus leprosis virus in Panama. Plant Disease. Disease Notes 85 (2): 228.
- SADANA, G. L.; KUMARI, M. 1991. Effect of temperature and relative humidity on the development of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). Journal of Insect Science 42: 157-159.
- SPEGAZZINI, C. 1920. Sobre enfermedades y hongos que afectan las plantas de agrrios en el Paraguay. Annales de la Sociedad Científica Argentina 90: 155-188.
- USDA. 2004. Targeting a threat to U.S. citrus mite-borne disease already has foothold in South America. <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/mar04/citrus0304.htm>; [Fecha consulta: febrero 2010].

Recibido: 6-abr-2016 • Aceptado: 22-sep-2017

Citación sugerida:

LEON M., G.; ROY, A.; CHOUDHARY, N.; BRLANSKY, 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. Julio - Diciembre 2017. ISSN 0120-0488.