



INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO ICA
SUBGERENCIA DE PROTECCIÓN VEGETAL
DIRECCIÓN TÉCNICA DE EPIDEMIOLOGÍA Y VIGILANCIA FITOSANITARIA

SOLICITUD DE MODIFICACIÓN DEL ESTATUS FITOSANITARIO

1. FECHA DE SOLICITUD:	Día: 14	Mes: 09	Año: 2022
2. MOTIVO DEL REPORTE	2.1. Nuevo reporte:	2.2. Actualización <input checked="" type="checkbox"/>	2.3. Corrección:

3. MOTIVO DE MODIFICACIÓN:

Mediante la ejecución del proyecto **Investigación básica y estratégica sobre virus de la leprosis de los cítricos (CiLVs), enfermedad cuarentenaria presente en Colombia**, se encontraron nuevas especies de plantas hospederas en Colombia positivas para los virus CiLV-C2 y CiLV-C2H. Adicionalmente se efectuaron diagnósticos de infecciones mixtas por CiLV-C2+CiLV-C2H.

La presencia de diferentes tipos de virus de la leprosis de los cítricos (CiLV-C2H y CiLV-C2) se detectó en 15 departamentos: Bolívar, Boyacá, Caldas, Casanare, Cundinamarca, Guajira, Guaviare, Magdalena, Meta, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima, Valle del Cauca y Vichada, lo cual demuestra la amplia diseminación de la enfermedad en el país.

El diagnóstico positivo de los virus CiLV-C2H y CiLV-C2 se realizó en especies botánicas que pertenecen a las familias *Apocynaceae*, *Heliconiaceae*, *Rosaceae*, *Araceae*, *Asparagaceae*, *Costaceae*, *Cycadaceae*, *Iridaceae*, *Malvaceae*, *Marantaceae*, *Orchidaceae*, *Passifloraceae*, *Rosaceae*, *Strelitziaceae* y *Zingiberaceae*, y constituyen primeros registros de detección de dichos tipos de CiLVs en las familias botánicas mencionadas. Se detectaron además infecciones mixtas por CiLV-C2H y CiLV-C2 presentes en una misma planta hospedera, lo cual ocurre en varias especies botánicas diferentes a cítricos. Las familias botánicas como *Rutaceae*, *Zingiberaceae* y *Orchidaceae*, presentaron la mayor incidencia para este tipo de infecciones mixtas.

4. COLECTORES

4.1. Nombres y Apellidos:	1 - Juan Carlos Campos P. 2 - Guillermo León M.	4	Ing. Agroforestal Ing. Agrónomo
4.3. Entidad:	AGROSAVIA	4.4. Cargo:	1 - Profesional de apoyo a la investigación 2 - Investigador PhD. Senior.
4.5. Teléfono:	3012141382	4.6. E-mail:	jcampos@agrosavia.co gleon@agrosavia.co

5.

5.1. Fecha de colecta:	Día: Varias colectas	Mes: N/A	Años: 2020 - 2021 - 2022
5.2. Nombre Científico:	Virus de la leprosis de los cítricos CiLV tipos: CiLV-C2; CiLV-C2H y Mixto CiLV-C2+CiLV-C2H		
5.3. Sinonimias:	CiLVs		
5.4. Nombre(s) común(es):	Virus de la leprosis de los cítricos.		
5.5. Clasificación taxonómica:	Familia: Rhabdoviridae. Género Cilevirus		
5.6. Estado en el cual la plaga se encontró haciendo daño:	Hojas		



INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO ICA
SUBGERENCIA DE PROTECCIÓN VEGETAL
DIRECCIÓN TÉCNICA DE EPIDEMIOLOGÍA Y VIGILANCIA FITOSANITARIA

SOLICITUD DE MODIFICACIÓN DEL ESTATUS FITOSANITARIO

5.7. Ubicación de recolección:

País:	Colombia	Deptos	Bolívar, Boyacá, Caldas, Casanare, Valle del Cauca, Cundinamarca, Guajira, Guaviare, Magdalena, Meta, Quindío, Risaralda, Santander, Tolima, Vichada
Ciudades y/o Municipios:	Sutamarchán, Margarita, Chinchiná, Yopal, Pradera, Viotá, Dibulla, San Jose del Guaviare, Zona Bananera, Granada, Santa Rosa de Cabal, Girón, Ibagué, La Primavera.		



INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO ICA
SUBGERENCIA DE PROTECCIÓN VEGETAL
DIRECCIÓN TÉCNICA DE EPIDEMIOLOGÍA Y VIGILANCIA FITOSANITARIA

SOLICITUD DE MODIFICACIÓN DEL ESTATUS FITOSANITARIO

5.8. Coordenadas (WGS 84):

Municipio	Latitud	Longitud	Tipo de virus Detectado	Especie Vegetal
Sutamarchán	5,620400	-73,620100	C2H, C2+C2H	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>
	5,620400	-73,620100	C, C+C2+C2H	<i>Canna indica</i>
Margarita	9,164073	-74,300824	C2H	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>
Chinchiná	4,058517	-73,467283	C2H, C-C2+C2H	<i>Swinglea glutinosa</i>
	4,058517	-73,467283	C2H, C+C2H	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>
Yopal	4,436683	-74,538300	C2, C2+C2H	<i>Citrus reticulata</i>
	5,377140	-72,416467	C2, C2+C2H	<i>Citrus sinensis</i>
	5,572494	-72,649122	C2+C2H	<i>Strelitzia reginae</i>
	5,576483	-72,642181	C2, C2+C2H	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>
	4,130337	-73,606105	C2+C2H	<i>Passiflora edulis</i>
	5,617497	-72,441986	C2+C2H	<i>Zingiber officinale</i>
	5,257064	-72,484988	C2+C2H	<i>Rosa sp</i>
	5,381301	-72,418403	C2	<i>Etingera elatior</i>
	4,436683	-74,538300	C2+C2H	<i>Solanum lycopersicum</i>
	5,575194	-72,576450	C2H	<i>Heliconia rostrata</i>
Pradera	3,400000	-76,233333	C2+C2H	<i>Alpinia purpurata</i>
	3,400000	-76,183333	C2+C2H	<i>Citrus limonia</i>
	3,414722	-76,233333	C2+C2H	<i>Dendrobium sp</i>
	3,414722	-76,233333	C2H	<i>Peristeria sp</i>
	3,414722	-76,233333	C2H	<i>Vanda sp</i>
	3,414722	-76,233333	C2H	<i>Stanhopea sp</i>
	3,414722	-76,233333	C2H, C2+C2H	<i>Brassia sp</i>
	3,414722	-76,237778	C+C2H	<i>Eriobotrya japonica</i>
	3,414722	-76,237778	C2H	<i>Cattleya sp</i>
Ginebra	3,723889	-76,265000	C2H	<i>Anthurium sp</i>
Quimbaya	4,750850	-75,776817	C2H, C+C2+C2H	<i>Dichorisandra sp</i>
Montenegro	4,674700	-75,773567	C2H, C2+C2H	<i>Calathea lutea</i>
Pereira	4,863167	-75,611117	C2, C2+C2H, C+C2+C2H	<i>Cycas spp</i>
Viotá	4,558517	-75,762217	C2+C2H	<i>Swinglea glutinosa</i>
Machetá	5,092200	-73,159500	C2+C2H	<i>Fatsia japonica</i>
Dibulla	11,19583	-73,404722	C2H	<i>Smilax sp</i>
Ventaquemada	3,893225	-73,996944	C2+C2H	<i>Hydrangea arborescens</i>
San Jose del Guaviare	2,570800	-72,638900	C2H	<i>Arundina graminifolia</i>
Zona Bananera	10,76991	-74,147583	C2H	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>
Granada	3,581230	-73,728110	C2H	<i>Phylodendron sp</i>
	3,490204	-73,693999	C2H	<i>Citrus reticulata</i>
	3,834478	3,834478	C2H, C2+C2H	<i>Citrus sinensis</i>
	3,562300	-73,727217	C2H	<i>Clusia rosea</i>
	3,581230	-73,728110	C2H	<i>Dieffenbachia sp</i>
	4,124917	-73,635667	C2, C2H, C2+C2H	<i>Etingera elatior</i>
	4,478900	-74,783917	C2, C2H	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>
	3,735833	-73,752800	C2H, C2+C2H	<i>Monstera sp</i>
	3,490516	-73,690676	C2H, C2+C2H	<i>Syngonium sp</i>
	4,478900	-74,783917	C2H, C2+C2H	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>
Acacias	3,956250	-73,787833	C2H, C2+C2H	<i>Costus sp</i>
Restrepo	5,139100	-74,159500	C2H	<i>Citrus x tangelo</i>
Santa rosa de Cabal	4,994633	-75,602283	C-C2+C2H	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>
	4,984217	-75,610750	C2H, C+C2+C2H	<i>Alocasia macrorrhiza</i>
Girón	6,992522	-73,168933	C2H	<i>Arundina graminifolia</i>
Ibagué	4,448500	-75,203700	C2H	<i>Lilium sp</i>
	4,449033	-75,203967	C2+C2H	<i>Nerium oleander</i>
	4,440883	-75,2043	C2, C2+C2H	<i>Etingera elatior</i>
Villavicencio	4,058517	-73,467283	C2H	<i>Aglaonema sp</i>
	4,120500	-73,627028	C2 - C2+C2H	<i>Cordyline sp</i>
La Primavera	5,215795	-70,430650	C2H	<i>Citrus sinensis</i>

5.9. Método(s) de identificación de Virus de la leprosis de los cítricos (CiLVs):

Parte de las muestras fueron analizadas molecularmente en los laboratorios de genética molecular de USDA-APHIS-PPQ-CPHST (United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service - Plant Protection and Quarantine - Center for Plant Health Science and Technology) Maryland, USA, mediante pruebas RT-qPCR, las cuales identificaron plantas infectadas con CiLV-C2 o CiLV-C2H o ambos virus en infección mixta en todos los géneros de plantas mencionados. Algunos de estos resultados se confirmaron en USDA mediante análisis bioinformáticos utilizando datos generados por High-Throughput Sequencing (HTS). Parte de las muestras fueron diagnosticadas en Colombia en el laboratorio de genética molecular de Agrosavia en el C.I. La Libertad bajo la siguiente metodología:

Diagnóstico en Colombia:

Recepción y conservación de muestras

El ingreso de muestras se registró en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación la Libertad para almacenamiento y embalaje según criterios de conformidad (cantidad, tejido fresco con síntomas presuntivos, conservación adecuada). Se les asignó un código con registro fotográfico y posteriormente fueron desinfectadas y lavadas con agua destilada estéril para su almacenamiento a a -80 °C para diagnóstico, envío a USDA y contramuestras. Las muestras conservadas a -80 °C para diagnóstico, combinaron cortes de tejido afectado y sano de aproximadamente 1 cm² que fueron macerados con Nitrógeno Líquido y almacenados en tubos eppendorf por triplicado hasta su procesamiento. Las muestras para envío a USDA fueron procesadas realizando cortes de tejido sano y afectado de aproximadamente 1 cm² que fueron dispuestos en tubos Falcon de 15 ml con sílica gel para su conservación, secado y envío. Las contramuestras se conservaron como hojas completas previamente secadas sobre sílica gel para su almacenamiento a largo a plazo en bolsas de papel a -80 °C.

Extracción de ARN viral a partir de tejido vegetal y ácaros

La extracción de RNA se realizó a partir de 0,1 gramos de tejido vegetal macerado con Nitrógeno líquido y a partir de 20 ácaros macerados con pistilo en buffer de lisis VB con previa incubación durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se siguió el protocolo del kit de extracción de ARN viral AccuPrep® de Bioneer, como se describe a continuación: 1). Adicionar 300 µl de buffer VB a la muestra según corresponda y mezclar con vórtex durante 10 segundos. 2). Incubar entre 56 - 60 ° C por 10 min. 3). Adicionar 300 µl de isopropanol, dar vórtex por 10 segundos. 4). Adicionar 100 µl de solución BST en las columnas amarillas para su activación, centrifugar por 30 segundos a 13,000 rpm. Descartar la solución y reutilizar la columna. 5). Transferir la muestra lisada a la columna amarilla y centrifugar a 8,000 rpm por 1 min. 6). Descartar la solución que atravesó el filtro y reutilizar la columna. 7). Adicionar 500 µl de Buffer VW1 a la columna, centrifugar por 1 min a 8,000 rpm. 8). Descartar la solución que atravesó el filtro y reutilizar la columna. 9). Adicionar 500 µl de Buffer RWA2, centrifugar por 1 min a 8,000 rpm. 10). Descartar la solución que atravesó el filtro y reutilizar la columna. 11). Centrifugar una vez más a 13,000 rpm por 1 min para remover el etanol completamente. 12). Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml para elusión, adicionar 50 µl de Buffer ER, incubar 1 minuto. Eluir por centrifugación a 8,000 rpm for 1 min. 13). Almacenar el ARN a -80 °C.



Fuente: <https://us.bioneer.com/pagecat1/accuprep/Viral-rna-extraction-kit?tab=technical>

La cuantificación de la calidad y concentración del ARN extraído fue determinada empleando un NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. La calidad de la extracción también fue determinada mediante amplificación del gen NADH como control de RNA total usando RT-qPCR.

SOLICITUD DE MODIFICACIÓN DEL ESTATUS FITOSANITARIO

Estandarización y diagnóstico viral mediante RT-qPCR

Según resultados de diagnóstico viral preliminar compartidos por USDA, se realizó la estandarización de condiciones para la multiplex RT-qPCR en tres contramuestras positivas para los virus CiLV-C2 y CiLV-C2H, con el objetivo de determinar y seleccionar los controles positivos para el diagnóstico molecular en Colombia. Todos los primers y sondas de trabajo (Tabla 1.) fueron reconstituidos y ajustados a una concentración de 18 Mm y 5 µM, respectivamente. Para la PCR múltiple se estandarizó un volumen final de 20 µl por reacción distribuidos de la siguiente manera: 5 µl de la enzima Reliance One-Step Multiplex Supermix, 1,8 µl de cada primer/sonda y 3 µl de agua grado molecular. Como control de RNA se usó el gen endógeno NADH marcado con FAM, y los primers con sondas para tres virus diferentes marcados con los fluoróforos HEX, Red610 y Quasar670. El gradiente de temperatura empleado para la estandarización comprendió 5 temperaturas (57°C, 58 °C, 59 °C, 60°C y 61 °C), a 58 °C se presentaron las mejores curvas de amplificación.

El programa RT-qPCR seleccionado y ajustado en un termociclador LightCycler® 96 (Roche Life Science), consistió en una preincubación a 50 °C por 10 min; una amplificación a 94 °C por 3 min; 45 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s y 72 °C por 40 s; un paso de enfriamiento de 72 °C por 5 min; y un enfriamiento final de 10 °C. Los controles positivos para los virus CiLV-C2 y CiLV-C2H comprendieron muestras de las familias *Zingiberacea* (Valle del Cauca) y *Orchidacea* (Meta), respectivamente.

Tabla 1. Primers empleados para el diagnóstico viral mediante RT-qPCR en laboratorios de Biología moléculas AGROSAVIA- C.I. La Libertad

Virus	Secuencia forward	Secuencia reverse	Sonda	Fluoróforo
CiLV				
Citrus leprosis virus C (CiLV-C)	CiLV-C-F: GCGTATTGGCGTTGGAT TTC	CiLV-C-R: AGCTTTACGGTTTATG AACCCA	CiLV-C-p: ACCGAACGATATGATTT CTCGTTTGG	5' CAL Fluor Red 610/3' BHQ-2
Citrus leprosis virus nuclear (CiLV-N)	OFV-Cit1-F1: GTGATGATCTCAAGGCA ACTCT	OFV-Cit1-R1: CATGCTGAAGGATCA GGAATCT	CiLV-N-p1: TAGCAGATGAAACGCAC CACACCA	(5' FAM/3' BHQ-1)
Citrus leprosis virus cytoplasmic type 2 (CiLV-C2H)	mCiLV-C2H-F: TCCTACTCCTCAACAGG CACAAAATTA	mCiLV-C2H-qR: CCAGCTACAGCAACA CGACG	CiLV-C2H-p: CGGCTCCACCGCAGATA GGTTTAC	(5' HEX/3' BHQ-1)
Citrus leprosis virus C2 (CiLV-C2)	C2CiLVF4737: TGAGAACTATTTGAGTC GACTGGATAC	C2CiLVR4852: AACTTCCTTCGCAAC GAGTCA	C2CiLVp4815: CCAATGATATTGTCGTTT GTCCGACGG	(5' Quasar 670/3' BHQ-2)
Orchid fleck dichorhavirus	OFV-Cit2-F1: GGAGGCACTTCACTCTC TTAAC	OFV-Cit2-R1: CAGAACCTGTGCGGAT CCATTT	CiLV-N2p1: ACCGGGTCAGCTACTAA CATGGCTA	(5' Quasar 705/3' BHQ-2)
NADH dehydrogenase (Nad5)	3NAD5F: GGAGGGTCCCCTCCAG TAT	145NAD5R: AGGAATGACGTCGTA GCTCC	27NAD5-p: ACCCACCTACGGCTTTG ATT	(5' FAM/3' BHQ-1)

*Secuencias de primers compartidas por USDA.

Los resultados para las muestras positivas fueron determinados con base en las curvas de amplificación presentadas mediante el diagnóstico con RT-qPCR (Figura 1). Los parámetros seleccionados para las muestras positivas fueron un Cq o ciclo de amplificación inferior a 40 (eje x en las gráficas) y una fluorescencia (EPF) emitida (eje y de las gráficas) superior a 0.2, y según controles positivos para los virus CiLV-C2 y CiLV-C2H correspondientes a las muestras número 72 y 53 (Laboratorio Genética molecular Agrosavia-C.I. La Libertad) de las familias botánicas *Zingiberaceae* y *Orchidaceae*.

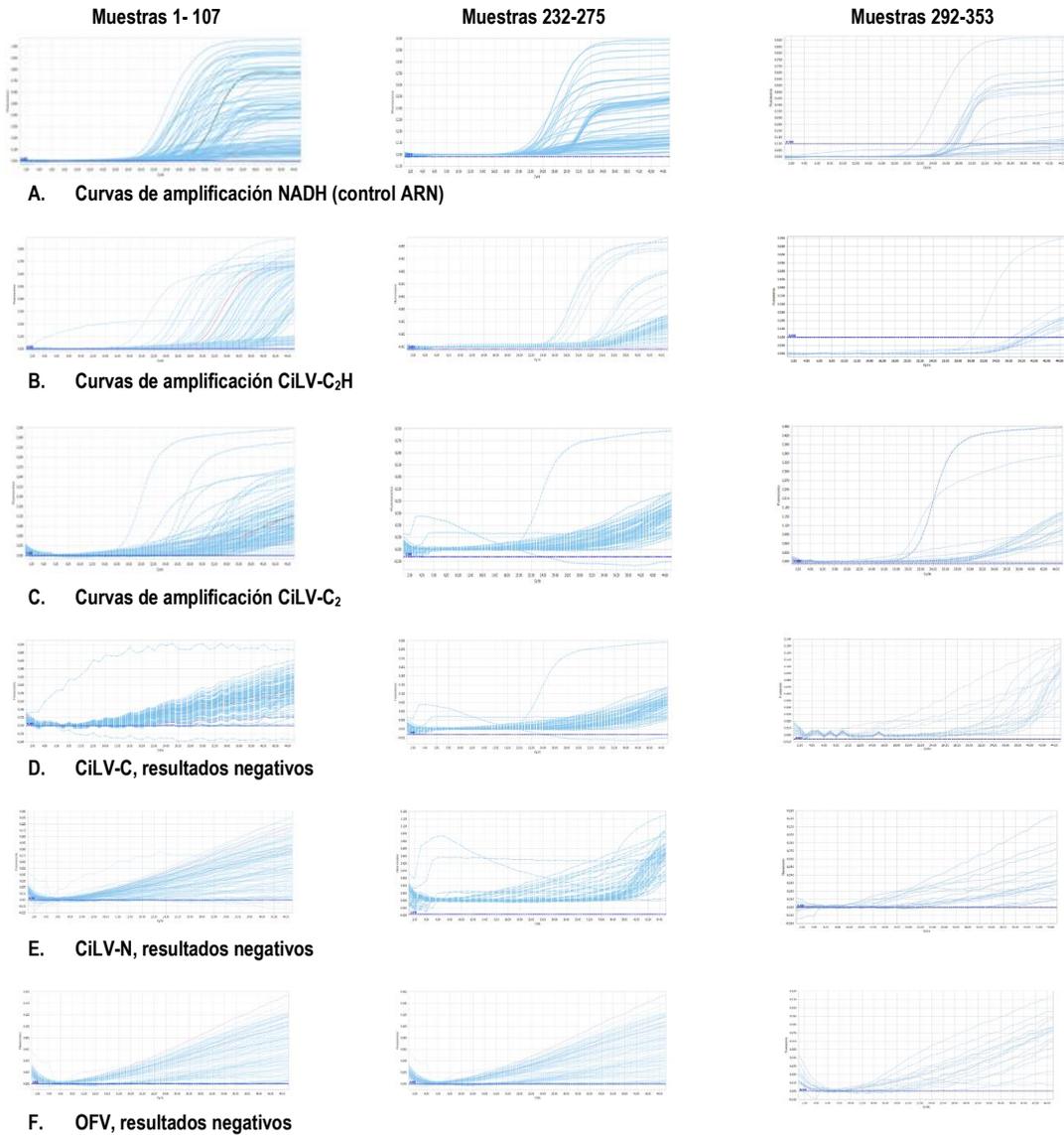
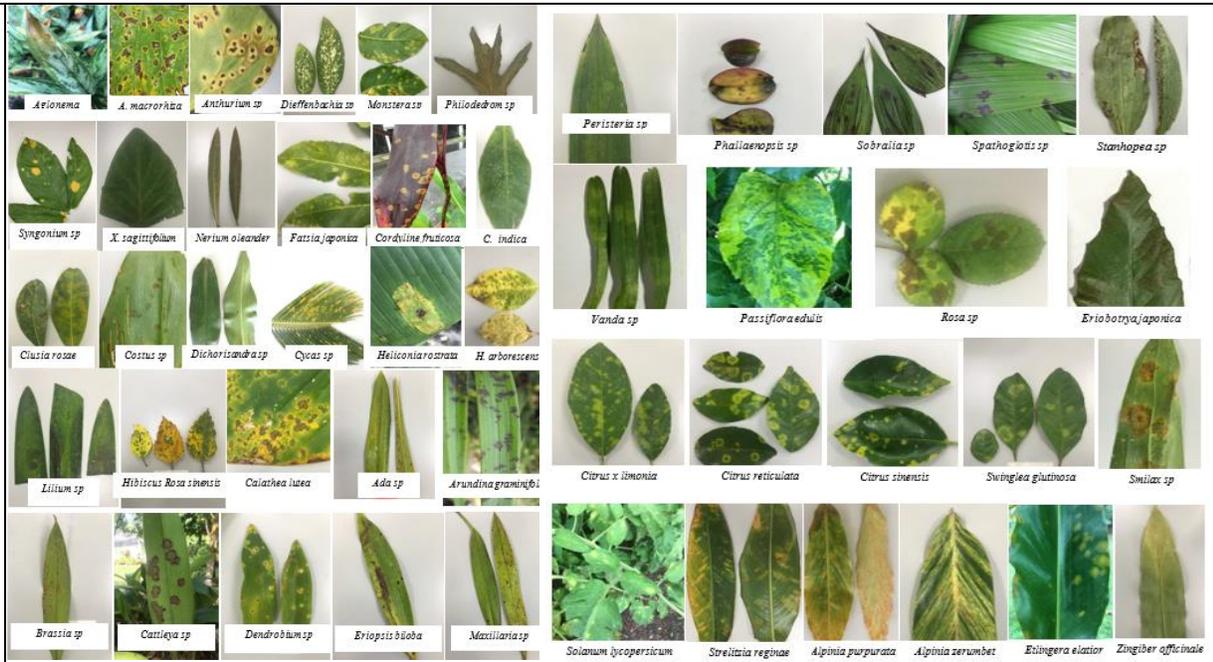


Figura 1. Gráficas de amplificación obtenidas mediante RT-qPCR para las muestras analizadas

5.10. Registro fotográfico:



5.11. Identificador:	Nombres y Apellidos:	Avijit Roy. Alejandra Guevara Castro. Guillermo León M.		
	Teléfono:		E-mail:	gleon@agrosavia.co ; avijit.roy@usda.gov
5.12. Verificador:	Nombres y Apellidos:	Avijit Roy		
	Teléfono:		E-mail:	avijit.roy@usda.gov

6. HOSPEDANTE SOBRE EL CUAL SE RECOLECTÓ EL ESPÉCIMEN O MUESTRA
 (La información consignada en esta sección debe ser relacionada específicamente con su investigación)

<p>6.1. Nombre científico:</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Familia</th> <th>Nombre Científico</th> <th>Familia</th> <th>Nombre Científico</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Araceae</td> <td><i>Aglaonema sp</i></td> <td>Orchidaceae</td> <td><i>Ada sp</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Alocasia macrorhiza</i></td> <td></td> <td><i>Arundina graminifolia</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Anthurium sp</i></td> <td></td> <td><i>Brassia sp</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Dieffenbachia sp</i></td> <td></td> <td><i>Cattleya sp</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Monstera sp</i></td> <td></td> <td><i>Dendrobium sp</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Philodendron sp</i></td> <td></td> <td><i>Eriopsis biloba</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Syngonium sp</i></td> <td></td> <td><i>Maxillaria sp</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td><i>Xanthosoma sagittifolium</i></td> <td></td> <td><i>Peristeria sp</i></td> </tr> <tr> <td>Apocynaceae</td> <td><i>Nerium oleander</i></td> <td></td> <td><i>Phallaenopsis sp</i></td> </tr> <tr> <td>Araliaceae</td> <td><i>Fatsia japonica</i></td> <td></td> <td><i>Sobralia sp</i></td> </tr> <tr> <td>Asparagaceae</td> <td><i>Cordyline fruticosa</i></td> <td></td> <td><i>Spathoglottis sp</i></td> </tr> <tr> <td>Cannaceae</td> <td><i>Canna indica</i></td> <td></td> <td><i>Stanhopea sp</i></td> </tr> <tr> <td>Clusiaceae</td> <td><i>Clusia rosea</i></td> <td></td> <td><i>Vanda sp</i></td> </tr> <tr> <td>Costaceae</td> <td><i>Costus sp</i></td> <td>Passifloraceae</td> <td><i>Passiflora edulis</i></td> </tr> <tr> <td>Commelinaceae</td> <td><i>Dichorisandra sp</i></td> <td>Rosaceae</td> <td><i>Rosa sp</i></td> </tr> <tr> <td>Cycadaceae</td> <td><i>Cycas spp</i></td> <td></td> <td><i>Eriobotrya japonica</i></td> </tr> <tr> <td>Heliconiaceae</td> <td><i>Heliconia rostrata</i></td> <td>Rutaceae</td> <td><i>Citrus x tangelo</i></td> </tr> <tr> <td>Hydrangeaceae</td> <td><i>Hydrangea arborescens</i></td> <td></td> <td><i>Citrus x limonia</i></td> </tr> <tr> <td>Iridaceae</td> <td><i>Lilium spp</i></td> <td></td> <td><i>Citrus reticulata</i></td> </tr> <tr> <td>Malvaceae</td> <td><i>Hibiscus Rosa-sinensis</i></td> <td></td> <td><i>Citrus sinensis</i></td> </tr> <tr> <td>Marantaceae</td> <td><i>Calathea lutea</i></td> <td></td> <td><i>Swinglea glutinosa</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Smilacaceae</td> <td><i>Smilax sp</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Solanaceae</td> <td><i>Solanum lycopersicum</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Strelitziaceae</td> <td><i>Strelitzia reginae</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Zingiberaceae</td> <td><i>Alpinia purpurata</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td><i>Alpinia zerumbet</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td><i>Etingera elatior</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td><i>Zingiber officinale</i></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td><i>Zingiber zerumbet</i></td> </tr> </tbody> </table>	Familia	Nombre Científico	Familia	Nombre Científico	Araceae	<i>Aglaonema sp</i>	Orchidaceae	<i>Ada sp</i>		<i>Alocasia macrorhiza</i>		<i>Arundina graminifolia</i>		<i>Anthurium sp</i>		<i>Brassia sp</i>		<i>Dieffenbachia sp</i>		<i>Cattleya sp</i>		<i>Monstera sp</i>		<i>Dendrobium sp</i>		<i>Philodendron sp</i>		<i>Eriopsis biloba</i>		<i>Syngonium sp</i>		<i>Maxillaria sp</i>		<i>Xanthosoma sagittifolium</i>		<i>Peristeria sp</i>	Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i>		<i>Phallaenopsis sp</i>	Araliaceae	<i>Fatsia japonica</i>		<i>Sobralia sp</i>	Asparagaceae	<i>Cordyline fruticosa</i>		<i>Spathoglottis sp</i>	Cannaceae	<i>Canna indica</i>		<i>Stanhopea sp</i>	Clusiaceae	<i>Clusia rosea</i>		<i>Vanda sp</i>	Costaceae	<i>Costus sp</i>	Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i>	Commelinaceae	<i>Dichorisandra sp</i>	Rosaceae	<i>Rosa sp</i>	Cycadaceae	<i>Cycas spp</i>		<i>Eriobotrya japonica</i>	Heliconiaceae	<i>Heliconia rostrata</i>	Rutaceae	<i>Citrus x tangelo</i>	Hydrangeaceae	<i>Hydrangea arborescens</i>		<i>Citrus x limonia</i>	Iridaceae	<i>Lilium spp</i>		<i>Citrus reticulata</i>	Malvaceae	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>		<i>Citrus sinensis</i>	Marantaceae	<i>Calathea lutea</i>		<i>Swinglea glutinosa</i>			Smilacaceae	<i>Smilax sp</i>			Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>			Strelitziaceae	<i>Strelitzia reginae</i>			Zingiberaceae	<i>Alpinia purpurata</i>				<i>Alpinia zerumbet</i>				<i>Etingera elatior</i>				<i>Zingiber officinale</i>				<i>Zingiber zerumbet</i>
Familia	Nombre Científico	Familia	Nombre Científico																																																																																																																						
Araceae	<i>Aglaonema sp</i>	Orchidaceae	<i>Ada sp</i>																																																																																																																						
	<i>Alocasia macrorhiza</i>		<i>Arundina graminifolia</i>																																																																																																																						
	<i>Anthurium sp</i>		<i>Brassia sp</i>																																																																																																																						
	<i>Dieffenbachia sp</i>		<i>Cattleya sp</i>																																																																																																																						
	<i>Monstera sp</i>		<i>Dendrobium sp</i>																																																																																																																						
	<i>Philodendron sp</i>		<i>Eriopsis biloba</i>																																																																																																																						
	<i>Syngonium sp</i>		<i>Maxillaria sp</i>																																																																																																																						
	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>		<i>Peristeria sp</i>																																																																																																																						
Apocynaceae	<i>Nerium oleander</i>		<i>Phallaenopsis sp</i>																																																																																																																						
Araliaceae	<i>Fatsia japonica</i>		<i>Sobralia sp</i>																																																																																																																						
Asparagaceae	<i>Cordyline fruticosa</i>		<i>Spathoglottis sp</i>																																																																																																																						
Cannaceae	<i>Canna indica</i>		<i>Stanhopea sp</i>																																																																																																																						
Clusiaceae	<i>Clusia rosea</i>		<i>Vanda sp</i>																																																																																																																						
Costaceae	<i>Costus sp</i>	Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i>																																																																																																																						
Commelinaceae	<i>Dichorisandra sp</i>	Rosaceae	<i>Rosa sp</i>																																																																																																																						
Cycadaceae	<i>Cycas spp</i>		<i>Eriobotrya japonica</i>																																																																																																																						
Heliconiaceae	<i>Heliconia rostrata</i>	Rutaceae	<i>Citrus x tangelo</i>																																																																																																																						
Hydrangeaceae	<i>Hydrangea arborescens</i>		<i>Citrus x limonia</i>																																																																																																																						
Iridaceae	<i>Lilium spp</i>		<i>Citrus reticulata</i>																																																																																																																						
Malvaceae	<i>Hibiscus Rosa-sinensis</i>		<i>Citrus sinensis</i>																																																																																																																						
Marantaceae	<i>Calathea lutea</i>		<i>Swinglea glutinosa</i>																																																																																																																						
		Smilacaceae	<i>Smilax sp</i>																																																																																																																						
		Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>																																																																																																																						
		Strelitziaceae	<i>Strelitzia reginae</i>																																																																																																																						
		Zingiberaceae	<i>Alpinia purpurata</i>																																																																																																																						
			<i>Alpinia zerumbet</i>																																																																																																																						
			<i>Etingera elatior</i>																																																																																																																						
			<i>Zingiber officinale</i>																																																																																																																						
			<i>Zingiber zerumbet</i>																																																																																																																						
<p>6.2. Sinonimias:</p>	<p>N/A</p>																																																																																																																								
<p>6.3. Nombre(s) común(es):</p>																																																																																																																									
<p>6.4. Estado de desarrollo del hospedante:</p>	<p>Estado de la planta: Desarrollo vegetativo y producción.</p>																																																																																																																								
<p>6.5. Tipo de sistema productivo o área: (marcar con X)</p>	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>Cultivo comercial bajo invernadero</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cultivo comercial a libre exposición</td> <td>X</td> </tr> <tr> <td>Cultivo o área abandonada</td> <td>X</td> </tr> <tr> <td>Traspatio o plantas aisladas (1 a 5 plantas sin fines comerciales ni manejo agronómico)</td> <td>X</td> </tr> <tr> <td>Bosques, reservas y parques naturales</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Planta empacadora o área de poscosecha</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Producto almacenado</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Plantas en bordes de vías, parques y jardines caseros.</td> <td>X</td> </tr> </tbody> </table>	Cultivo comercial bajo invernadero		Cultivo comercial a libre exposición	X	Cultivo o área abandonada	X	Traspatio o plantas aisladas (1 a 5 plantas sin fines comerciales ni manejo agronómico)	X	Bosques, reservas y parques naturales		Planta empacadora o área de poscosecha		Producto almacenado		Plantas en bordes de vías, parques y jardines caseros.	X																																																																																																								
Cultivo comercial bajo invernadero																																																																																																																									
Cultivo comercial a libre exposición	X																																																																																																																								
Cultivo o área abandonada	X																																																																																																																								
Traspatio o plantas aisladas (1 a 5 plantas sin fines comerciales ni manejo agronómico)	X																																																																																																																								
Bosques, reservas y parques naturales																																																																																																																									
Planta empacadora o área de poscosecha																																																																																																																									
Producto almacenado																																																																																																																									
Plantas en bordes de vías, parques y jardines caseros.	X																																																																																																																								
<p>6.6. Parte de la planta afectada:</p>	<p>Hojas</p>																																																																																																																								
<p>6.7. Descripción de síntomas y signos: (Anexar registro fotográfico)</p>	<p>Halos irregulares amarillos con centro necrosado de alrededor de un centímetro de diámetro en hojas.</p>																																																																																																																								

7. OTRA INFORMACIÓN RELACIONADA

7.1. Cómo se realizó la colecta de la plaga identificada:
(ejemplo: Frutos caídos, Muestras de suelo, Trampas):

En hojas de plantas con posibles lesiones de leprosis de los cítricos CiLV

7.2. Muestreo:
(marcar con X)

Muestreo exploratorio	<input type="checkbox"/>
Muestreo sistemático	<input type="checkbox"/>
Otro ¿Cuál? Muestreo aleatorio simple_____	X

7.2.1. Metodología empleada:

Se realizaron muestreos al azar en huertos cítricos, árboles cítricos de patio, plantas hospederas del virus como *Hibiscus* sp., *Dieffenbachia* sp., entre otras, así como en cercas vivas (*S. glutinosa*), palmáceas, herbáceas, ornamentales, flores y orquídeas, en busca de hojas con síntomas de leprosis de los cítricos. Las muestras de tejido vegetal con posibles lesiones de leprosis se colectaron en bolsas de cierre hermético Ziploc. Parte de las muestras vegetales recolectadas se procesaron, codificaron y enviaron a los laboratorios de USDA-APHIS-PPQ-CPHST Maryland, USA, mediante permiso USDA-APHIS de acuerdo al convenio y a la demanda de dicho laboratorio, para la optimización y desarrollo del protocolo de la técnica de secuenciación de múltiples productos amplificados de PCR y "Next Generation" (secuenciación de nueva generación) para la detección de CiLVs, utilizando tejido de plantas afectadas recolectadas en Colombia; otra parte de las muestras fueron utilizadas en el laboratorio de biotecnología de Agrosavia en el C.I. La Libertad, en donde a partir del tejido vegetal se realizaron los análisis moleculares RT-qPCR para detección de virus CiLV-C; CiLV-C2 y CiLV-C2H.

7.3. Colección biológica de referencia donde se depositó el espécimen, la cual debe estar registrada ante el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (Decreto 1375 de 2013 "Por la cual se reglamentan las colecciones biológicas"):

N/A

7.4. Información adicional: Estos registros son resultado de investigación del proyecto: " Investigación básica y estratégica sobre virus de la leprosis de los cítricos (CiLVs), enfermedad cuarentenaria presente en Colombia", como parte del convenio entre USDA - AGROSAVIA 19-8130-0815-CA con código interno Agrosavia ID 1000820, el cual estuvo enmarcado dentro del Macroproyecto "Investigación y Desarrollo de tecnologías sostenibles para el mejoramiento de los sistemas productivos de cítricos en Colombia".

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y SOPORTES DIGITALES

Se anexa el informe final del convenio USDA – AGROSAVIA

Toda la metodología empleada se encuentra en el siguiente manuscrito sometido y aprobado para publicación en *Frontiers in plant science*:

Chellappan Padmanabhan, Schyler Nunziata, Leon M. Guillermo, Rivera Yazmin, Mavrodieva Vessela A., Nakhla Mark K., Roy Avijit. (2022- EN PRENSA). **High-Throughput Sequencing application in the detection and discovery of viruses associated with the regulated Citrus leprosis disease complex.** *Frontiers in plant science*. Aprobado por *Frontiers of plant science Journal*. Dic. 2022. (Anexo)

Bibliografía adicional relacionada con el tema:

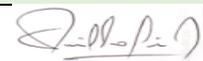
- Freitas, J.; Kitajima, E.; Locali, E.; Antonioli, L.; Bastianel M.; Machado, M. 2005. Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. pp. 93. En: Annals XLV Annual Meeting of the American Phytopathological Society (APS). Caribbean Division. San Jose.
- Guerra-M, Keremane M, Brlansky R, Lee R. 2007. Citrus leprosis symptoms can be associated with the presence of two different viruses: Cytoplasmic and Nuclear, the Former Having a Multipartite RNA Genome. International Organization of Citrus Virologists Proceedings, 16th Conference, Pgs. 230-239.
- Lenis, B.; Angel, J. (2010). Evaluación de iniciadores para la detección del virus de la leprosis de los cítricos mediante la técnica Transmisión Reversa Reacción en Cadena de La Polimerasa. Universidad Francisco de Paula Santander. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. 134 p.
- León, G. 2012. Current status of the citrus leprosis virus (CiLV-C) and its vector *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). *Agronomía Colombiana*. 30 (2) 242 - 250.
- León, G. 2013. Eficiencia de transmisión del virus de la leprosis de los cítricos CiLV-C por ácaros vectores *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) en Colombia. Universidad Nacional de Colombia-Facultad de Ciencias Agrarias, sede Bogotá. Tesis Doctoral.
- León, G., Becerra, H.; Salarolli R.; Kitajima, E. 2008. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus Cytoplasmic type (CiLV-C) in Colombia. *American Phytopathological Society. APS. Plant Disease, Disease Note* 92 (9) 1364.
- León, G., Kitajima E.; Freitas, J.; Childers, C.; Achor, D.; Salarolli R.; Mesa, N. 2006. Occurrence of Citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. *American Phytopathological Society. Plant Dis. Note*. 90(5), 682.
- León, G., Kitajima, E., Freitas, A., Machado, M., Mesa, N. 2006a. Detección del virus de la leprosis de los cítricos tipo citoplasmático en los Llanos Orientales de Colombia. *Rev. Corpoica* 7(2), 67-72.
- Melzer, M.J., Simbajon, N., Carillo, J., Borth, W.B., Freitas-Astúa, J., Kitajima, E.W., Neupane, K.R., Hu, J.S. 2013. A *cilevirus* infects ornamental hibiscus in Hawaii. 2013. *Archives of Virology* 158: 2421-2424.
- Melzer, MJ, Sether, DM, Borth, WB, and Hu, JS. 2012. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. *Phytopathology* 102:122-127.
- Roy A, Hartung J, Schneider W, Shao J, León G, Melzer M, Beard J, Otero-Colina G, Bauchan G, Ochoa R, Brlansky R. 2015. Role Bending: Complex Relationships Between Viruses, Hosts, and Vectors Related to Citrus Leprosis, an Emerging Disease. *Phytopathology* 105 (7): 1013-1025.
- Roy, A., Choudhary, N., León, G., Shao, J., Govindarajulu, A., Achor, D., Wei, G., Picton, D., Levy, L., Nakhla, M., Hartung, J. and Brlansky, R. 2013. A Novel Virus of the Genus *Cilevirus* Causing Symptoms Similar to Citrus Leprosis. *Phytopathology*. 103 (5) 488 – 500.
- Roy, A., León, G., Hartung, J., Stone A., Schneider, W., Brlansky, R. 2014. First Report of Citrus leprosis virus Nuclear Type in Sweet Orange in Colombia. *Plant Disease* 98 (8) 1162 – 1163.
- Roy, A., Stone, A., León, G., Hartung, J., Wei G., Mavrodieva, V., Nakhla, M., Schneider, W., Brlansky, R. 2018. First Report of Hibiscus-infecting *cilevirus* in Citrus *sinensis* in Meta and Casanare, Colombia. *Plant Disease* 102 (8) 1675-1676 <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0150-PDN>

9. RESPONSABLE(S) DEL REPORTE

Para que la información pueda ser validada por la Dirección Técnica de Epidemiología y Vigilancia Fitosanitaria, este formato debe contar con los datos y firma del responsable(s).

Guillermo León Martínez

19398693



Nombres y Apellidos

Cedula de Ciudadanía

Firma

Agrosavia

Investigador PhD senior

601 4227300

gleon@agrosavia.co

Entidad

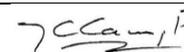
Cargo

Teléfono

E-mail

Juan Carlos Campos Pinzón

17328949



Nombres y Apellidos		Cedula de Ciudadanía	Firma
Agrosavia	Profesional de apoyo a la investigación	601 4227300	jcampos@agrosavia.co
Entidad	Cargo	Teléfono	E-mail

Forma 3-1209