

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Sequenciamento e análise da variabilidade genética de vírus
transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* no Brasil**

Camila Chabi de Jesus

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2016**

Camila Chabi de Jesus
Bacharela em Biologia

Sequenciamento e análise da variabilidade genética de vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* no Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Dra. **JULIANA DE FREITAS-ASTÚA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Jesus, Camila Chabi de

Sequenciamento e análise da variabilidade genética de vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* no Brasil / Camila Chabi de Jesus. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

105 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1 Leprose dos citros 2. Mancha anular do cafeeiro 3. Ácaros 4. *Next generation sequencing* I. Título

CDD 632.6542
J58s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha família pelo apoio constante
Dedico

Aos meus amigos

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo propósito de vida traçado por Ele para mim;

À minha orientadora Dra. Juliana de Freitas-Astúa pela oportunidade, orientação, ensinamentos e confiança;

Ao meu co-orientador Dr. Pedro Luiz Ramos González pela orientação e grande contribuição neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e ao Dr. Orlene Guerra Peraza pela disponibilidade e apoio ao trabalho;

À Dra. Valdenice Moreira Novelli, à Dra. Michèle Claire Breton e à Ma. Gabriella Dias Arena pelo apoio e disponibilidade;

À Esalq, ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, pela oportunidade para realização do curso e pelo crescimento acadêmico absorvido nesta instituição;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira pela oportunidade. Aos funcionários e amigos pelo acolhimento, amizade e apoio. Em especial aos amigos da sala da Pós-Graduação e ao grupo de pesquisa da leprose dos citros e HLB;

À Thais, Graziela, Silvia e Tatiane pelo apoio, amizade e por tornarem os meus dias mais divertidos;

À EMBRAPA e ao Dr. Emanuel Felipe de Medeiros Abreu, pela oportunidade e confiança;

À minha família, especialmente a meu esposo Diego, pelo incentivo e paciência, e aos meus pais pelo amor incondicional;

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“O otimista é um tolo. O pessimista, um chato.
Bom mesmo é ser um realista esperançoso.”

Ariano Suassuna

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Vírus transmitidos por ácaros <i>Brevipalpus</i> spp.....	23
2.2 Diversidade genética de vírus transmitidos por ácaros <i>Brevipalpus</i> spp.....	31
2.3 Vírus transmitidos por ácaros <i>Brevipalpus</i> spp. associados à leprose dos citros	31
2.4 Vírus transmitidos por ácaros <i>Brevipalpus</i> sp. associados à mancha anular do cafeeiro.....	35
2.5 Vírus transmitidos por ácaros <i>Breviplapus</i> spp. que afetam outras culturas e plantas ornamentais	38
2.6 Taxonomia e biologia de <i>Brevipalpus</i> spp.	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Material vegetal	47
3.2 Transmissão dos VTB para <i>Arabidopsis thaliana</i> mediada por <i>Brevipalpus</i> spp.	47
3.3 Extração de RNA total e análise de qualidade e integridade	48
3.4 Detecção dos VTB associados à leprose dos citros por RT-PCR	49
3.5 Sequenciamento de sRNA dos vírus transmitidos por <i>Brevipalpus</i> spp.	49
3.5.1 Validação do sequenciamento.....	50
3.6 Sequenciamento parcial dos isolados de CiLV-C	51
3.7 Análise da filogenia e variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil	52
3.8 Detecção diferencial entre os isolados CiLV-C Cor e CiLV-C SJRP por RT-PCR	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1 Filogenia e variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil....	55
4.1.1 Estudo das relações filogenéticas na população de CiLV-C no Brasil.	60
4.1.2 Detecção de possíveis eventos de recombinação no genoma de CiLV-C	64
4.1.3 Variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil.....	68
4.1.4 Estimativa da pressão de seleção sobre alguns genes de CiLV-C.....	71
4.1.6 Estrutura secundária das proteínas p29 dos cilevirus.....	73

4.2 Caracterização molecular de CiLV-C isolado de São José do Rio Preto (CiLV-C SJRP)	75
4.2.1 Detecção diferencial de CiLV-C Cor e CiLV-C SJRP por RT-PCR	81
4.3 Caracterização molecular de Coffee ringspot virus isolado de Limeira, SP (CoRSV Limeira)	83
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
REFERÊNCIAS	89

RESUMO

Sequenciamento e análise da variabilidade genética de vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* no Brasil

Acredita-se que o Brasil é o centro de diversidade de vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTB). Alguns desses VTB infectam culturas fundamentais para o agronegócio brasileiro como citros e café, além de maracujá e de várias plantas ornamentais. Na última década os genomas de dois deles, *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) e Coffee ringspot virus (CoRSV) foram sequenciados, mas ainda é escasso o conhecimento sobre a diversidade genética e processos evolutivos envolvidos na população dessas espécies. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar molecularmente novas estirpes de CiLV-C e CoRSV que infectam citros e café, respectivamente. E revelar as relações filogenéticas com espécies de VTB conhecidas, assim como avaliar a variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil. Para o estudo de CiLV-C, 47 amostras de *Citrus sinensis* apresentando sintomas típicos da leprose dos citros foram coletadas em diferentes regiões do Brasil no período de 2011-2015. A presença de CiLV-C foi detectada por RT-PCR em todas as amostras coletadas e, posteriormente, foi realizado o sequenciamento de quatro regiões do genoma viral (*p29*, *p15*, RI e MP) de cada isolado. As sequências obtidas foram utilizadas no estudo de filogenia e variabilidade da população de CiLV-C no Brasil. Foi demonstrado que a população de CiLV-C apresenta uma variabilidade relativamente baixa; entretanto, foi identificada a existência de duas linhagens dentro da espécie, nomeadas Cor e SJRP. Os genomas completos de CiLV-C SJRP e também do dicorhavirus tentativo CoRSV identificado em Limeira, SP, foram obtidos mediante o sequenciamento de RNA de pequeno tamanho (siRNA). Cada sequência foi validada mediante o sequenciamento de fragmentos gerados por RT-PCR ao longo do genoma. CiLV-C SJRP apresenta cerca de 85% de identidade de nucleotídeo com o membro-tipo do gênero *Cilevirus* e exibe evidências de recombinação com isolados da linhagem Cor, a prevalente no território brasileiro. Globalmente, o genoma de CoRSV Limeira apresenta mais de 90% de identidade de nucleotídeo com isolado CoRSV Lavras, o que indica que ambos os isolados são membros da mesma espécie tentativa de dicorhavirus.

Palavras-chave: Leprose dos citros; Mancha anular do cafeeiro; Ácaros; *Next generation sequencing*

ABSTRACT

Sequencing and analysis of the genetic variability of viruses transmitted by *Brevipalpus* mites in Brazil

South America is most likely the center of diversity of *Brevipalpus* transmitted viruses (BTV). Some of these BTV infect major crops of the Brazilian agribusiness such as citrus and coffee. Passion fruit and several other ornamental plants are affected as well. The genome of two of these viruses, *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) and Coffee ringspot virus (CoRSV) were sequenced, but the knowledge about several molecular characteristics and processes involved in the evolution of their populations are still scarce. Thus, the objective of this study was to molecularly characterize new isolates of BTV infecting citrus and coffee, reveal the phylogenetic relationships with known species of BTV, and assess the genetic variability of the population of CiLV-C in Brazil. For CiLV-C studies, 47 samples of *Citrus sinensis* showing typical symptoms of leprosis were collected in different Brazilian regions during 2011-2015. The presence of CiLV-C was detected by RT-PCR in all the collected samples and four regions of the viral genome (*p29*, *p15*, IR and *MP*) of each isample were sequenced. It has been shown that the CiLV-C population has relatively low variability; although the existence of two lineages named Cor and SJRP were identified in this work. The complete genomes of one isolate of the lineage SJRP (CiLV-C SJRP) and that of the tentative dicorhavirus CoRSV found in Limeira, SP, were obtained by small RNA (siRNA) Sequencing. Validation was performed by sequencing fragments generated by RT-PCR using specific primers throughout the genome. CiLV-C SJRP has about 85% nucleotide identity with the genome of the type-member of the *Cilevirus* genus and shows evidence of recombination with isolates of the lineage Cor, which are prevalent in Brazil. CoRSV isolate Limeira has more than 90% of nucleotide identity with CoRSV Lavras, indicating that both isolates are members of the same tentative species of dichorhavirus.

Keywords: Citrus leprosis; Coffee ringspot; mites; Next generation sequencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas baciliformes de VTB (A)	25
Figura 2 - Organização e estrutura genômica de Orchid fleck virus (OFV).....	28
Figura 3 - Organização e estrutura genômica de CiLV-C.....	30
Figura 4 - Organização e estrutura genômica de Hibiscus green spot virus 2 (HGSV-2).....	31
Figura 5 - Distribuição da diversidade de VTB associados à leprose dos citros no continente americano	34
Figura 6 - Sintomas típicos da leprose em laranja doce (<i>Citrus sinensis</i>) infectada por CiLV-C. (A) folhas, (B) fruto e (C) ramos.....	35
Figura 7 - Sintomas da mancha anular do cafeeiro em <i>Coffea</i> sp. infectado por VTB	38
Figura 8 - Sintomas de clorose e/ou necrose associados a VTB em plantas hospedeiras.....	43
Figura 9 - Identificação morfológica das espécies de <i>Brevipalpus</i> vetores de CiLV-C e CiLV-N através de microscopia eletrônica de varredura	46
Figura 10 - Gel de agarose 1% representando os produtos de RT-PCR para detecção de vírus associados à leprose dos citros	60
Figura 11 - Regiões do genoma de CiLV-C selecionadas para o estudo de filogenia e variabilidade da população.....	61
Figura 12 - Árvores filogenéticas geradas pelo Neighbor joining a partir de quatro regiões genômicas dos isolados de CiLV-C.....	63
Figura 13 - Representação esquemática dos putativos eventos de recombinação na população de CiLV-C	66
Figura 14 - Alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidos da p29 a partir de isolados de CiLV-C e CiLV-C2	74
Figura 15 - Porcentagem de identidade de nucleotídeo ao longo da sequência genômica de CiLV-C SJRP comparada a CiLV-C Cor, CiLV-C2 Colômbia e CiLV-C2 Havaí	80
Figura 16 - Detecção diferencial entre isolados de CiLV-C Cor e CiLV-C SJRP por RT-PCR.....	82
Figura 17 – Detecção por RT-PCR de isolados de CiLV-C da linhagem SJRP detectados no noroeste do estado de São Paulo.....	83

Figura 18 - Porcentagem de identidade de nucleotídeo ao longo da sequência genômica de OFV comparado a CoRSV Limeira, CoRSV Lavras e CiLV-N..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de iniciadores utilizados na detecção de VTB associados à leprose dos citros	49
Tabela 2 - Lista de iniciadores utilizados no sequenciamento parcial de isolados de CiLV-C coletados em diferentes regiões do Brasil	51
Tabela 3 - Lista dos isolados de CiLV-C utilizados no estudo de variabilidade e filogenia.....	56
Tabela 4 - Eventos de recombinação no RNA2 de CiLV-C.....	65
Tabela 5 - Parâmetros genéticos para quatro regiões genômicas de CiLV-C. Os valores foram analisados de forma independente incluindo todos os isolados e também considerando apenas os isolados pertencentes ao clado Cor.....	70
Tabela 6 - Estimativa da pressão de seleção sobre as quatro regiões genômicas de CiLV-C. Os valores foram obtidos incluindo todos os isolados e também considerando apenas os isolados pertencentes ao clado Cor	71
Tabela 7 – Dedução da pressão de seleção sobre aminoácidos codificados por CiLV-C.....	72
Tabela 8 - Eficiência de transmissão de CiLVC SJRP por ácaros <i>Brevipalpus</i> sp	75
Tabela 9- Composição da biblioteca e cobertura do genoma viral de CiLVC SJRP a partir do sequenciamento de próxima geração de sRNA derivados de <i>Citrus sinensis</i> e <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
Tabela 10 - Lista dos iniciadores utilizados para amplificação completa do genoma (RNA1 e RNA2) de <i>Citrus leprosis virus C</i> SJRP, com base nas sequências geradas pela FASTERIS (Suíça).....	77
Tabela 11 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos entre o membro-tipo (CiLV-C) e a espécie tentativa (CiLV-C2) do gênero <i>Cilevirus</i>	79
Tabela 12 - Iniciadores utilizados no diagnóstico diferencial das estirpes de CiLV-C	82
Tabela 13 - Lista dos iniciadores utilizados para amplificação completa do genoma (RNA e RNA2) de Coffee ringspot virus (CoRSV), com base nas sequências geradas pela FASTERIS (Suíça).....	84

Tabela 14 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos entre CoRSV Limeira e OFV e as espécies tentativas do gênero

Dichorhavirus..... 85

1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola brasileira é fundamental para o comércio exterior do país. A citricultura é tida como um dos principais setores do agronegócio, destacando-se no cenário mundial pela produção e comercialização de suco de laranja concentrado congelado (NEVES et al., 2006). No entanto, a produtividade citrícola nacional ainda é relativamente baixa, em parte em função das pragas e doenças que acometem a cultura, gerando altos custos de ordem fitossanitária (NEVES et al., 2010). A leprose dos citros é a principal doença de etiologia viral que afeta a citricultura nacional (BASTIANEL et al., 2010). A doença também ocorre na maioria dos países da América do Sul e Central, e na América do Norte está presente no México (IZQUIERDO et al., 2011). Fora do continente americano sintomas associados à leprose foram recentemente identificados no Havaí (MELZER et al., 2013a; b).

O cafeeiro é também uma cultura relevante para o agronegócio brasileiro (BOARI et al., 2011), e ao nível mundial é considerado o quinto produto que gera mais riqueza (RAMALHO et al., 2014). O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café e segundo maior consumidor do produto. A produtividade e qualidade do café são influenciadas por diversos fatores, dentre eles a ocorrência de doenças (BOARI, 2011) que podem ser causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus. A principal doença causada por vírus que afeta o cafeeiro é conhecida como a mancha anular do cafeeiro (FIGUEIRA et al., 1995) a qual está atualmente distribuída na maioria dos estados brasileiros e na Costa Rica (KITAJIMA et al., 2011a; ALMEIDA et al., 2012; RAMALHO et al., 2014; 2015).

Tanto a leprose dos citros como a mancha anular do cafeeiro são doenças cuja transmissão de planta a planta é realizada por ácaros do gênero *Brevipalpus*. Portanto, os vírus que causam estas doenças são conhecidos genericamente como VTB (Vírus Transmitidos por ácaros do gênero B*revipalpus*) (KITAJIMA et al., 2003a). O gênero *Brevipalpus* é reconhecido como o grupo mais importante da família Tenuipalpidae (CHILDERS et al., 2003a). Compreende mais de 300 espécies, sendo *B. phoenicis* (Geijskes), *B. californicus* (Banks) e *B. obovatus* (Donnadieu) reconhecidos como vetores de fítovírus. Atualmente *B. phoenicis* é considerado como um complexo morfológico de espécies, sendo *B. yothersi* (Baker) o vetor de *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) (BEARD et al., 2015). O complexo

morfológico de espécie também é sugerido para *B. californicus* e *B. obovatus* (BEARD et al., 2015).

Além do ácaro vetor, os VTB compartilham algumas características, como a transmissão de forma persistente pelos *Brevipalpus* spp., morfologia baciliforme, indução de manchas cloróticas e/ou necróticas em seus hospedeiros e ausência de movimentação sistêmica em todos os hospedeiros vegetais em condições naturais (CHILDERS et al., 2003a; KITAJIMA et al., 2003a; KITAJIMA et al., 2010). No entanto, do ponto de vista molecular, os VTB são filogeneticamente diversos. Eles têm sido classificados em três gêneros: *Cilevirus*, *Higrevirus* e *Dichorhavirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2012; MELZER et al., 2013b; DIETZGEN et al., 2014). Os VTB induzem anomalias citológicas contrastantes na célula vegetal que infectam, uma característica que permite separá-los em dois grupos: VTB nucleares (VTB-N) e VTB citoplasmáticos (VTB-C) (BASTIANEL et al., 2010).

O recentemente proposto gênero *Dichorhavirus* agrupa os VTB nucleares e tem como membro-tipo o *Orchid fleck virus* (OFV) (DIETZGEN et al., 2014). O OFV caracteriza-se por possuir genoma bipartido de cadeia simples (ss) de RNA e senso negativo. Além de OFV, o gênero possui duas espécies tentativas, o *Coffee ringspot virus* (CoRSV) e o *Clerodendrum chlorotic spot virus* (CICSV), e duas possíveis estirpes de OFV que infectam citros, *Citrus leprosis virus nuclear type* (CiLV-N) e *Citrus necrotic spot virus* (CiNSV). Os gêneros *Cilevirus* e *Higrevirus* agrupam os VTB citoplasmáticos. CiLV-C é o membro-tipo do gênero *Cilevirus*, apresenta genoma bipartido de ssRNA e senso positivo (LOCALI-FABRIS et al., 2012). Esse gênero apresenta mais uma espécie tentativa, *Citrus leprosis virus C type 2* (CiLV-C2), que infecta citros na Colômbia. CiLV-C2 Hw, detectado em hibisco no Havaí, apresenta alta similaridade com CiLV-C2 e talvez seja uma nova estirpe dessa espécie. O gênero *Higrevirus* possui um único membro, o *Hibiscus green spot virus 2* (HGSV-2), que apresenta genoma tripartido de ssRNA de sentido positivo (MELZER et al., 2013b). Além desses fitovírus, existem relatos de mais de 40 espécies de VTB infectando espécies vegetais ainda não caracterizados molecularmente (KITAJIMA et al., 2003a).

Embora nos últimos cinco anos se tenham aprofundado o conhecimento sobre os VTB, ainda são escassas as informações acerca da diversidade, aspectos moleculares e taxonômicos da maioria desses vírus e de suas relações com seus ácaros vetores e hospedeiros vegetais. Assim, novas pesquisas nessa área são

necessárias para um melhor entendimento sobre esses patossistemas, visando o desenvolvimento de métodos de diagnóstico das doenças causadas pelos VTB e seu controle.

Devido à importância para o agronegócio brasileiro de várias espécies vegetais afetadas por VTB, esse trabalho teve como objetivo caracterizar molecularmente novas estirpes de CiLV-C e CoRSV que infectam citros e café, respectivamente, e estimar a variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil. Para tanto, foi avaliada a presença de VTB associados à leprose dos citros em plantas de citros e em trapoeraba (*Commelina benghalensis*), uma hospedeira natural alternativa de CiLV-C. Foram realizadas coletas de tecidos com sintomas de leprose em diferentes regiões geográficas do país no período de 2011-2015 e obtidas as sequências de nucleotídeos parciais dos isolados de CiLV-C detectados. Uma das amostras de laranja doce coletada em SJRP (São José do Rio Preto, SP) foi utilizada como fonte de inóculo para a caracterização completa de uma nova estirpe de CiLV-C. O trabalho permitiu, pela primeira vez, avaliar a variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil, possibilitando uma abordagem sobre a história evolutiva dos cilevirus no país. Da mesma forma, obteve-se a sequência genômica de uma nova estirpe de CoRSV a partir de uma planta de *Coffea* sp. coletada em Limeira, SP apresentando sintomas típicos causados pela mancha anular do cafeeiro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* spp.

Os vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTB) têm sido referenciados na literatura desde 1920, quando se relatou a leprose dos citros na América do Sul (SPEGAZZINI, 1920; BITANCOURT, 1933; 1940; VERGANI, 1945). A partir da década de 1940, identificou-se a associação dos sintomas descritos em citros com ácaros *Brevipalpus* sp. (FREZZI, 1940). Em décadas posteriores, foi demonstrado que, além da leprose dos citros, *B. phoenicis* também era o vetor dos vírus causadores da mancha anular do cafeeiro (CHAGAS, 1978), da pinta verde do maracujazeiro (KITAJIMA et al., 1997) e da mancha anular do ligustro (RODRIGUES et al., 1997). Outras espécies do ácaro também têm sido consideradas vetoras de VTB, no Japão, foi confirmado que *B. californicus* transmite Orchid fleck virus (OFV) para orquídeas (MAEDA et al., 1998), enquanto foi observado que a mancha anular da dama-da-noite (*Cestrum nocturnum* L.) estava associada à presença de *B. obovatus* (FREITAS-ASTÚA et al., 2004). A partir do ano 2000, verificou-se que inúmeros vírus, encontrados principalmente em ornamentais, eram associados à presença de *B. phoenicis* e/ou *B. obovatus* (KITAJIMA et al., 2003a; FREITAS-ASTÚA et al., 2004; KITAJIMA et al., 2010).

Recentemente, o gênero *Brevipalpus* foi reavaliado e, em particular *B. phoenicis*, foi reclassificado em *B. yothersi*, *B. phoenicis* e *B. papayensis* (BEARD et al., 2015). Aparentemente, ao menos *B. yothersi* transmite *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) no Brasil e na Colômbia (ROY et al., 2015a; SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ et al., 2015). *B. californicus* está relacionado com a transmissão das estirpes de OFV que causam a leprose nuclear no México e na Colômbia (ROY et al., 2015a). Além do ácaro vetor, os vírus transmitidos pelos *Brevipalpus* spp. compartilham diversas características: as infecções causadas pelos VTB resultam invariavelmente em lesões localizadas em folhas, frutos, ramos e, em raros casos, nas flores (KITAJIMA et al., 2010), não causando infecção sistêmica em nenhuma de suas hospedeiras naturais; são transmitidos de forma persistente pelo vetor; apresentam morfologia baciliforme (Figura 1A e B) (CHILDERS et al., 2003a; KITAJIMA et al., 2003a;), e quanto ao local de replicação nas células vegetais hospedeiras pode ser em compartimentos diferentes, no citoplasma ou no núcleo. A partir desta última

característica, os VTB são amplamente classificados como VTB citoplasmáticos (VTB-C) ou VTB nucleares (VTB-N). Os VTB-C possuem partículas curtas e alojadas nas cisternas do retículo endoplasmático e induzem inclusões densas e vacuoladas, os viroplasmas, no citoplasma, que se acredita ser o sítio de acúmulo e/ou síntese do material viral (Figura 1A). Os VTB-N apresentam partículas curtas, presentes no núcleo ou citoplasma, e presença de viroplasmas eletro-transparentes no núcleo (Figura 1B) (KONDO et al., 2003; KITAJIMA et al., 2003a; KITAJIMA et al., 2010).

Quanto à transmissão dos VTB, existem dois tipos de transmissão persistente descritos na literatura: propagativa, na qual ocorre a replicação do vírus no vetor, sendo caracterizada por um período de latência longo (semanas) e possibilidade de transmissão transovariana; e a circulativa (não-propagativa), na qual não ocorre replicação do vírus no vetor, apresentando um período de latência curto (horas a dias) e ausência de transmissão transovariana (NOVELLI et al., 2005; 2007). Dados de transmissão pelo vetor, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e ensaios moleculares sugerem que os VTB-N sejam transmitidos pelo ácaro vetor de maneira persistente propagativa e os VTB-C, de maneira circulativa (KONDO et al., 2003; NICOLINI et al., 2007; KITAJIMA et al., 2007, 2008a; RODRIGUES et al., 2013). Recentemente foi sugerido que *B. yothersi* transmite CiLV-C, que é um VTB-C, de forma propagativa (ROY et al., 2015a), mas essa informação ainda precisa ser confirmada.

Além da leprose dos citros, que se destaca como a virose mais importante transmitida por ácaros *Brevipalpus*, este também é o vetor de uma crescente lista de vírus de plantas, atualmente cerca de 40 (KITAJIMA; MORAES, 2000; KITAJIMA et al., 2003b, 2010). Esses VTB afetam culturas, como café e maracujá, além de mais de 50 espécies de plantas ornamentais (KITAJIMA et al., 2003b, 2010; BOARI et al., 2011; RAMALHO et al., 2014; ROY et al., 2015a).

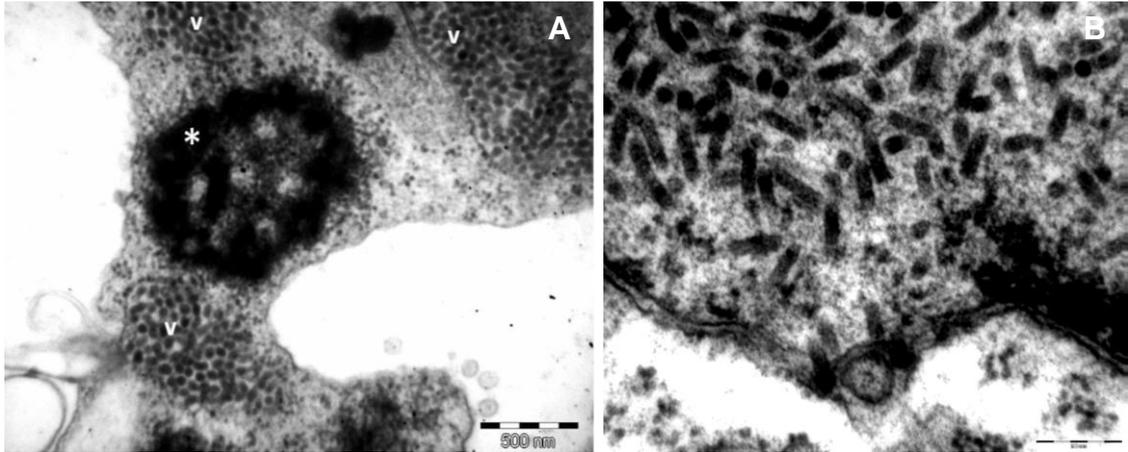


Figura 1 - Microscopia eletrônica de transmissão mostrando partículas baciliformes de VTB. (A) Secções de células do parênquima foliar obtidas de lesões causadas por CiLV-C em *Citrus sinensis*, identificando a presença de grupos de virions (v) e viroplasma (*) no citoplasma (retirado de ARENA et al., 2013); (B) Cortes ultrafinos de folhas de *Coffea* sp. infectada por CoRSV, identificado a presença de viroplasma no núcleo (retirado de BOARI, 2011)

2.2 Diversidade genética de vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* spp.

Toda diversidade genética de VTB conhecida encontra-se distribuída em três gêneros distintos: *Cilevirus*, *Higrevirus* e *Dichorhavirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2012; MELZER et al., 2013b; DIETZGEN et al., 2014).

O gênero *Dichorhavirus* agrupa os VTB nucleares, sendo o membro-tipo deste gênero o Orchid fleck virus (OFV) (KONDO et al., 2006; DIETZGEN et al., 2014). Com base na forma e tamanho dos vírions de OFV e outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* spp., esse VTB foi inicialmente agrupado juntamente com os rhabdovirus sem gênero atribuído (WUNNER et al., 1995). Após a caracterização molecular de OFV foi proposto um novo gênero ao ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus), o *Dichorhabdovirus*, que seria pertencente à família *Rhabdoviridae* e ordem *Mononegavirales* por possuir genoma bipartido de cadeia simples (ss) de RNA e senso negativo (KONDO et al., 2006). No entanto, de acordo com a chave de classificação do ICTV, todos os rhabdovirus compartilham não apenas a estrutura de partículas, mas também a estratégia de replicação, a composição bioquímica [ssRNA (de sentido negativo)] e a organização genômica (com genoma monopartido) (EASTON; PRINGLE, 2011). Em função do genoma bipartido dos VTB-N, a proposta da criação do gênero *Dichorhabdovirus* foi substituída por outra mais recente (DIETZGEN et al., 2014), que sugere a criação do gênero *Dichorhavirus* (Figura 2), sem família atribuída.

O RNA1(6413 nt) do OFV codifica para cinco ORFs, correspondentes às proteínas de 49 (ORF1), 26 (ORF2), 38 (ORF3), 20 (ORF4) e 61 kDa (ORF5), e o RNA2 (6001 nt), que codifica para uma única proteína de 212 kDa (ORF6). As duas moléculas de RNA apresentam as junções 3`-UGUGUC---GACACA-5' nas regiões terminais (Figura 2). No RNA1, a proteína de 49 kDa (ORF1) apresenta alta similaridade com as proteínas de nucleocapsídeos (N) de fitovírus, sendo considerada a proteína N dos dichorhavirus. Já a proteína de 20 kDa (ORF2) não apresenta semelhança aparente com outras sequências virais disponíveis no GenBank (KONDO et al., 2006). A ORF3 codifica possivelmente a MP (proteína de movimento, de 26 kDa) e a proteína de 38 kDa (ORF4) possivelmente é associada a matriz (M) (ROY et al., 2015b). A proteína de 61 kDa (ORF5) possivelmente é uma glicoproteína (G), com duas principais regiões hidrofóbicas, nas extremidades N e C terminais, que constituem provavelmente o peptídeo sinal e domínios de transmembrana dessa proteína. No RNA2 a proteína de 212 kDa (ORF6) é a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), uma poliproteína envolvida na replicação do vírus, também conhecida como proteína L para os dichorhavirus (KONDO et al., 2006). Quanto à morfologia das partículas, os vírions de OFV não são encapsidados, apresentam dimensões de 40-50 nm de largura e 100-110 nm de comprimento e se acumulam no núcleo das células infectadas, gerando configurações conhecidas como “rodas de carroça” (KITAJIMA et al., 2011a).

Além do OFV, agrupam-se no gênero proposto Dichorhavirus a espécie tentativa CoRSV (RAMALHO et al., 2014), e as estirpes de OFV que infectam citros, Citrus leprosis virus nuclear type (CiLV-N) (ROY et al., 2013a, 2014a) e Citrus necrotic spot virus (CiNSV) (CRUZ-JARAMILLO et al., 2014). Os dichorhavirus são muito semelhantes filogeneticamente, CiLV-N e CiNSV apresentam mais de 90% de identidade de nucleotídeos com OFV (ROY et al., 2014b). Roy et al. (2015b) detectaram CiLV-N em várias espécies de citros em Querétaro, México, e através de estudos de filogenia utilizando sequências de aminoácidos das proteínas tentativas N e G demonstraram alta semelhança filogenética entre esses vírus e OFV. As altas semelhanças indicam que esses dichorhavirus pertencem a uma mesma espécie (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2015). O CoRSV apresenta genoma semelhante aos dichorhavirus, o RNA1 (6552 nt) e o RNA2 (5945 nt) codificam para seis ORFs. No RNA1 estão presentes junções intergênicas, algumas delas idênticas a encontrada em OFV, enquanto outras apresentam ligeiras diferenças (RAMALHO et al., 2014).

O CoRSV possui uma relação de 70% de identidade de nucleotídeos com OFV e suas estirpes, sugerindo que este vírus é um VTB distinto (DIETZGEN et al., 2014; RAMALHO et al., 2014). Sequências parciais do gene *N* de vários isolados de CoRSV coletados em diferentes estados do Brasil indicam que a população desta espécie apresenta baixa variabilidade genética e que a prevalência de CoRSV é muito maior do que se acreditava (RAMALHO et al., 2015).

OFV foi encontrado pela primeira vez no Japão em plantas de *Cymbidium* (DOI et al., 1977), posteriormente foi relatado na Austrália, Brasil, Dinamarca, Alemanha, Coréia do Sul, Costa Rica, Paraguai e EUA, infectando muitas plantas do gênero das *Orchidaceae* (GIBBS et al., 2000; BLANCHFIELD et al., 2001; KITAJIMA et al., 2001; FREITAS-ASTÚA et al., 2002b; RAMOS-GONZALEZ et al., 2015). Atualmente OFV é distribuído mundialmente devido ao comércio internacional de orquídeas e a presença cosmopolita do ácaro vetor (RAMOS-GONZALÉZ et al., 2015).

O CoRSV foi relatado em 1938 no estado de Minas Gerais (BITANCOURT, 1938). Hoje, o vírus está presente na maioria dos estados brasileiros e na Costa Rica (RODRIGUES et al., 2002; RAMALHO et al., 2014a, 2015). Há relatos de uma doença associada a CoRSV nas Filipinas (REYES 1959, 1961), entretanto o vírus não foi identificado nessa região. Outros VTB do tipo nuclear são o CiLV-N e o CiNSV, relatados no México e na Colômbia (CRUZ-JARAMILLO et al., 2014; ROY et al., 2014a). Através de um estudo de material herbarizado, recentemente foi comprovado que CiLV-N esteve presente na Flórida na década de 1940 (HARTUNG et al., 2015). Há relatos de VTB-N no Panamá e em algumas regiões do estado de São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais; porém, no Brasil o vírus não foi caracterizado molecularmente, apenas por microscopia eletrônica de transmissão (KITAJIMA et al., 1972a; BASTIANEL et al., 2010).

Clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV) (KITAJIMA; MORAES, 2000) embora não completamente caracterizado, apresenta relações estreitas com os membros tentativos do gênero *Dichorhavirus* (KITAJIMA et al., 2008). De acordo com DIETZGEN et al. (2014), as informações disponíveis sobre as características molculares e biológicas de CICSV indicam que este vírus seja um tentativo *dichorhavirus*.

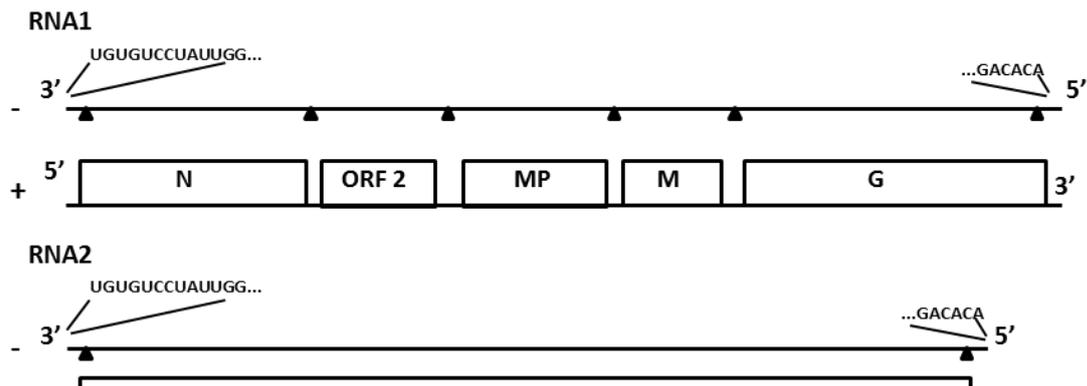


Figura 2 - Organização e estrutura genômica de Orchid fleck virus (OFV), proposto por Kondo et al. (2006). O genoma bipartido codifica cinco ORFs no RNA1 e uma ORF no RNA2, (-) genoma e (+) genoma complementar. Apresentem junções intergênicas entre as ORFs e terminais nas extremidades 3' e 5' das duas moléculas. Domínios funcionais foram atribuídos de acordo com as sequências traduzidas: *N*, nucleocapsídeo, *MP*, proteína de movimento, *M*, matriz, *G*, glicoproteína, *L*, RNA polimerase dependente de RNA. As sequências traduzidas com função não identificada estão representadas pela nomenclatura numérica das ORF.

Os gêneros *Cilevirus* e *Higrevirus* agrupam os VTB citoplasmáticos. CiLV-C é o membro-tipo do gênero *Cilevirus*, apresenta genoma bipartido de ssRNA e senso positivo (Figura 3) (BASTIANEL et al., 2010; LOCALI-FABRIS et al., 2012). Ambas as moléculas contêm estrutura cap na extremidade 5' e cauda poli-A na extremidade 3'. O RNA1 (8745 nt) apresenta duas ORFs, correspondentes a uma proteína de 286 kDa (ORF1) e outra de 29 kDa (ORF2). O RNA2 (4986 nt) apresenta quatro ORFs, correspondentes às proteínas de 15 (ORF3), 61 (ORF4), 32 (ORF5) e 24 kDa (ORF6) (Figura 3). No RNA1, a proteína de 286 kDa é uma RdRp tentativa e contém quatro domínios conservados: metiltransferase, protease, helicase e polimerase. A proteína de 29 kDa (ORF2) é a proteína capsial tentativa (p29). No RNA2, a proteína de 32 kDa (ORF5) está aparentemente envolvida na movimento célula-a-célula do vírus, apresenta domínios conservados com a superfamília 30K, que são as proteínas de movimento em plantas (LOCALI-FABRIS et al., 2006), sendo considerada a MP (proteína de movimento) dos cilevirus. As proteínas p61 (ORF4) e p24 (ORF6) apresentam semelhanças distantes com proteínas estruturais codificadas pelos *Blunervirus* e *Negevirus* (KUCHIBHATLA et al., 2014). A proteína de 15kDa (ORF3) conhecida como p15, não apresenta função conhecida (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). No RNA1 de CiLV-C ocorre a transcrição de um RNA subgenômico (sgRNA1) de 0.7 kb que codifica a p29. No RNA2 ocorre a geração de três RNA subgenômicos, mais próximos à região terminal

3', com 3 kb (sgRNA2), 1,5 kb (sgRNA3) e 0,6 kb (sgRNA4), provavelmente envolvidos na expressão dos genes *p61*, *p24*, *MP*, respectivamente (ROY et al., 2015a). Quanto a morfologia das partículas, CiLV-C possui partículas baciliformes e curtas, apresentando largura de 60 a 70 nm e comprimento de 120 a 150 nm. Elas são encontradas isoladas ou agrupadas no lúmen do retículo endoplasmático e seus viroplasmas ocorrem como inclusões citoplasmáticas elétrons densas e vacuoladas, de forma e dimensões variadas (KITAJIMA et al., 2003a).

Inicialmente, devido à morfologia das suas partículas e local de acúmulo nas células infectadas, o CiLV-C foi considerado um membro tentativo da família *Rhabdoviridae* (JACKSON et al., 2005). No entanto, a composição bioquímica das moléculas de RNA (ssRNA- para os rhabdovírus e ssRNA+ para o CiLV-C), associada ao conjunto de propriedades únicas do vírus: morfologia de partículas, efeitos citopáticos induzidos no hospedeiro, sequência distinta e particularidades na sua transmissão, foram a base para propor a criação de um novo gênero denominado *Cilevirus*, tendo o CiLV-C como membro-tipo (LOCALI-FABRIS et al., 2012). Além de CiLV-C, Citrus leprosis virus C type 2 (CiLV-C2) detectado na Colômbia (ROY et al., 2013b) e CiLV-C2 Hw no Havaí, são as outras duas espécies tentativas do gênero *Cilevirus* (MELZER et al., 2013a; ROY et al., 2013b). O genoma de CiLV-C2 apresenta organização semelhante à do CiLV-C, exceto pela presença de uma longa região 3' não traduzida (3'-UTR) e uma ORF extra no RNA2, que codifica uma proteína putativa de 7 kDa (MELZER et al., 2013a; ROY et al., 2013b). Quanto à filogenia dos cilevirus, CiLV-C apresenta globalmente cerca de 55% de identidade de nucleotídeos com CiLV-C2. As regiões de menor identidade entre esses vírus correspondem aos genes *p15* e *RI* (região intergênica) do RNA2. O CiLV-C2 Hw apresenta uma porcentagem global de identidade de nucleotídeos de 85% com CiLV-C2 (MELZER et al., 2013a), podendo ser uma estirpe dessa espécie.

O CiLV-C foi detectado no Panamá por volta de 2000 e em pouco tempo chegou ao sul do México (BASTIANEL et al., 2010; IZQUIERDO et al., 2011). Atualmente este vírus está amplamente distribuído desde o México à Argentina. O CiLV-C2 está presente na Colômbia e CiLV-C2 Hw no Havaí, neste caso infectando hibisco e não citros (MELZER et al., 2013a).

Passion fruit green spot virus - PFGSV (KITAJIMA et al., 1997), *Solanum violaefolium* ringspot virus - SvRSV (FERREIRA, 2005) e *Ligustrum* ringspot virus - LigRSV (KITAJIMA et al., 2010) são VTB não completamente caracterizados

molecularmente, mas que apresentam similiaridade genômica com os cilevirus. PFGSV foi detectado pela primeira vez em Vera Cruz, São Paulo (KITAJIMA et al., 1997) e atualmente encontra-se na maioria dos estados brasileiros (Moraes et al.; 2006). SvRSV e LigRSV foram relatados em São Paulo e em alguns outros estados do Brasil (KITAJIMA; MORAES, 2000; KITAJIMA et al., 2003a, 2008b).

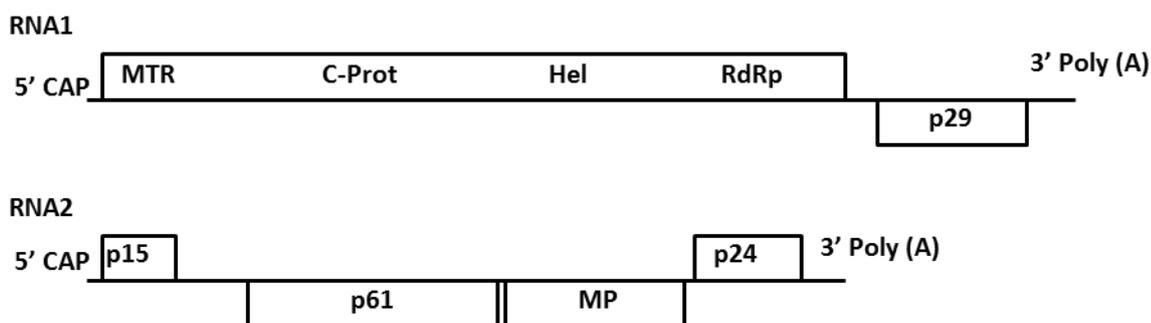


Figura 3 - Organização e estrutura genômica de CiLV-C, proposta por Locali-Fabris et al. (2006). As ORFs estão indicadas por retângulos e representadas, de acordo com a localização em diferentes quadros de leitura, acima (+1) ou abaixo (+3). Domínios funcionais foram atribuídos de acordo com as sequências traduzidas: MTR, metil-transferase; C-Prot, cisteína protease; Hel, helicase; RdRp, RNA polimerase dependente de RNA; p29, capa proteica; MP, proteína de movimento; p15, p61 e p24 ainda não possui função atribuída

O gênero *Higrevirus* é representado por um único VTB, o *Hibiscus green spot virus 2* (HGSV-2) detectado no Havaí em 2013 (MELZER et al., 2013b). Existem relatos anteriores no Brasil de VTB infectando várias espécies de hibiscos de diferentes regiões do Brasil, sendo que o vírus ficou conhecido como Hibiscus green spot virus (HGSV) (KITAJIMA et al., 2003; ROY et al., 2015a). HGSV ainda não foi caracterizado completamente, mas sabe-se que este vírus apresenta uma espécie distinta à detectada no Havaí. HGSV-2 foi encontrado causando sintomas cloróticos em limão volkameriano (*Citrus volkameriana*) (MELZER et al., 2013b). O genoma do HGSV-2 é de (+)ssRNA tripartido e codifica para oito ORFs (Figura 4), o RNA1 (8372 Kb) codifica para uma ORF de 273 kDa (ORF1), o RNA2 (3196 Kb) codifica para 4 ORFs, de 50 (ORF2), 39 (ORF3), 9 (ORF4) e 6 kDa (ORF5), o RNA3 (3134 Kb) codifica 3 ORFs, de 33 (ORF6), 29 (ORF7) e 23 kDa (ORF8). Apresentam cauda poli-A nas extremidades 3' das três moléculas de RNA. A proteína de 273 kDa (ORF1) é a tentativa RdRp e possui quatro domínios: metiltransferase, protease, helicase e polimerase. Os domínios metiltransferase, helicase e polimerase apresentam similaridade de nucleotídeo de 38, 37, e 48% com os domínios correspondentes do CiLV-C, respectivamente (MELZER et al., 2013b). Os genes

que codificam as proteínas de 39 (ORF3), 9 (ORF4) e 6 kDa (ORF5) apresentam similaridade com os TGB (*Triple Gene Block*), que são proteínas de movimento de vírus de plantas (MOROZOV; SOLOVYEV, 2003). As proteínas 50 (ORF2), 33 (ORF6) e 29 kDa (ORF7) não possuem semelhança com nenhuma proteína disponível no banco de dados GenBank, e a proteína 23 kDa (ORF8) apresenta 26% de identidade com a p24 de CiLV-C (MELZER et al., 2013b), mas também não possui função conhecida.

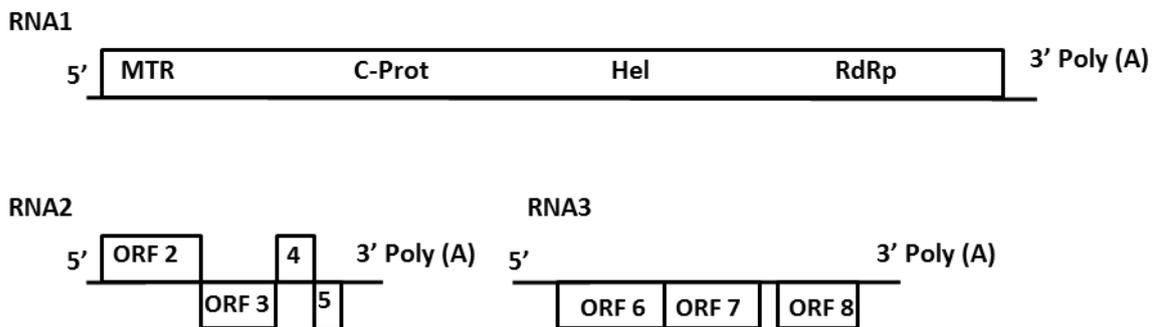


Figura 4 - Organização e estrutura genômica de *Hibiscus green spot virus 2* (HGSV-2), proposta por Melzer et al. (2013b). Apresenta genoma tripartido de (+)ssRNA. As ORFs estão indicadas por retângulos e representadas, de acordo com a localização em diferentes quadros de leitura, acima (+1) ou abaixo (+3). Domínios funcionais foram atribuídos de acordo com as sequências traduzidas: MTR, metil-transferase; C-Prot, cisteína protease; Hel, helicase; RdRp, RNA polimerase dependente de RNA; MP, proteína de movimento. As sequências traduzidas com função não identificada estão representadas pela nomenclatura numérica da ORF

2.3 Vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* spp. associados à leprose dos citros

As plantas do gênero *Citrus* e afins da família Rutaceae, especialmente *Poncirus* e *Fortunella*, são denominadas genericamente de citros. Estima-se a origem dos citros esteja entre 20 e 30 milhões de anos atrás, nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, foram introduzidas no Brasil pelas primeiras expedições colonizadoras, provavelmente na Bahia. Entretanto, com melhores condições para vegetar e produzir do que nas próprias regiões de origem, os citros se expandiram para todo o país (EMBRAPA, 2007).

A principal doença de etiologia viral que afeta a citricultura em escala nacional é a leprose dos citros. A infecção diminui o tempo de vida das plantas e a qualidade dos frutos, reduzindo a produtividade e aumentando os custos de produção dos pomares de citros (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2015). Para o controle da doença são

realizadas aplicações de acaricidas (duas a quatro aplicações/época), e os dados mais recentes que se têm disponível indicam que esse controle gera um custo de mais de \$80 milhões de dólares por ano para o cultivo de citros no Brasil (BASTIANEL et al., 2010).

A leprose dos citros foi a primeira virose causada por um VTB descrita na literatura. Essa doença foi relatada na Flórida em 1907 (FAWCETT, 1911) e inicialmente foi nomeada de *scally bark* ou *nail head rust*, devido aos sintomas típicos induzidos em frutos e ramos (FAWCETT, 1926). A etiologia da leprose dos citros foi difícil de determinar, e vários fungos foram propostos como o agente causal da doença. Pesquisas iniciais sugeriram que o fungo *Cladosporium herbarium* era o patógeno causador da leprose dos citros (FAWCETT, 1911). Na América do Sul a doença foi relatada pela primeira vez em 1920 no Paraguai, onde recebeu a denominação de lepra explosiva, e foi associada ao fungo *Amylirosa aurantiorum* (SPEGAZZINI, 1920). No Brasil a leprose dos citros foi identificada no ano de 1931, em São Paulo (BITANCOURT, 1934). Devido à abundância de lesões nas folhas, muito raras na Flórida, a doença foi chamada de varíola. No final dos anos 1950, a doença foi erradicada na Flórida (CHILDERS et al., 2003b; KITAJIMA et al., 2011b), possivelmente devido ao uso intensivo de enxofre como acaricida e a ocorrência de sucessivas geadas que, em conjunto, teriam eliminado as populações *Brevipalpus* virulíferas (HARTUNG et al., 2015). Bitancourt (1955) sugeriu que a doença observada no Brasil era a mesma ocorrida na Flórida, e que era causada por um vírus, devido às lesões circulares localizadas, tipicamente causadas por este tipo de patógeno. A etiologia viral da doença só foi demonstrada em 1970, pela visualização de partículas virais por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em folhas de *Citrus sinensis* sintomáticas (KITAJIMA et al., 1972a), sendo em seguida confirmada pela transmissão do vírus para novos tecidos por enxertia (CHAGAS; ROSSETTI, 1984). Hoje, através de estudos com materiais herbarizados sabe-se que leprose na Flórida era causada por VTB distintos aos que ocorrem no Brasil associados à leprose dos citros (BASTIANEL et al., 2010; HARTUNG et al., 2015).

A leprose dos citros se tornou prevalente na América do Sul, ocorrendo na maioria dos estados brasileiros (BASTIANEL et al., 2006; CÁCERES et al., 2013). Mais recentemente, Bolívia, Colômbia, Venezuela, e todos os países da América Central, além do México, foram incorporados ao mapa de distribuição da leprose dos citros (Figura 5) (CRUZ-JARAMILLO et al., 2014), o que a torna uma doença

considerada reemergente para alguns países (SUBBARAO et al., 2015). A chegada da leprose à América do Norte traz aos EUA a preocupação de que seus pomares sejam reinfectedos. Existe ainda uma ameaça potencial para outras regiões produtoras de citros devido à ampla distribuição do vetor (SALINAS-VARGAS et al., 2013). Relatos antigos mencionam a presença da doença na Ásia (China, Índia, Ceilão, Japão, Filipinas, Java) e África (Egito e África do Sul) (FAWCETT, 1936; BITANCOURT, 1955; CHOUDHARI; MALI 1978), porém não houve comprovações posteriores. Fora do continente americano, sintomas associados à leprose foram confirmados apenas no Havaí, EUA (MELZER et al., 2013a, 2013b) (Figura 5).

A leprose dos citros está associada a VTB presentes nos três gêneros descritos e, de acordo com o local de maturação do vírus na célula hospedeira, a leprose dos citros é amplamente subdividida em dois grupos: leprose do tipo nuclear e leprose do tipo citoplasmática (BASTIANEL et al., 2010). A leprose do tipo nuclear foi relatada no Panamá e em algumas regiões do Brasil (Figura 6A), entretanto o vírus não foi caracterizado molecularmente (BASTIANEL et al., 2010). No México, este tipo de doença é causada pelo CiLV-N e CiNSV (Figura 5B) e na Colômbia pelo CiLV-N (Figura 6C) (ROY et al., 2014a; CRUZ-JARAMILLO et al., 2014). Entretanto, a leprose típica e prevalente em pomares de citros desde o México até a Argentina é do tipo citoplasmática, causada por CiLV-C (BASTIANEL et al., 2010; LOCALI-FABRIS et al., 2012). Em algumas áreas da Colômbia, a leprose citoplasmática também é causada pelo CiLV-C2 (Figura 5C) (ROY et al., 2013b). Fora do continente americano, sintomas de leprose foram encontrados em limão volkameriano e foi associado à presença de HGSV-2 (Figura 5A) (MELZER et al., 2013b).

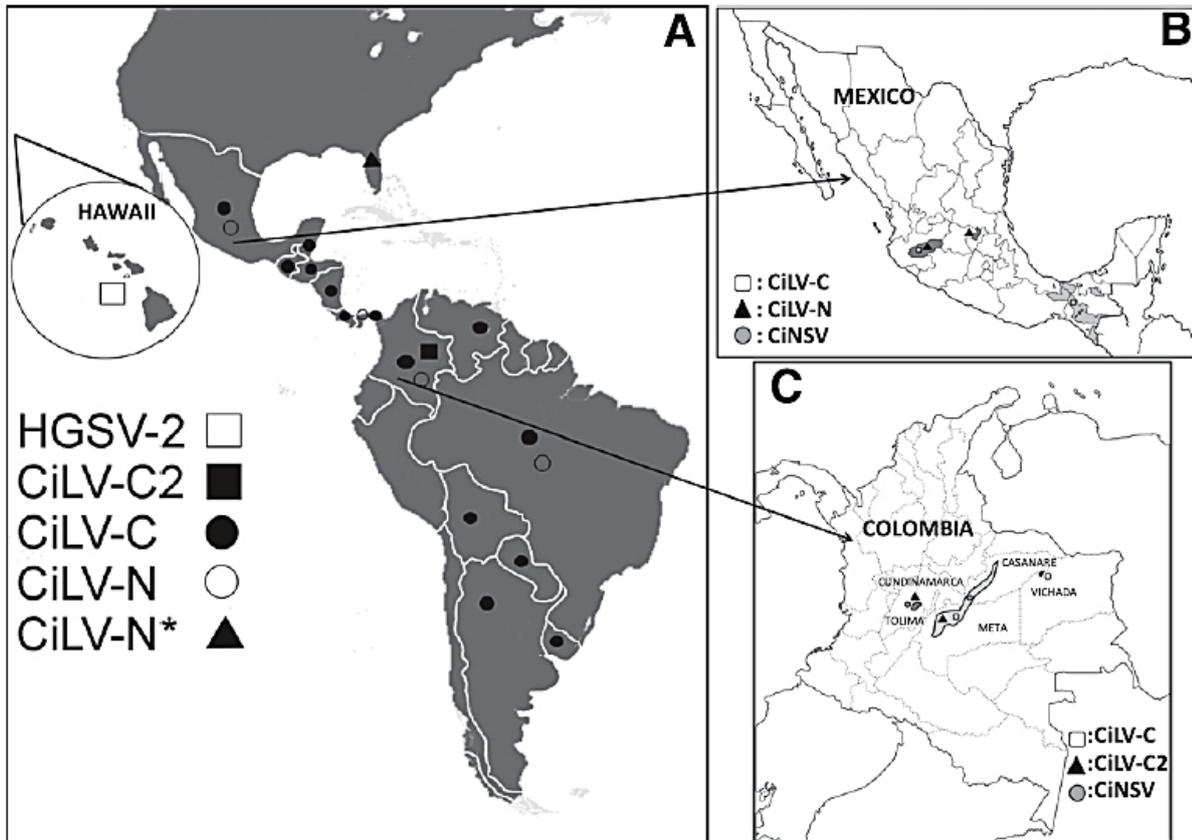


Figura 5 - Distribuição da diversidade de VTB associados à leprose dos citros no continente americano (retirado de ROY et al., 2015a). Em detalhe mostra a distribuição da leprose nuclear e citoplasmática em México (B) e Colômbia (C), (*) representa a presença de CiLV-N na Flórida, em 1968 e (o) relato de leprose nuclear no Brasil e no Panamá

No Brasil, CiLV-C infecta várias espécies dentro gênero *Citrus*, embora com diferentes graus de susceptibilidade: as laranjas doces (*C. sinensis*) são altamente suscetíveis, as tangerinas (*C. reshni* Tanaka, *C. reticulata* Blanco, *C. deliciosa* Tenore) apresentam-se como intermediárias, enquanto os limões (*C. limon* L. Osbeck) e as limas (*C. aurantifolia* Christmann Swingle) são considerados resistentes (BASTIANEL et al., 2009, 2010). Nos últimos anos, foram encontradas as primeiras hospedeiras naturais do CiLV-C fora do gênero *Citrus*: a rutácea *Swinglea glutinosa*, frequentemente usada como cerca-viva na Colômbia (LEÓN et al., 2008) e a trapoeraba (*Commelina benghalensis*), uma monocotiledônea invasora comum em pomares de citros no Brasil (NUNES et al., 2012). Experimentalmente, outras espécies vegetais distintas têm sido relatadas como hospedeiras do vírus. Através de inoculação mecânica, a leprose pode ser transmitida a *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor* e *C. quinoa* (COLARICCIO et al., 1995). Através da

infecção por ácaros virulíferos, a transmissão é eficiente para pelo menos 50 espécies vegetais (NUNES et al., 2012; GARITA et al., 2014), dentre elas a planta-modelo *Arabidopsis thaliana* (ARENA et al., 2013).

Em citros, a leprose caracteriza-se pelo surgimento de lesões cloróticas/anelares nas folhas, lesões corticosas nos ramos e lesões deprimidas cloróticas/pardas nos frutos (Figura 7) (RODRIGUES et al., 2003). Geralmente os sintomas são visíveis entre 17 a 60 dias após a infecção nos locais onde o ácaro se alimenta (BASSANEZI et al., 2002). Dependendo do número de lesões e sua época de aparecimento, os sintomas podem gerar desfolha, seca de ramos e queda prematura de frutos, promovendo redução drástica na produção. Sintomas mais severos podem surgir em decorrência de grandes infestações de ácaros virulíferos, podendo levar à diminuição da vida útil e até à morte de plantas altamente suscetíveis (RODRIGUES et al., 2001; BASSANEZI et al., 2002; BASTIANEL et al., 2009; 2010).

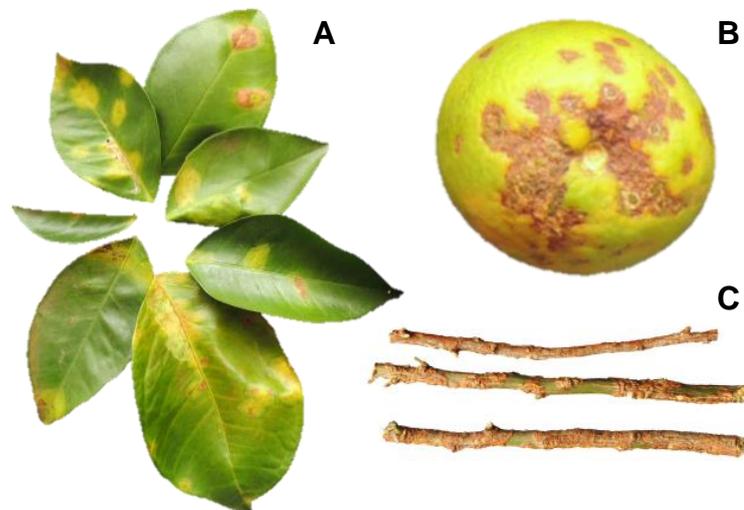


Figura 6 - Sintomas típicos da leprose em laranja doce (*Citrus sinensis*) infectada por CiLV-C. (A) folhas, (B) fruto e (C) ramos. Fonte: Pedro Ramos

2.4 Vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* sp. associados à mancha anular do cafeeiro

O cafeeiro *Coffea arabica* L., pertencente à família Rubiaceae, é originário do continente africano, das regiões altas da Etiópia (Cafa e Enária), podendo ser a região de Cafa responsável pela origem do nome café. É uma cultura de clima

tropical de altitude, adaptado a clima úmido e temperaturas amenas (GRANER et al., 1967). *C. arabica* é uma das espécies mais cultivadas no Brasil (BOARI et al., 2011).

Muitas doenças podem causar danos ao cafeeiro, podendo ser de origem fúngica, bacteriana ou causadas por nematoides e vírus. Uma única doença virótica foi detectada no cafeeiro até o momento, a mancha anular do cafeeiro, causada pelo CoRSV (BITANCOURT, 1938). Embora exista um crescimento da comercialização de café pela maioria dos países tropicais e subtropicais, o Brasil é o principal produtor e exportador mundial, sendo responsável pela produção de 35% dos grãos de café no mundo. Como tal, a presença de CoRSV na cultura é uma preocupação crítica (CHAGAS et al., 2003; FIGUEIRA, 2008; RAMALHO et al., 2014). A rápida disseminação desse vírus, que tem sido observada nesses últimos anos, poderia estar ligada a dois fatores: o primeiro seria um desequilíbrio ecológico, causado pelos tratos culturais intensivos, favorecendo o aumento populacional do ácaro vetor e o segundo seria devido a uma variabilidade no genoma do vírus, que o teria tornado mais facilmente transmissível (GIRÃO, 2007).

A mancha anular do cafeeiro foi relatada pela primeira vez em 1938, na cidade de Caçapava, SP (BITANCOURT, 1938). Kitajima e Costa (1972b), muitos anos depois, observaram em microscópio eletrônico, partículas baciliformes nas células dos tecidos foliares de cafeeiro infectado. Posteriormente, Chagas (1978) conseguiu transmitir CoRSV por *B. phoenicis* e também mecanicamente para plantas de *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor*. Em 1995, foi constatado em vários cafezais localizados na área do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, altas incidências da doença, causando desfolha e queda de frutos nas plantas afetadas. Em 2002, a mancha anular do cafeeiro foi relatada na Costa Rica (RODRIGUES et al., 2002). Nas Filipinas uma doença semelhante foi descrita, mas o vírus não foi identificado (REYES, 1961). Atualmente a doença encontra-se distribuída na maioria dos estados brasileiros e na Costa Rica (RAMALHO et al., 2014a, 2015). Sintomas relacionados à mancha anular do cafeeiro foi relatada em plantas de *Coffea* sp. em São Paulo, entretanto, parecem ser causados por um VTB distinto de CoRSV (CHAGAS et al., 2007).

CoRSV infecta naturalmente *Coffea* spp., *Psylanthus ebracteolatus*, também uma rubiácea (KITAJIMA et al., 2007) e uma ornamental, *Spatiphyllum wallisi* (NOVELLI et al., 2007). Há um caso de infecção experimental em maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) pelo CoRSV (MASCARENHAS et al., 2009). Além de

C. amaranticolor e *C. quinoa*, o CoRSV pode infectar várias outras hospedeiras experimentais como a *Tetragonia expansa*, *Alternanthera tenella*, *Nicotiana tabacum*, *Chenopodium ambrosioides*, *Amaranthus deflexus* (BOARI et al., 2003, 2004; ALMEIDA et al., 2006, 2008).

Os sintomas provocados por CoRSV se caracterizam por manchas cloróticas nas folhas (Figura 7A), geralmente em forma de anéis concêntricos. Os frutos apresentam manchas amareladas em forma de anéis ou irregulares e deprimidas (BITANCOURT, 1938; SILBERSCHMIDT, 1941; CHAGAS, 1973, 1978). Sintomas mais avermelhados são observados em algumas plantas (CHAGAS et al., 2007). Recentemente, foi observado que CoRSV pode induzir sintomas com uma variação de cor, de acordo com o clima e cultivar, sendo em alguns casos até difícil diagnosticar a doença (RAMALHO et al., 2015). Os tecidos afetados dos frutos parecem ficar mais suscetíveis a fungos diversos, de modo que dependendo das condições ambientais serem mais ou menos favoráveis à infecção fúngica, este pode também apodrecer, secar ou ambos, o que acarreta a sua queda. Investigações têm demonstrado que o CoRSV pode afetar a qualidade da bebida do café (REIS, 2001; BOARI et al., 2006), cuja perda da qualidade estaria relacionada com a diminuição da atividade da polifenoxidase e aumento de compostos fenólicos totais e açúcares. Como o teor de compostos fenólicos influencia diretamente na qualidade da bebida do café, a depreciação da bebida é diretamente proporcional ao aumento da severidade da mancha anular nos frutos do cafeeiro (GIRÃO, 2007). Mesmo nos casos em que o rendimento global das plantas infectadas por CoRSV não é afetado, queimaduras dos frutos infectados com o vírus expostos podem prejudicar seriamente a qualidade final da bebida de café, o qual por sua vez, se traduz em uma desvalorização acentuada dos frutos colhidos (BERTRAND et al., 2012).

Trabalhos realizados por Ramalho et al. (2014) revelaram que CoRSV isolado de Lavras, MG, foi capaz de infectar sistemicamente plantas de *C. quinoa*, quando mantidas a temperatura maiores que 28°C. A gama de hospedeiros de CoRSV pode ser influenciada significativamente por pequenas mudanças na temperatura. Esses resultados têm sérias implicações para a expansão do reservatório de vírus na natureza, particularmente sabendo-se que as previsões de que mudanças climáticas podem impactar negativamente a produção e qualidade do café (GROSS, 2009; ALMEIDA et al., 2012; BERTRAND et al., 2012; DAVIS et al., 2012;). Modelos de

previsão meteorológica sugerem um aumento de 2-4°C na temperatura média na maioria das regiões produtoras de café no Brasil (GROSS, 2009; BOARI et al., 2011; ZULLO et al., 2011; BERTRAND et al., 2012; RAMALHO et al., 2015).

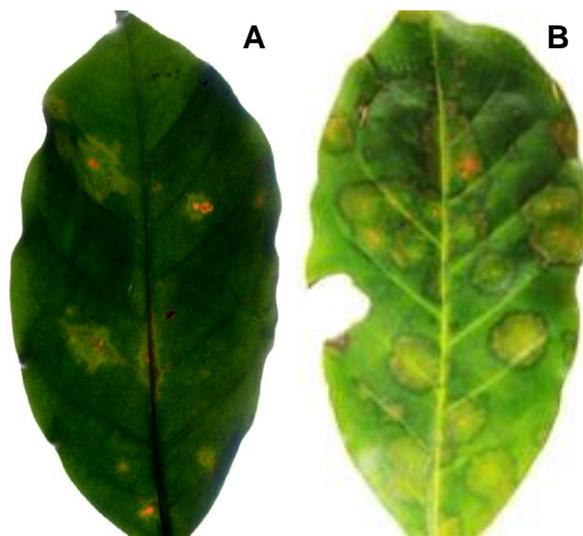


Figura 7 - Sintomas da mancha anular do cafeeiro em *Coffea* sp. infectado por VTB. (A) *Coffea* sp. infectado por CoRSV; (B) *Coffea* sp. apresentando sintomas semelhante, coletado em São Paulo. Fonte: Pedro Ramos

2.5 Vírus transmitidos por ácaros *Breviplus* spp. que afetam outras culturas e plantas ornamentais

Vírus transmitidos pelo ácaro *Breviplus* têm sido referenciados na literatura desde 1930, quando se sugeriu o envolvimento de *B. obovatus* na disseminação da leprose dos citros na América do Sul (SPEGAZZINI, 1920; VERGANI, 1945). Além de citros e café, existem diversas espécies vegetais que são afetadas por VTB, como *Passiflora* spp. e várias espécies ornamentais (KITAJIMA; MORAES, 2000; KITAJIMA et al., 2000, 2010; RAMOS-GONZALÉZ et al., 2015), entretanto, a maior parte desses VTB ainda não foi caracterizada molecularmente.

O Brasil é o principal produtor e exportar de maracujá. Maracujazeiros são plantas da família Passifloraceae, cultivadas para produção de frutos, fins ornamentais e produtos farmacológicos. O gênero *Passiflora* é originário da América do Sul e tem no Centro-Norte do Brasil o maior centro de distribuição geográfica. O

tipo mais cultivado é o amarelo (*Passiflora edulis* Deg. f. *flavicarpa* Sims.), cujo fruto é utilizado para produzir suco e polpa, sendo também conhecido pelo seu ativo calmante (ANTONIOLI-LUIZON, 2009).

Dentre as principais enfermidades da cultura do maracujazeiro encontra-se a pinta verde do maracujazeiro (KITAJIMA et al., 1997). Seu nome deriva de manchas verdes nos frutos amarelos e dos danos causados por lesões nas hastes que coalescem (ANTONIOLI-LUIZON, 2009). As manchas podem ocorrer em folhas senescentes, cloróticas ou ao longo das nervuras (Figura 8A). Lesões necróticas no caule são frequentemente observadas, acompanhado de infestação pesada pelo ácaro vetor, *Brevipalpus phoenicis*, lesões dos ramos podem se fundir, resultando no anelamento e morte das plantas e, eventualmente, a destruição de todo o pomar (KITAJIMA et al., 1997, 2003a).

A pinta verde do maracujazeiro foi relatada pela primeira vez no Brasil, no município de Vera Cruz, SP, causando sérios prejuízos às plantações (KITAJIMA et al., 1997). Uma enfermidade semelhante havia sido relatada na Bahia em 1994, denominada definhamento precoce do maracujazeiro (SANTOS FILHO; NASCIMENTO, 1997), hoje acredita-se que se trata da mesma doença (ANTONIOLI-LUIZON et al., 2009). Atualmente a doença encontra-se em vários outros estados como Minas Gerais, Rio de Janeiro, Sergipe, Rondônia, Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pará, além do Distrito Federal (KITAJIMA et al., 1997; SANTOS FILHO et al., 1997; MORAES et al.; 2006).

Até 2010 foram contabilizadas mais de 50 espécies de plantas ornamentais infectadas por VTB (KITAJIMA et al., 2010). O comércio internacional crescente dessas plantas facilita significativamente o risco de propagação desses vírus em novas áreas ainda não afetadas (CHILDERS; RODRIGUES, 2005). De forma semelhante, o comércio interno de ornamentais num país de grande extensão como o Brasil gera preocupações com relação a doenças e/ou pragas ainda restritas a algumas regiões (MIRANDA et al., 2007). É crescente a lista de VTB causando doenças em plantas ornamentais. A mancha da orquídea é a única doença que tem o seu agente etiológico caracterizado molecularmente, mas além dessa doença existe o relato da mancha anular de *Ligustrum* (VERGANI, 1942; KITAJIMA et al., 2003b), mancha clorótica do *Clerodendrum* (KITAJIMA E MORAES, 2000; KITAJIMA et al., 2001), mancha anular em *Solanum violaefolium* (KITAJIMA et al., 2001b, 2003b; FERREIRA, 2005;), mancha verde em *Hibiscus* (KITAJIMA et al., 2003b;

MELZER et al., 2013b), mancha anular em *Malvaviscus* (KITAJIMA et al.; 2003b), mancha anular de *Schefflera* (KITAJIMA et al., 1999), mancha anular da dama-da-noite (*Cestrum nocturnum*) (FREITAS-ASTÚA et al., 2002a, 2004), entre diversas outras doenças. De forma geral, essas viroses estão distribuídas pelo continente americano, entre países como Argentina, Brasil, Bolívia, Cuba e Panamá (FERREIRA, 2005).

As orquídeas são plantas ornamentais comercializadas em todo mundo, gerando centenas de milhões de dólares anualmente (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2015). A mancha da orquídea é causada pelo OFV, e afeta vários gêneros de orquídeas, induzindo sintomas de clorose e necrose (Figura 8B) (DOI et al., 1969; KUBO et al., 2006). Essa doença foi relatada pela primeira vez no Japão, em plantas de *Cymbidium* apresentando lesões locais cloróticas ou necróticas (DOI et al., 1969). Posteriormente, foi detectada em orquídeas na Austrália, Brasil, Dinamarca, Alemanha, Coréia, Costa Rica, Paraguai e EUA (KITAJIMA et al., 1974; LESEMANN; DORAISWAMY, 1975; CHANG et al., 1976; DOI et al., 1977; GIBBS et al., 2000; FREITAS-ASTÚA et al., 2002a; CHILDERS, 2003a; KITAJIMA et al. 2011a) e atualmente possui distribuição mundial (RAMOS-GONZALÉZ et al., 2015). A mancha da orquídea é a única doença causada por VTB que apresenta distribuição mundial, devido ao intenso tráfego internacional de orquídeas e a presença cosmopolita do ácaro vetor. Fora do continente, conhece-se apenas o caso da mancha clorótica da violeta (Violet ringspot virus) descrito na Austrália, embora não se saiba se está associada à infestação por *Brevipalpus* (GOWANLOCK; DIETZGEN, 1995).

Ligustrum spp. (Oleaceae) incluem muitos arbustos e árvores ornamentais. Vergani (1942) relatou um tipo de 'lepra explosiva' em *Ligustrum* sp. na Argentina e demonstrou que o vírus era transmitido por *B. obovatus*. Posteriormente a doença foi diagnosticada no Brasil, no Rio Grande do Sul (BITANCOURT, 1955). Em Curitiba, estudos de microscopia eletrônica de transmissão utilizando tecido de *Ligustrum* sp. infectado por VTB, revelaram a presença de viroplasma no citoplasma das células infectadas, expondo assim efeitos citopatológicos do tipo citoplasmático (LIMA et al., 1991). Essas observações foram confirmadas em plantas de *Ligustrum lucidum* em Piracicaba, SP (Figura 8C) e a doença ficou conhecida como mancha anular do ligustro, causada pelo *Ligustrum* ringspot virus (LigRSV) (KITAJIMA et al., 2010).

Atualmente a doença está distribuída em várias regiões do Brasil e na Argentina (VERGANI, 1942; KITAJIMA et al., 2010).

O gênero *Clerodendrum* (Verbenaceae) possui várias espécies arbustivas, muitas delas utilizadas para fins ornamentais, incluindo *Clerodendrum speciosum* (Gürke), conhecido como coração-sangrento (KITAJIMA et al., 2003a). Em 2000, foram encontrados sintomas de mancha clorótica em *Clerodendrum* sp. em um jardim de Piracicaba, SP (Figura 8D), associados à infestação por *B. phoenicis* (KITAJIMA; MORAES, 2000; KITAJIMA et al., 2003a). A doença foi chamada de mancha clorótica de *Clerodendrum*, causada pelo *Clerodendrum chlorotic spot virus* (CICSV) (KITAJIMA; MORAES, 2000; GOMES, 2010). Verificou-se também a disseminação natural desse vírus de coração-sangrento para outras espécies, como *Chenopodium quinoa* e *C. amaranticolor* (KITAJIMA et al., 2005). Essas plantas, quando mantidas a 28-30°C, apresentam a movimentação sistêmica de CICSV, caracterizada pelo clareamento das nervuras e pelas manchas cloróticas generalizadas (ALCÂNTARA et al., 2005). Atualmente a mancha clorótica em *Clerodendrum* encontra-se distribuída nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Pará, Amazonas e Distrito Federal (LAL; MUKHARJI, 1979; KITAJIMA et al., 2003a; GOMES et al., 2010).

Solanum violaefolium é uma planta herbácea perene que produz pequenas flores brancas e é utilizada como ornamental em diversas regiões do Brasil (KITAJIMA et al., 2003a). Em Piracicaba, SP, foram relatadas manchas anelares em *S. violaefolium* associadas à VTB (Figura 8E). A doença foi denominada mancha anular do *Solanum violaefolium* (KITAJIMA; MORAES, 2000). A transferência de *B. phoenicis* encontrados nessas plantas para *S. violaefolium* sadias resultou em sintomas semelhantes, completando os Postulados de Koch. Cortes ultrafinos a partir dessas lesões permitiram a observação de partículas baciliformes e efeitos citopatológicos do tipo citoplasmático (KITAJIMA; MORAES, 2000). A transmissão desse vírus resultou em lesões cloróticas/necróticas em várias hospedeiras, como *Datura stramonium* L., *Nicotiana tabacum* L., *N. benthamiana* Domin., *N. glutinosa* L., *N. clevelandii* Gray., *Cymbidium* sp., *Capsicum frutescens* L., *Catharantus roseus* (L.) G. Don., *Bidens pilosa* L., e *Gomphrena globosa* L. (KITAJIMA; MORAES, 2000; KITAJIMA et al., 2001). Essa doença está associada ao SvRSV, mas pouco se conhece sobre as características moleculares deste VTB. Além de São Paulo, a

mancha anular do *S. violaefolium* está presente no Piauí (E.W. KITAJIMA¹, comunicação pessoal).

Sintomas de manchas cloróticas e verdes foram identificados em várias espécies de hibisco (Figura 8F) (KITAJIMA et al., 1999; 2003a). A doença ficou conhecida como a mancha verde do hibisco, causada por um VTB do tipo citoplasmático *Hibiscus green spot virus* (HGSV). Sintomas semelhantes foram observados em *Hibiscus* spp. coletados em várias regiões do estado de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia, Distrito Federal, além de Panamá, Havaí e Nova Zelândia (KITAJIMA et al., 2010, 2003a). O isolado do Havaí, encontrado em *H. arnottianus*, foi completamente sequenciado, e observou-se que se trata de vírus diferente daquele relatado no Brasil, tendo sido denominado *Hibiscus green spot virus 2* (HGSV-2) (MELZER et al., 2013b). Ainda em 2013, Melzer et al. (2013a) relataram sintomas associados à leprose em *Hibiscus* sp. no Havaí. A doença foi chamada de mancha anular do hibisco e é causada pelo CiLV-C2 Hw.

¹ KITAJIMA, E.W. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

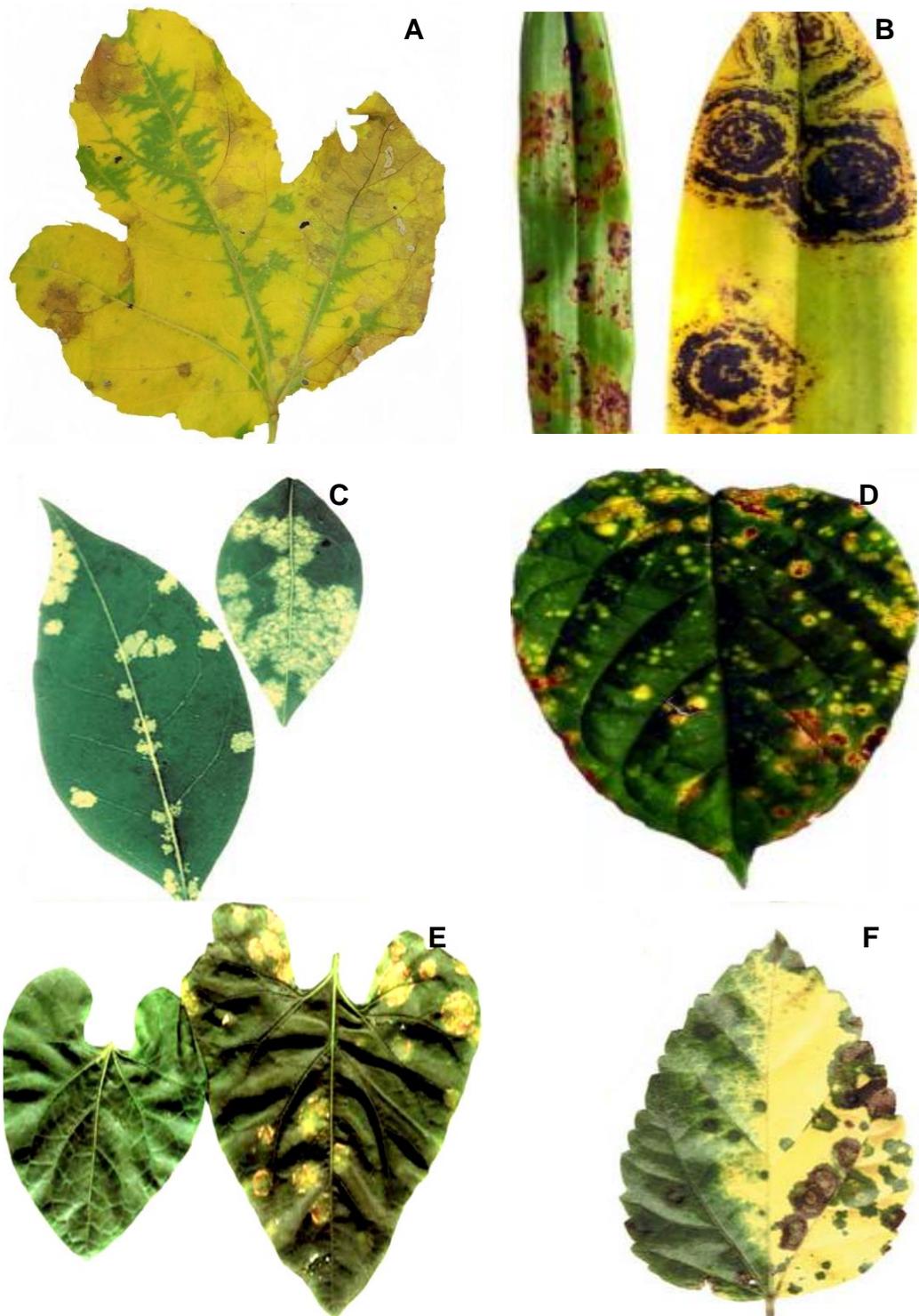


Figura 8 - Sintomas de clorose e/ou necrose associados a VTB em plantas hospedeiras. (Retirado de Kitajima et al., 2010; 2003a;) (A) Pinta verde do maracujazeiro; (B) Mancha da orquídea; (C) Mancha anular do *Ligustrum*; (D) Mancha anular do *Clerodendrum*; (E) mancha anular do *Solanum violaefolium*; (F) mancha verde em *Hibiscus*

2.6 Taxonomia e biologia de *Brevipalpus* spp.

A família Tenuipalpidae Berlese inclui mais de 600 espécies em 30 gêneros (SMILEY; GERSON, 1996) e, juntamente com as famílias Tetranychidae, Tuckerellidae e Linotetranaidae, é agrupada na superfamília Tetranychoidea, subordem Prostigmata, classe Arachnida e subclasse Acari. Dentro da família Tenuipalpidae, o gênero *Brevipalpus* Donnadieu possui aproximadamente 300 espécies (CHILDERS et al., 2003a).

O *Brevipalpus* spp. é uma espécie polífaga e apresenta distribuição cosmopolita, sendo encontrado na África, Ásia, Austrália, Europa, América do Norte, Central e do Sul e Ilhas do Pacífico (HARAMOTO, 1969; KITAJIMA et al., 2003a; 2010; ROY et al., 2015a). Dentro deste gênero um pequeno número de espécies é reconhecido como vetores de fitovírus: *Brevipalpus californicus* (Banks) (Figura 9A), *B. obovatus* (Donnadieu) e *B. phoenicis* (Geijskes) (Figura 9B) (GONZÁLES, 1975). As três principais espécies de *Brevipalpus* foram relatadas em 928 espécies de plantas em 513 gêneros distribuídas em 139 famílias (CHILDERS et al., 2003a). As hospedeiras consistem de monocotiledôneas, dicotiledôneas, plantas anuais, perenes, plantas ornamentais, entre outras (FERREIRA, 2005).

Recentemente foi realizada uma revisão sobre a taxonomia de *Brevipalpus* spp., e atualmente *B. phoenicis* é considerado um complexo morfológico de espécies (BEARD et al., 2015). Pela classificação atual, *B. hondurani* (Evans), *B. papayensis* (Baker), *B. phoenicis* (Geijskes) e *B. yothersi* Baker (Figura 9C) são consideradas novas espécies (BEARD et al., 2015). De interesse particular são *B. yothersi* e *B. papayensis*, considerados as principais espécies até pouco tempo classificadas como *B. phoenicis* em plantas de citros e café, respectivamente. Ambas as espécies são comprovadamente vetoras de CiLV-C e CoRSV (NUNES, NOVELLI e FREITAS-ASTÚA, dados não publicados). Métodos moleculares de caracterização dessas espécies são necessários para uma detecção mais prática e ampla pois, até o momento, as características morfológicas são as mais utilizadas para a diferenciação entre algumas espécies (Figura 9D; E; F) (ROY et al., 2015a). O complexo morfológico de espécies também é sugerido para *B. californicus* e *B. obovatus* (BEARD et al., 2015).

Ácaros *Brevipalpus* reproduzem-se em geral por partenogênese telítoca, onde fêmeas não fecundadas dão origem a fêmeas idênticas à progenitora, embora

ocasionalmente se desenvolvam machos (CHILDERS et al., 2003a). *B. phoenicis* encontra-se na natureza exclusivamente na forma haplóide, isto é, possuem dois cromossomos que são geneticamente distintos não havendo cromossomos homólogos. A feminilização é atribuída à infecção de uma bactéria endossimbiótica do gênero *Cardinium*, resultando em uma diminuição dos machos na população (WEEKS et al., 2001). Novas pesquisas demonstram que essas bactérias também estão presentes em populações de *B. californicus* e *B. obovatus*, em diferentes regiões do mundo (WEEKS et al., 2003; CHIGIRA; MIURA, 2005; NOVELLI et al., 2005). O ciclo de vida típico do ácaro *Brevipalpus* compreende ovo, larva, protoninfa, deuteroninfa e adulto, sendo que entre cada estágio de vida ocorre o desenvolvimento imóvel, porém fisiologicamente ativo, denominada crisálida (CHILDERS, 2003a). A duração de cada estágio de vida é dependente das condições ambientais, podendo em condições favoráveis ter uma sobrevivência de quase 2 meses, com postura de 30-40 ovos (CHIAVEGATO, 1986).

Os processos de aquisição e inoculação dos VTB pelo *Brevipalpus* ocorrem mediante alimentação em substratos contaminados (GOMES, 2010). O ácaro inicia seu processo de alimentação com a perfuração da célula pelo seu estilete retrátil e injeção de saliva para uma pré-digestão do conteúdo celular, seguidas da retração do estilete e posterior ingestão do conteúdo celular extravasado. Assim, a aquisição ocorre durante a ingestão do conteúdo celular contendo o vírus e a inoculação através da injeção de saliva previamente contaminada (RODRIGUES, 1995).

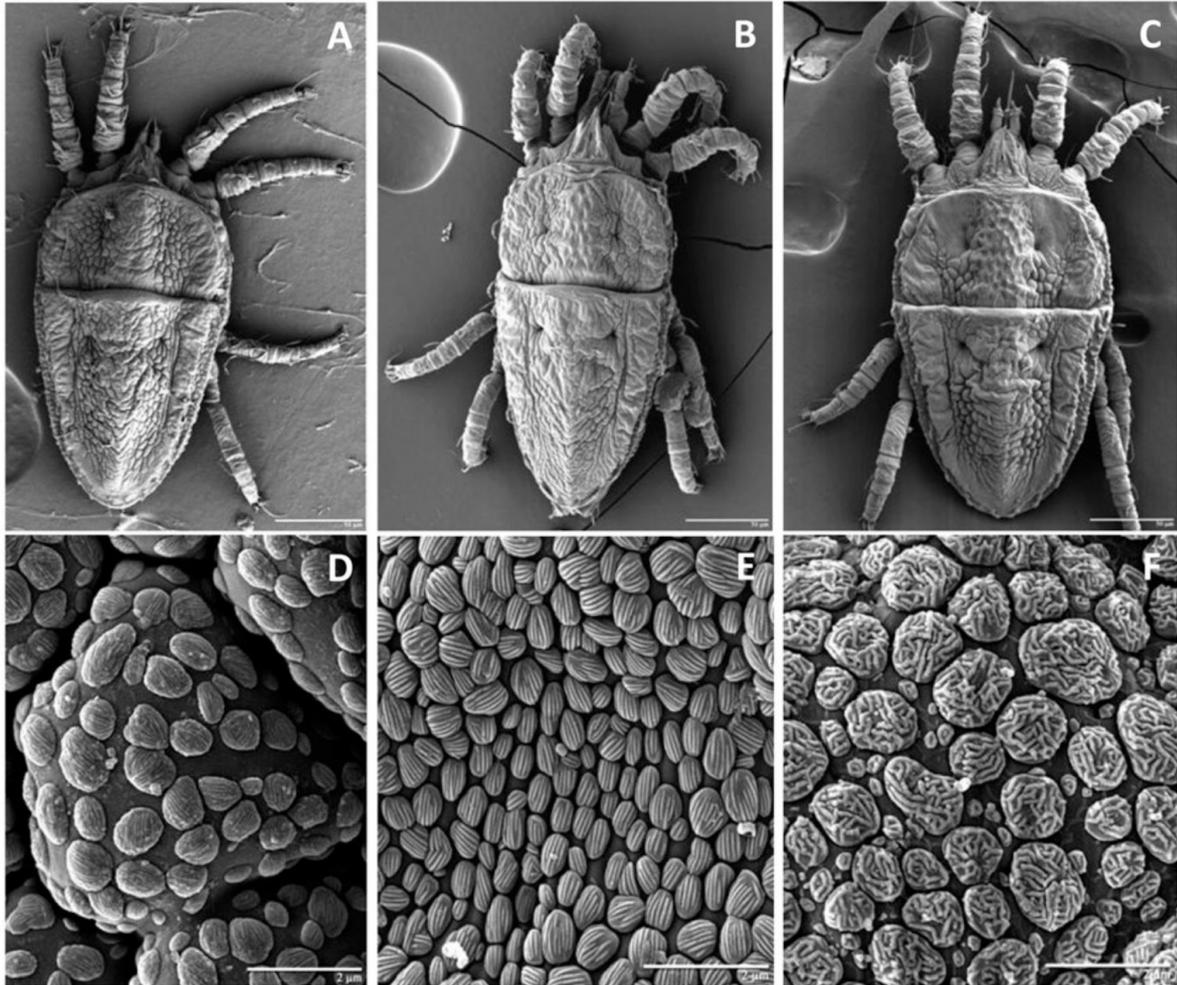


Figura 9 - Identificação morfológica das espécies de *Brevipalpus* vetores de CiLV-C e CiLV-N através de microscopia eletrônica de varredura. (retirado de Roy et al., 2015a). (A) *B. californicus*; (B) *B. yothersi*; (C) *B. phoenicis*; (D) Padrão circular das microplacas de *B. californicus*; (E) *B. yothersi* e (F) *B. phoenicis*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) apresentando sintomas característicos de leprose dos citros foram coletadas em diferentes regiões geográficas do Brasil no período de 2014-2015 e enviadas para o laboratório de Biotecnologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (CCSM). Cada folha foi fotografada e as áreas com sintomas foram armazenadas a -80°C para posterior extração do RNA total. Extratos de RNA totais obtidos a partir de amostras de laranja doce com características semelhantes coletadas no período de 2011-2013 encontravam-se armazenados a -80° no laboratório de Biotecnologia do CCSM. Todos os extratos de RNA total obtidos no período de 2011-2015 foram utilizados como parte do estudo da filogenia e variabilidade genética do *Citrus leprosis virus C* no Brasil. Entre as amostras utilizadas nas análises foi incluída uma amostra de *Commelina benghalensis* coletada em um pomar de São José do Rio Preto, SP (SJRP) e uma amostra de laranja doce coletada na Argentina.

Para caracterização completa de uma estirpe de CiLV-C coletada em SJRP (CiLV-C SJRP) foi utilizada uma das amostras de laranja doce que também fez parte da coleção para o estudo da população dessa espécie no Brasil. A amostra utilizada para a caracterização completa do Coffee ringspot virus Limeira, SP (CoRSV Limeira), foi uma planta de *Coffea arabica* apresentando sintomas típicos da mancha anular do cafeeiro coletada na fazenda Ibicaba, Limeira, SP, em 2014. As áreas sintomáticas foram fotodocumentadas e, posteriormente, armazenadas a -80°C.

3.2 Transmissão dos VTB para *Arabidopsis thaliana* mediada por *Brevipalpus* spp.

Foi realizado também um experimento de eficiência de transmissão da estirpe CiLV-C SJRP para *A. thaliana* e *C. sinensis* sadias. Neste caso, frutos apresentando sintomas de leprose foram coletados na planta de *C. sinensis* em SJRP e enviados para o laboratório de Acarologia do CCSM. Ácaros *B. yothersi* (isolinha 1A) foram transferidos para os frutos de laranja doce, onde foram mantidos por três dias para aquisição do vírus e utilização no experimento de inoculação. Foram utilizadas

nesse teste 10 plantas de *C. sinensis* e 15 de *A. thaliana*. Três folhas de cada planta foram selecionadas e cada folha foi infestada com 5 ácaros. A detecção do vírus foi realizada por RT-PCR utilizando os iniciadores para detecção de CiLV-C (Locali et al., 2003). As plantas de *A. thaliana* sintomáticas e detectadas com o vírus foram utilizadas como fonte secundária para a caracterização completa da estirpe SJRP.

Todas as plantas foram mantidas a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas numa câmara de crescimento controlado *Adaptis-1000* (CONVIRON, Canadá). Após aparecimento dos sintomas, as folhas foram coletadas e armazenadas a -80°C até posterior extração de RNA total.

3.3 Extração de RNA total e análise de qualidade e integridade

O RNA total das folhas com lesões causadas pelos VTB foi extraído mediante a utilização do reagente Trizol® (*Thermo Scientific*). Aproximadamente 500 mg de tecido vegetal foi macerado com nitrogênio líquido e o protocolo foi conduzido de acordo com as recomendações do fabricante. Na última etapa de lavagem, a solução de etanol 75% foi substituída por etanol absoluto. Nos casos em que foi utilizada *Arabidopsis thaliana* como hospedeira experimental dos VTB, o RNA total foi extraído a partir do tecido de todas as folhas inoculadas e pelo mesmo método. Todo o material utilizado para a extração foi previamente tratado com DEPC (dietilpirocarbonato), com o intuito de inativar RNases, e esterilizado em autoclave.

O RNA extraído foi quantificado usando-se o equipamento *NanoDrop ND-8000 spectrophotometer* (*Thermo Scientific*). A análise qualitativa (verificação de pureza e integridade) foi realizada pela visualização em gel de agarose 1,2% dos extratos resultantes. Posteriormente, todos os extratos de RNA total foram armazenados a -80° no laboratório de Biotecnologia do CCSM. A partir das amostras de RNA utilizadas para caracterização completa dos VTB também foi realizada uma análise quantitativa pelo equipamento *Bioanalyzer 2100* (*Agilent Tecnologias*), na FASTERIS (Plan-les-Ouates, Suíça), e parte deste RNA foi mantida no laboratório do CCSM, para posterior validação do sequenciamento.

3.4 Detecção dos VTB associados à leprose dos citros por RT-PCR

Para a detecção por RT-PCR dos possíveis VTB nas amostras de citros e de *Commelina benghalensis* foram utilizados os iniciadores descritos para a amplificação de regiões genômicas de CiLV-C, CiLV-C2 e CiLV-N (Tabela 1). Cerca de 500 ng de RNA total foi utilizado para síntese de cDNA com o kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific)* e com os iniciadores específicos. Os ciclos térmicos foram independentes para cada par de iniciadores. Os produtos obtidos por RT-PCR foram observados em gel de agarose 0,8%. Todo o material utilizado foi previamente tratado com DEPC (dietilpirocarbonato) e esterilizado em autoclave.

Tabela 1 – Lista de iniciadores utilizados na detecção de VTB associados à leprose dos citros

VTB	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Referência
CiLV-C	MP-F: GCGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC	(Locali et al., 2003)
	MP-R: TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT	
CiLV-C2	p29-F: ATGAGTAACATTGTGTCGTTTTTCGTTGT	(Roy et al., 2013b)
	p29-R: TCACTCTTCCTGTTTCATCAACCTGTT	
CiLV-N	N-F: ATGGCTAACCCAAGTGAGATCGATTA	(Roy et al., 2014a)
	N-R: AGTTGCCTTGAGATCATCACATTGGT	

3.5 Sequenciamento de sRNA dos vírus transmitidos por *Brevipalpus* spp.

Os extratos dos RNA totais obtidos a partir de citros e café foram utilizados para a caracterização completa de CiLV-C SJRP e CoRSV Limeira, respectivamente. Também foi sequenciada a planta de *Arabidopsis thaliana* infectada com CiLV-C SJRP obtida no experimento de transmissão, descrito no item 3.2. O RNA total de cada amostra foi enviado para o sequenciamento utilizando tecnologia NGS (*next generation sequencing*) da plataforma Illumina GA IIX na empresa FASTERIS. Anterior ao processo de sequenciamento, as amostras de RNA foram submetidas a uma separação em gel de acrilamida, para seleção do RNA de pequeno tamanho (sRNA). No caso das sequências utilizadas no estudo da variabilidade molecular dos vírus associados à leprose dos citros foi realizado apenas um sequenciamento parcial de todos os isolados. Esse procedimento encontra-se mais detalhado no item 3.6.

3.5.1 Validação do sequenciamento

Para validar as sequências obtidas pelo método NGS e obter ampliações de alguns *gaps* que sobraram das montagens, foi desenhado e sintetizado um conjunto de iniciadores que cobrem todo o genoma de CiLV-C SJRP e CoRSV Limeira. Os iniciadores foram desenhados com auxílio do programa *Primer3* de forma a obter *amplicons* parcialmente sobrepostos entre eles, determinando assim o sequenciamento completo do genoma de cada VTB.

A partir de 500 ng do RNA total de cada amostra original que se encontrava no CCSM foi realizada a síntese de cDNA, com o *Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific)*, utilizando os iniciadores específicos para cada região do genoma. Os ciclos térmicos foram os seguintes: um ciclo de 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto e, um ciclo de extensão de 72°C durante 10 minutos. As ampliações foram confirmadas em gel de agarose 0,8%.

Os fragmentos gerados por RT-PCR foram purificados com o kit *Wizard SV and PCR clean-up system (Promega)*. Cerca de 100 ng de cada fragmento foi utilizado para a reação de ligação utilizando o vetor *pGEM-T-easy vector (Promega)*. A reação foi mantida a 16°C no escuro por 12 h e, posteriormente, utilizada na transformação genética de *Escherichia coli* DH5 α . A presença de plasmídeos recombinantes nas células de *E. coli* transformadas foram confirmadas por digestão utilizando a enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas). Os plasmídeos foram purificados com o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega)*. De três a seis clones de cada fragmento do genoma de cada VTB foram sequenciados utilizando os iniciadores específicos dos fragmentos e também com os iniciadores universais do vetor *pGEM-T-easy*, Sp6 e T7 (Promega). O método de sequenciamento utilizado foi o Sanger utilizando o kit *Terminator 3.1 (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA)* e o sequenciador automático ABI Prism 3730 (*Applied Biosystems, CA, USA*). Todas as sequências geradas foram analisadas no programa *Vector NTI (Life Technologies)* e depositadas no banco de dados do GenBank.

Os fragmentos gerados foram analisados no programa *Vector NTI (Life Technologies)* e comparados com as sequências geradas por NGS. As sequências consenso determinaram os genomas finais dos vírus estudados. A sequência completa do genoma do CiLV-C SJRP foi depositado no GenBank, e a do CoRSV

está em fase de validação, mas posteriormente também será depositada no banco de dados.

3.6 Sequenciamento parcial dos isolados de CiLV-C

O RNA total de todos os isolados de CiLV-C extraídos a partir de citros e *Commelina benghalensis* coletadas no período de 2011-2015 em diversas regiões geográficas no Brasil foram utilizadas no estudo da variabilidade molecular da população deste vírus. Para tanto, foi realizada a amplificação de quatro regiões do genoma viral, entre elas uma do RNA1 e três do RNA2 de todos os isolados. Os iniciadores utilizados nas RT-PCR estão descritos na Tabela 2. Para o RNA1 foi amplificado um fragmento parcial de 820 nt do gene *p29*, no RNA2 foi amplificado um fragmento de 680 nt do gene *p15*, 960 nt da região intergênica (RI) e também 292 nt do gene *MP*.

Tabela 2 - Lista de iniciadores utilizados no sequenciamento parcial de isolados de CiLV-C coletados em diferentes regiões do Brasil

Região do genoma de CiLV-C	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Referências
RNA1		
<i>p29</i>	F: ATGAGTATCGTAACTTTCACTTTGAC	Este trabalho
	R: ACCAGAGATTAGCGATTCAAAA	
RNA2		
<i>p15</i>	F: GTCAAGTGATATACCATTTTGCTTG	Este trabalho
	R: TCATCGTCTTTTCTGTAACCG	
RI	F: CGCACATAATAACGCTGCTG	Este trabalho
	R: AGCAGATGATGGATGTCGG	
<i>MP</i>	F: GCGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC	(Locali et al., 2003)
	R: TGTATACCAAGCCGCTGTGAACT	

A síntese de cDNA foi realizada com *Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis*, com os iniciadores hexâmeros aleatórios e utilizando 500 ng de RNA total. Cerca de 5µl de cDNA foi utilizado na PCR com kit *GoTaq® Colorless Master Mix* (Promega) e utilizando os iniciadores específicos para amplificação de cada fragmento de CiLV-C (Tabela 2). Os ciclos térmicos foram os seguintes: um ciclo de 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 54°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, um ciclo de extensão de 72°C durante 10 minutos. As amplificações foram confirmadas em gel de agarose 0,8%. Os procedimentos desde a purificação dos produtos de RT-PCR até análise dos dados são os mesmos utilizados no resequenciamento, descritos no item 3.5.1.

3.7 Análise da filogenia e variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil

Para o estudo das relações filogenéticas da população de CiLV-C foi realizado um alinhamento múltiplo de todas as sequências das quatro regiões do genoma do vírus, utilizando o algoritmo MUSCLE implementado no programa MEGA6 (TAMURA et al., 2013). O melhor modelo de substituição de nucleotídeos para cada conjunto de sequências foi também estimado utilizando o MEGA6. Os modelos selecionados para os dados de *p29*, *p15* e *MP* foi o Kimura -2 parameter (K2), enquanto para o segmento do RNA2, que englobou as sequências concatenadas de *p15*, *RI* e *MP*, foi Tamura Nei (TN93). Esses modelos foram utilizados para estimar as distâncias de nucleotídeos e as relações filogenéticas foram inferidas utilizando os métodos Neighbour-joining (NJ) e máxima verossimilhança (Maximum Likelihood). A robustez das relações evolutivas nas árvores filogenéticas geradas foi avaliada mediante o método de *bootstrap* com 1000 réplicas.

As análises de variabilidade genética e outros parâmetros genéticos da população de CiLV-C foram estimados utilizando o programa DnaSP (versão 5.10.01) (Librado e Rozas, 2009), a partir do alinhamento de múltiplas sequências. Também foram realizados testes de neutralidade, onde foi calculado a pressão de seleção de *p29*, *p15* e *MP* dos isolados de CiLV-C. Estimou-se o cálculo de ratio (ω) de substituições de nucleotídeos não sinônimas- dN (mutações não conservadas) e substituições sinônimas- dS (mutações silenciosas) através do MEGA6, utilizando o modelo Kumar e *bootstrap* de 1000 réplicas. Para detecção dos sítios de seleção foram consideradas as ferramentas SLAC (Single likelihood ancestor counting), FEL (Fixed effects likelihood) e REL (Random effects likelihood), que são métodos implementados no pacote Hyphy (DELPOR et al., 2010). Os códons foram considerados sob seleção quando eram indicados por pelo menos dois métodos. O modelo de substituição de melhor ajuste para cada conjunto de sequências foi selecionado pelo programa e cada haplótipo foi representado apenas uma vez nas análises. Antes das análises, os alinhamentos foram verificados para a recombinação utilizando o algoritmo GARD também implementado no pacote Hyphy.

Eventos de recombinação entre os isolados de CiLV-C sequenciados foram estimados utilizando nove métodos (RDP, GENECONV, Bootscan, MaxiChi,

Chimera, SiScan, LARD, PhylPro e 3Seq) do programa RPD v4.43 (Martin et al., 2010). Alinhamentos das sequências de nucleotídeos (*p29* e concatenado de *p15-IR-MP*) obtidos pelo MEGA6 foram executados no RDP4, utilizando as configurações padrão. Aqueles eventos recombinantes detectados por três ou mais dos métodos ($p \leq 0.05$) foram considerados nas análises.

Também foi realizado um estudo sobre a estrutura secundária da proteína *p29* de todas as espécies descritas para o gênero *Cilevirus*. Para isso as sequências de aminoácidos deduzidos da proteína de CiLV-C Cor (GenBank ABC75822), CiLV-C SJRP (KP336746), CiLV-C2 Colômbia (ABA42876), e CiLV-C2 Havaí (AGM16552) foram alinhadas e suas estruturas secundárias foram obtidas utilizando o programa PROMALS (Pei e Grishin, 2007).

3.8 Detecção diferencial entre os isolados CiLV-C Cor e CiLV-C SJRP por RT-PCR

A fim de desenvolver um ensaio de detecção diferencial para as linhagens de CiLV-C Cor e CiLV-C SJRP, foram desenhados dois pares de iniciadores específicos que amplificam parcialmente o gene *p29* de cada isolado. Os iniciadores foram projetados abrangendo a região de inserção de três aminoácidos observada na sequência da *p29* de CiLV-C SJRP, quando comparado com CiLV-C Cor. As regiões divergentes foram selecionadas para a síntese dos iniciadores, a fim de amplificar os fragmentos de tamanhos específicos de cada isolado.

A validação da detecção diferencial por RT-PCR foi realizada com amostras representativas das duas linhagens de CiLV-C em diferentes hospedeiras, as RT-PCR foram realizadas como mencionado anteriormente no item 3.5.1. Os produtos de RT-PCR foram purificados e sequenciados para confirmação da sua identidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Filogenia e variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil

A leprose dos citros está amplamente distribuída desde o México até a Argentina, sendo o *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) o VTB prevalente nessas regiões (BASTIANEL et al., 2010; LOCALI-FABRIS et al., 2012; DIETZGEN et al., 2014). No entanto, a recente caracterização molecular de novos VTB associados à leprose dos citros no México, na Colômbia e no Havaí possibilitou a disponibilização de técnicas de detecção específicas para cada VTB conhecido (MELZER et al., 2013b; CRUZ-JARAMILLO et al., 2014; ROY et al., 2014a).

Sendo assim o primeiro objetivo deste trabalho foi verificar quais espécies vírais estão associadas à leprose dos citros no Brasil. Para tanto, foi montada uma coleção de amostras de citros com sintomas característicos causados pela doença (lesões locais cloróticas e necróticas). As amostras foram coletadas no período de 2011-2015 em diferentes regiões geográficas do país. Nesta coleção foi incluída também uma amostra da Argentina e outra de *Commelina benghalensis* coletada em São José do Rio Preto, SP. Esse levantamento gerou um conjunto de 47 isolados (Tabela 3), sendo 58% correspondente ao estado de São Paulo, a principal região produtora de laranja doce no mundo (NEVES et al., 2011).

Inicialmente, a presença dos vírus associados à leprose dos citros (CiLV-C, CiLV-N e CiLV-C2) foi avaliada por meio de RT-PCR utilizando iniciadores específicos (LOCALI et al., 2003; ROY et al., 2013b, 2014a). Nenhuma das 47 amostras geraram produtos de RT-PCR para CiLV-N e CiLV-C2; entretanto, todas as amostras produziram fragmentos com o tamanho esperado de 320 pb com os iniciadores específicos para detecção de CiLV-C (Figura 10). Esses resultados demonstram que a leprose dos citros prevalente no Brasil é causada pelo CiLV-C, como tinha sido observado previamente (BASTIANEL et al., 2010). Há relatos de VTB-N associados à leprose no Brasil; porém em baixa incidência (BASTIANEL et al., 2010). Além disso, é possível que esse vírus sejam diferentes aos caracterizado em outros países, o que justificaria sua não detecção no presente trabalho. Quanto ao CiLV-C2, até o momento a presença desse vírus em citros encontra-se restrita à Colômbia, onde este vírus parece estar substituindo a população anterior de CiLV-C (ROY et al., 2013a, 2015a).

Tabela 3 - Lista dos isolados de CiLV-C utilizados no estudo de variabilidade e filogenia

(continua)

Identificação do isolado, cidade e Estado da coleta ^a	Ano da coleta	Região do genoma viral ^b	Nº de acesso no GenBank	Referência
Isolados do Brasil				
CiLV-C Alfenas Alfenas, MG	2012	<i>p29</i>	KR093040	Este trabalho
CiLV-C Amparo Amparo, SP	2012	<i>p29</i>	KR093041	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093078	
		RI	KR093139	
		MP	KR093106	
CiLV-C Aracaju Aracaju, SE	2012	<i>p29</i>	KR093042	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093079	
		RI	KR093140	
		MP	KR093107	
CiLV-C Araras Araras, SP	2014	<i>p29</i>	KR093043	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093080	
		RI	KR093141	
		MP	KR093108	
CiLV-C Belém Belém, PA	2012	<i>p29</i>	KR093045	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR136415	
		RI	KR093143	
		MP	KR093110	
CiLV-C Borborema I Borborema, SP (<i>Commelina benghalensis</i>)	2012	MP	JQ944802	Nunes et al., 2012
CiLV-C Borborema II Borborema, SP	2012	<i>p29</i>	KR093046	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093084	
		RI	KR093144	
		MP	KR093112	
CiLV-C Brasília Brasília, DF	2012	<i>p29</i>	KR093047	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093085	
		RI	KR093145	
		MP	KR093113	
CiLV-C Campinas Campinas, SP	2012	<i>p29</i>	KR093049	Este trabalho
CiLV-C Casa Branca Casa Branca, SP	2012	<i>p29</i>	KR093050	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093086	
CiLV-C Colina Colina, SP	2012	<i>p29</i>	KR093051	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093082	
		<i>p29</i>	KR093048	
		<i>p15</i>	KR093087	
CiLV-C Comendador Gomes Comendador Gomes, MG	2012	RI	KR093146	Este trabalho
		MP	KR093114	
		<i>p29</i>	KR093052	
		<i>p15</i>	KR093088	
CiLV-C Conchal Conchal, SP	2012	IR	KR093147	Este trabalho
		MP	KR093115	

Tabela 3 - Lista dos isolados de CiLV-C utilizados no estudo de variabilidade e filogenia (continuação)

Identificação do isolado, cidade e Estado da coleta ^a	Ano da coleta	Região do genoma viral ^b	Nº de acesso no GenBank	Referência
Isolados do Brasil				
CiLV-C Cordeirópolis I Cordeirópolis, SP	2006	RNA1	DQ352194	Locali-Fabris et al., 2006
		RNA2	DQ352195	
CiLV-C Cordeirópolis II Cordeirópolis, SP	2012	<i>p29</i>	KR093053	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093089	
		RI	KR093148	
		MP	KR093116	
CiLV-C Cordeirópolis III Cordeirópolis, SP	2012	MP	KR093117	Este trabalho
CiLV-C Cosmorama Cosmorama, SP	2012	<i>p29</i>	KR093054	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093083	
		RI	KR093149	
		MP	KR093111	
CiLV-C Goiânia Goiânia, GO	2012	<i>p29</i>	KR093055	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093090	
		RI	KR093150	
		MP	KR093118	
CiLV-C Lavras Lavras, MG	2012	MP	KR093120	Este trabalho
CiLV-C Linha Espuma Linha Espuma, SC	2012	<i>p29</i>	KR093056	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093091	
		RI	KR093151	
		MP	KR093119	
CiLV-C Londrina Londrina, PR	2012	<i>p29</i>	KR093057	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093092	
		RI	KR093152	
		MP	KR093121	
CiLV-C Manaus Manaus, AM	2012	<i>p29</i>	KR093058	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093093	
		RI	KR093153	
		MP	KR093122	
CiLV-C Maringá Maringá, PR	2012	<i>p29</i>	KR093059	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093094	
		RI	KR093154	
		MP	KR093123	
CiLV-C Mirandópolis Mirandópolis, SP	2012	<i>p29</i>	KR093060	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR136416	
		RI	KR093155	
		MP	KR093124	
CiLV-C Nova Erechim Nova Erechim, SC	2012	<i>p29</i>	KR093061	Este trabalho
CiLV-C Nova Itaberaba Nova Itaberaba, SC	2012	<i>p29</i>	KR093062	Este trabalho
CiLV-C Palmas Palmas, TO	2012	<i>p29</i>	KR093063	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093105	
		RI	KR093166	
		MP	KR093134	
CiLV-C Piracicaba Piracicaba, SP	2014	<i>p29</i>	KR093064	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093095	
		RI	KR093156	
		MP	KR093125	

Tabela 3 - Lista dos isolados de CiLV-C utilizados no estudo de variabilidade e filogenia
(continuação)

Identificação do isolado, cidade e Estado da coleta ^a	Ano da coleta	Região do genoma viral ^b	Nº de acesso no GenBank	Referência
Isolados do Brasil				
CiLV-C Planaltina Planaltina, DF	2012	<i>p29</i>	KR093065	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093096	
		<i>MP</i>	KR093126	
CiLV-C Pratânia Pratânia, SP	2012	<i>p29</i>	KR093066	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093097	
		<i>RI</i>	KR093157	
		<i>MP</i>	KR093127	
CiLV-C Rio Branco Rio Branco, AC	2012	<i>p29</i>	KR093067	Este trabalho
CiLV-C Salto do Itú Salto do Itú, SP	2012	<i>p29</i>	KR093070	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093099	
		<i>RI</i>	KR093159	
		<i>MP</i>	KR093129	
CiLV-C Santo Antônio da Conceição Santo Antônio da Conceição, SP	2012	<i>p29</i>	KR093069	Este trabalho
CiLV-C Santo Antônio da Posse Santo Antônio da Posse, SP	2012	<i>p29</i>	KR093068	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093098	
		<i>RI</i>	KR093158	
		<i>MP</i>	KR093128	
CiLV-C São Paulo São Paulo, SP	2006	RNA1	DQ157466	Pascon et al., 2006
	RNA2	DQ157465		
CiLV-C Serra Negra Serra Negra, SP	2012	<i>p29</i>	KR093071	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093100	Este trabalho
		<i>RI</i>	KR093160	
		<i>MP</i>	KR093130	
CiLV-C SJRP I São José do Rio Preto, SP	2012	RNA1	KP336746	Este trabalho
		RNA2	KP336747	
CiLV-C SJRP II São José do Rio Preto, SP	2012	<i>p29</i>	KR093072	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093101	
		<i>RI</i>	KR093161	
		<i>MP</i>	KR093135	
CiLV-C SJRP III São José do Rio Preto, SP	2012	<i>p15</i>	KR093167	Este trabalho
		<i>RI</i>	KR093162	
		<i>MP</i>	KR093136	
CiLV-C SJRP IV São José do Rio Preto, SP (<i>Commelina benghalensis</i>)	2013	<i>p29</i>	KR093077	Este trabalho
		<i>MP</i>	KR093137	
CiLV-C Sud Mennucci I Sud Mennucci, SP	2015	<i>p29</i>	KT253463	Este trabalho
		<i>p15</i>	KT253469	
		<i>RI</i>	KT253475	
		<i>MP</i>	KT253481	
CiLV-C Sud Mennucci II Sud Mennucci, SP	2015	<i>p29</i>	KT253464	Este trabalho
		<i>p15</i>	KT253470	
		<i>RI</i>	KT253476	
		<i>MP</i>	KT253482	
CiLV-C Sud Mennucci III Sud Mennucci, SP	2015	<i>p29</i>	KT253465	Este trabalho
		<i>p15</i>	KT253471	
		<i>RI</i>	KT253477	
		<i>MP</i>	KT253483	

Tabela 3 - Lista dos isolados de CiLV-C utilizados no estudo de variabilidade e filogenia (conclusão)

Identificação do isolado, cidade e Estado da coleta ^a	Ano da coleta	Região do genoma viral ^b	Nº de acesso no GenBank	Referência
Isolados do Brasil				
CiLV-C Sud Mennucci IV Sud Mennucci, SP	2015	<i>p29</i>	KT253466	Este trabalho
		<i>p15</i>	KT253472	
		RI	KT253478	
		<i>MP</i>	KT253484	
CiLV-C Sud Mennucci V Sud Mennucci, SP	2015	<i>p29</i>	KT253467	Este trabalho
		<i>p15</i>	KT253473	
		RI	KT253479	
		<i>MP</i>	KT253485	
CiLV-C Sud Mennucci VI Sud Mennucci, SP	2015	<i>p29</i>	KT253468	Este trabalho
		<i>p15</i>	KT253474	
		RI	KT253480	
		<i>MP</i>	KT253486	
CiLV-C Tanguá Tanguá, RJ	2012	<i>p29</i>	KR093073	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093102	
		RI	KR093163	
		<i>MP</i>	KR093131	
CiLV-C Tatuí Tatuí, SP	2012	<i>p29</i>	KR093074	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093103	
		RI	KR093164	
		<i>MP</i>	KR093132	
CiLV-C Terenos Terenos, MS	2012	<i>p29</i>	KR093075	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093104	
		RI	KR093165	
		<i>MP</i>	KR093133	
CiLV-C Uberaba Uberaba, MG	2012	<i>p29</i>	KR093076	Este trabalho
		<i>MP</i>	KR093138	
Isolados de outros países				
CiLV-C Argentina I Chajari, Argentina	2012	<i>MP</i>	JX163907	Cáceres et al., 2013
CiLV-C Argentina II Argentina	2012	<i>p29</i>	KR093044	Este trabalho
		<i>p15</i>	KR093081	
		RI	KR093142	
		<i>MP</i>	KR093109	
CiLV-C Meta Meta, Colômbia	2005	<i>MP</i>	DQ272491	León, 2006
CiLV-C México Huimanguillo, México	2010	<i>p29</i>	HQ292778	Castillo, 2011
CiLV-C Panamá Panamá	2006	RNA1	DQ388512	Não publicado
		RNA2	DQ388513	
CiLV-C Paraguai Mbaracayú, Paraguai	2012	<i>MP</i>	JX163908	Cáceres et al., 2013
CiLV-C2 Co Colômbia	2013	RNA1	JX000024	Roy et al., 2013a
		RNA2	JX000025	
CiLV-C2 Hw Havaí, USA <i>Hibiscus</i> spp.	2013	RNA1	KC626783	Melzer et al., 2013a

^a Exceto as hospedeiras que estão indicadas todos os isolados foram oriundos de *Citrus sinensis*.

^b Quatro regiões: *p29*, tentativa capa proteica; *MP*, proteína de movimento da superfamília 30K; *p15*, sem função conhecida e RI (região intergênica do RNA2)

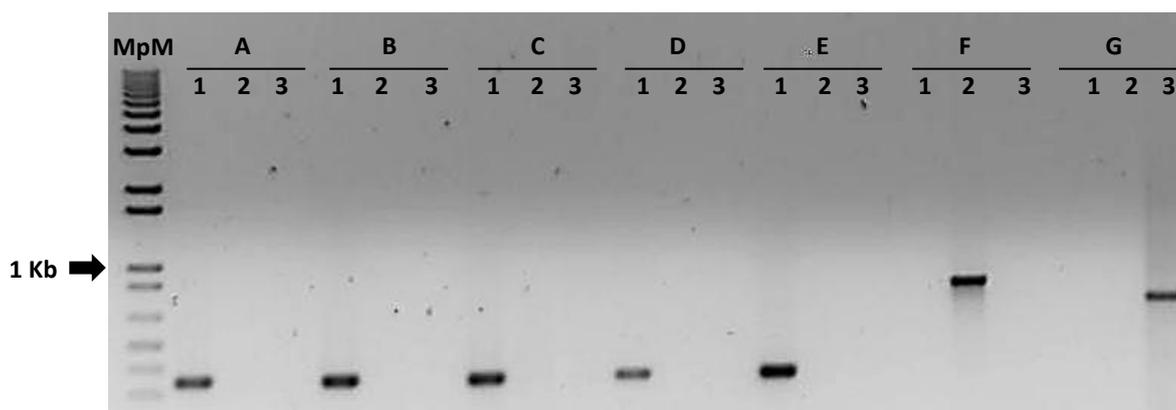


Figura 10 - Gel de agarose 1% representando os produtos de RT-PCR para detecção de vírus associados à leprose dos citros. Os produtos de RT obtidos a partir de cada amostra de RNA total foram analisados com três iniciadores específicos para detecção de CiLV-C (1- fragmento parcial do gene *MP*), CiLV-C2 (2- gene *p29*) e CiLV-N (3- fragmento parcial do gene *N*). Os isolados foram identificados com as letras: (A) Londrina, (B) Goiânia, (C) Araras, (D) São José do Rio Preto I, (E) Citros infectado com CiLV-C, Cordeirópolis, SP (controle positivo CiLV-C), (F) Citros infectado com CiLV-C2, Meta, Colômbia (controle positivo CiLV-C2) e (G) Citros infectado com CiLV-N, Guadalajara, México (controle positivo CiLV-N), (MpM) marcador de peso molecular 1Kb (Invitrogen, EUA). Os tamanhos dos fragmentos amplificados esperados são de 321, 795 e 655 pb para CiLV-C, CiLV-C2, e CiLV-N, respectivamente. A figura mostra 4 dos 47 isolados analisados neste trabalho

4.1.1 Estudo das relações filogenéticas na população de CiLV-C no Brasil

As sequências obtidas a partir de cada isolado de CiLV-C foram utilizadas no estudo filogenético. Para estes estudos, além do fragmento do gene *MP* utilizado para a detecção, outras três regiões genômicas (gene *p29* no RNA1, *p15* e RI no RNA2) foram amplificadas por PCR (Figura 11). Os fragmentos correspondentes às quatro regiões genômicas de CiLV-C foram sequenciados, cobrindo globalmente 22,3% do genoma viral.

Para a análise, além das sequências obtidas neste trabalho também foram utilizadas sequências de CiLV-C isolados de várias regiões das Américas disponíveis no banco de dados do GenBank. Ao todo, a lista é composta de 57 isolados de CiLV-C, 55 obtidos a partir de *Citrus sinensis* e dois isolados a partir de *Commelina benghalensis* (Tabela 3). O número total de isolados utilizado para a montagem das árvores filogenéticas foi de acordo com o número de sequências disponíveis para cada região analisada, sendo 49 isolados para a *p29* e *MP*, 42 para a *p15*, 39 para a RI do RNA2 e para o concatenado do RNA2 (*p15*, RI e *MP*) (Figura 12).

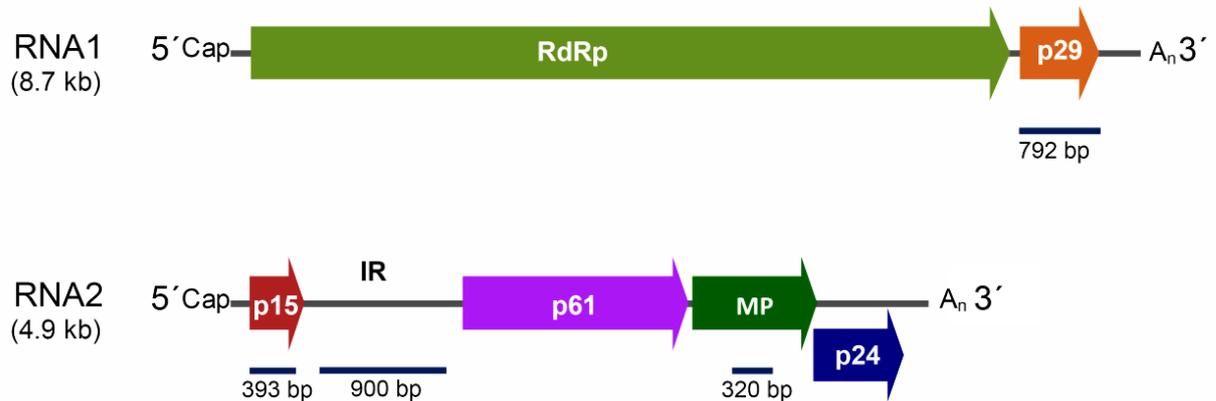


Figura 11 - Regiões do genoma de CiLV-C selecionadas para o estudo de filogenia e variabilidade da população. No RNA1 foi amplificado 792 pb do gene *p29*, no RNA2 foi amplificado 393 pb do gene *p15*, 900 pb da RI e 320pb da *MP*

As árvores filogenéticas geradas a partir das sequências de nucleotídeos da *p29* e *MP* separaram os isolados em dois grupos, com mais de 95% de consistência utilizando os métodos Neighbor joining e Maximum likelihood (Figura 12A e B). Em ambas as árvores, a maioria dos isolados foi agrupado em um grande clado onde encontram-se os genomas completos de CiLV-C isolado do Panamá, Cordeirópolis I (LOCALI-FABRIS et al., 2006), e São Paulo (PASCON et al., 2006). Este grupo foi identificado como clado Cor, abreviação referente à cidade Cordeirópolis, SP, Brasil, local do isolamento de uma das estirpes de CiLV-C primeiramente sequenciada e identificada como CiLV-C Cor (LOCALI et al., 2006; LOCALI-FABRIS et al., 2012). No menor clado, as sequências agrupadas corresponderam aos isolados coletados em São José do Rio Preto (SJRP), Cosmorama e Sud Mennucci. Essas cidades localizam-se no noroeste do estado de São Paulo e estão localizadas a uma distância de 100 a 300 km entre si. Esse clado foi identificado como SJRP, referente à cidade de igual nome, local de origem de dois isolados do clado.

Na árvore gerada com as sequências do gene *MP*, o clado Cor agrupou a maioria das sequências recuperadas do banco de dados do GenBank, as que foram coletadas a partir de citros do México, Colômbia, Panamá, Paraguai, Argentina e grande maioria dos estados brasileiros. Os dois isolados obtidos a partir de *C. benghalensis*, identificados como Borborema I e SJRP IV, foram distribuídos separadamente nos ramos Cor e SJRP, respectivamente (Figura 12B). Quanto à

topologia da árvore de *p15* (Figura 12C), é muito diferente quando comparada com as árvores geradas pelas sequências de *p29* e *MP*. Todos os isolados ficaram agrupados dentro de um mesmo clado, juntamente com as sequências completas de CiLV-C Cor. A árvore gerada pelas sequências da RI teve uma tendência semelhante à árvore de *p15*, entretanto, todas as sequências ficaram dentro de um mesmo clado, sendo que as sequências do clado Cor e SJRP observadas nas árvores de *p29* e *MP* ficaram subgrupadas (Figura 12D). Para entender melhor as relações filogenéticas de CiLV-C foi realizada uma análise de concatenado com as sequências de *p15*, RI e *MP* de cada isolado. A topologia da árvore gerada (Figura 12E) assemelha-se com as árvores obtidas para *p29* e *MP*.

De forma geral, a topologia das árvores geradas pelas sequências do RNA1 e RNA2 de CiLV-C são contrastantes. Considerando as sequências da *p29* e *MP*, a população de CiLV-C é separada em dois cladogramas e quando se considera as sequências da *p15*, RI e concatenado do RNA2, a população é nitidamente agrupada dentro de um mesmo clado. Esses resultados contrastantes nos levaram a avaliar possíveis eventos de recombinação no RNA2 de CiLV-C.

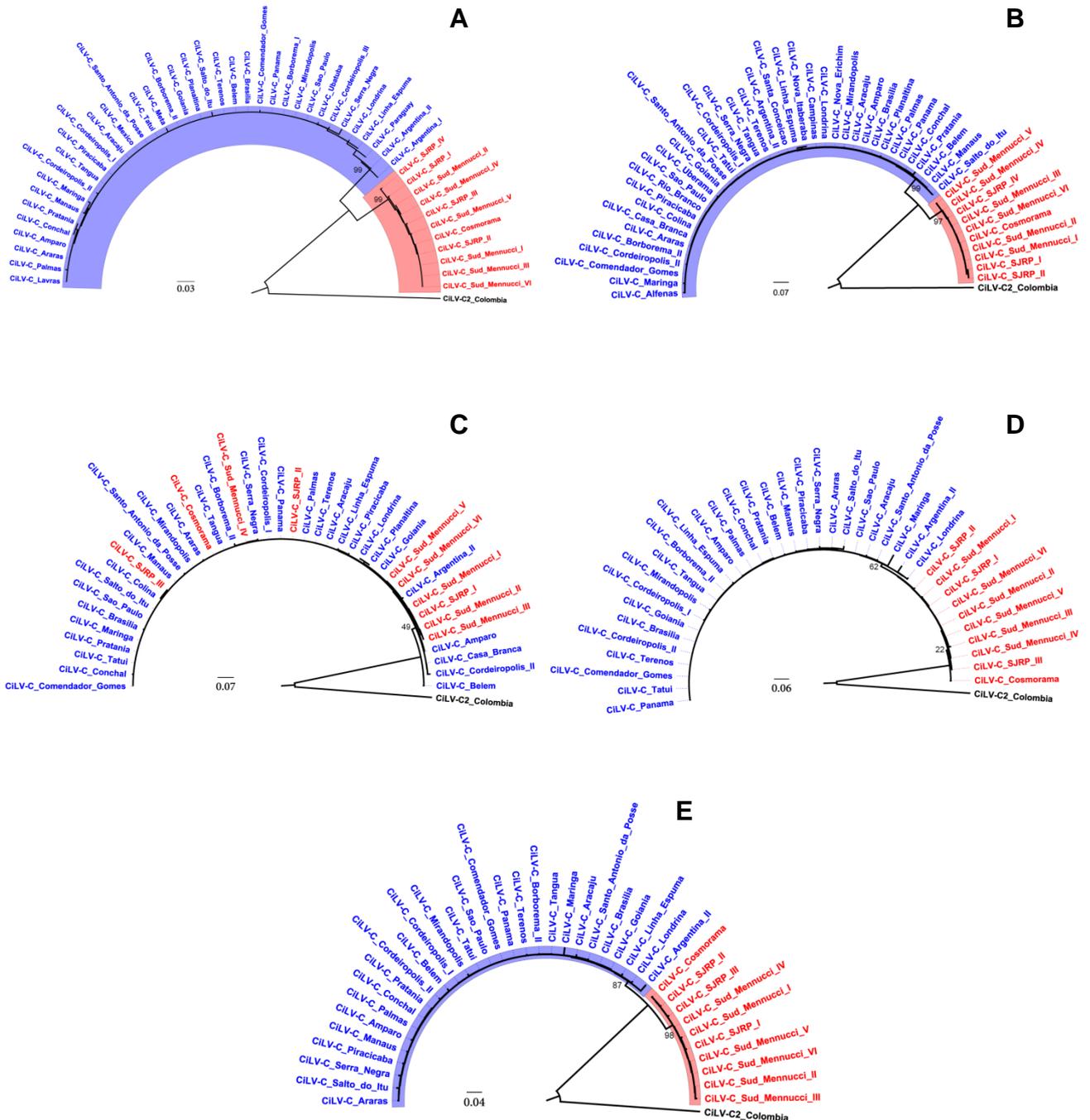


Figura 12 - Árvores filogenéticas geradas pelo Neighbor joining a partir de quatro regiões genômicas dos isolados de CiLV-C. Além das sequências obtidas no trabalho, foram utilizadas sequências de CiLV-C disponíveis no GenBank. Isolados do clado Cor e SGRP estão destacados em azul e vermelho, respectivamente. (A) sequência parcial de 792 nts da *p29*, (B) sequência parcial de 300 nts da *MP*, (C) sequência parcial de 392 nts da *p15*, (D) sequência parcial de 900 nts da *RI*, (E) Fragmento englobando as sequências concatenadas do RNA2 de 1593 nts (*p15* + *RI* + *MP*). Sequência completa de CiLV-C2, Colômbia (JX000024 e JX000025) foram incorporadas nas análises, os valores de *bootstrap* (1000 repetições) estão indicados nos principais nós dos cladros

4.1.2 Detecção de possíveis eventos de recombinação no genoma de CiLV-C

Para detectar possíveis eventos de recombinação entre isolados de CiLV-C, as sequências de *p29*, *p15*, RI e *MP* foram analisadas, sendo que as sequências correspondentes ao RNA2 (*p15*-RI-*MP*) foram concatenadas antes da análise. Apenas aqueles eventos detectados por três ou mais métodos dos nove implementados no programa RDR4 foram considerados resultados confiáveis. Além disso, as sequências codificadoras (*p29*, *p15* e *MP*) foram testadas utilizando o algoritmo GRAD, implementado no pacote Hyphy.

Nenhuma evidência de recombinação foi detectada nas sequências de *p29* e *MP*, tanto pelo RDR4, como pelo GRAD. Da mesma forma, o GRAD não indicou nenhum evento de recombinação em *p15*, quando analisada de forma independente. Entretanto, quando analisado o concatenado, foram detectados eventos putativos de recombinação em todos os isolados do clado SJRP e envolvendo regiões genômicas semelhantes. Essas regiões vão desde a metade do extremo 3' da *p15* até quase que a parte final da RI (Tabela 4, Figura 13). Por exemplo, em CiLV-C SJRP I, os pontos de interrupção de início e fim estão nas posições 204 da *p15* e 816 da RI, que correspondem às posições 204 e 1209 na sequência concatenada do RNA2. De acordo com o programa, sete dos nove métodos detectaram os possíveis doadores minoritários dos eventos de recombinação: CiLV-C Londrina (para os isolados CiLV-C SJRP I e Sud Mennucci I) e CiLV-C Argentina II (para CiLV-C Cosmorama e CiLV-C SJRP II), sendo que os parentais majoritários são ainda desconhecidos.

Em dois isolados do clado Cor também foram detectados sinais de recombinação nas sequências do RNA2. Diferentemente aos eventos identificados no clado SJRP, a região genômica envolvida nos eventos dos isolados do clado Cor foi menor, com foco na região 3' proximal da RI, e também foram detectados por apenas quatro dos nove métodos implementados no RDR4 (Tabela 4, Figura 13).

Tabela 4 - Eventos de recombinação no RNA2 de CiLV-C

Clado	Eventos de recombinação	Posição ^a	Parental minoritário	Parental maioritário	Isolados com eventos semelhantes	Método (probabilidade)
SJRP	CiLV-C Sud Mennucci I	125-1212	CiLV-C Londrina	Desconhecido	CiLV-C Sud Mennucci II, III, V and VI	Geneconv (1.13×10^{-3}), Bootscan (1.39×10^{-3}), MaxChi (3.48×10^{-7}), Chimaera (2.37×10^{-7}), SiScan (5.68×10^{-7}), 3Seq (1.61×10^{-9})
	CiLV-C Sud Mennucci IV	125-1212	CiLV-C ArgentinaII	Desconhecido	-	Geneconv (1.13×10^{-3}), Bootscan (1.39×10^{-3}), MaxChi (3.48×10^{-7}), Chimaera (2.37×10^{-7}), SiScan (5.68×10^{-7}), 3Seq (1.61×10^{-9})
	CiLV-C SJRP I	204-1209	CiLV-C Londrina	Desconhecido	-	Geneconv (1.13×10^{-3}), Bootscan (1.39×10^{-4}), MaxChi (3.48×10^{-7}), Chimaera (2.37×10^{-7}), SiScan (5.68×10^{-7}), 3Seq (1.61×10^{-9})
	CiLV-C SJRP II	233-1215	CiLV-C Argentina II	Desconhecido	-	Geneconv (1.13×10^{-3}), Bootscan (1.39×10^{-4}), MaxChi (3.48×10^{-7}), Chimaera (2.37×10^{-7}), SiScan (5.68×10^{-7}), 3Seq (1.61×10^{-9})
	CiLV-C SJRP III	759-1211	CiLV-C Argentina II	Desconhecido	-	Geneconv (1.13×10^{-3}), Bootscan (1.39×10^{-4}), MaxChi (3.48×10^{-7}), Chimaera (2.37×10^{-7}), SiScan (5.68×10^{-7}), 3Seq (1.61×10^{-9})
	CiLV-C Cosmorama	233-1212	CiLV-C Argentina II	Desconhecido	-	Geneconv (1.13×10^{-3}), Bootscan (1.39×10^{-4}), MaxChi (3.48×10^{-7}), Chimaera (2.37×10^{-7}), SiScan (5.68×10^{-7}), 3Seq (1.61×10^{-9})
Cor	CiLV-C Maringá	715-1500	CiLV-C Mirandópolis	CiLV-C Borborema	-	Bootscan (3.61×10^{-3}), MaxChi (3.62×10^{-4}), 3Seq (5.55×10^{-6})

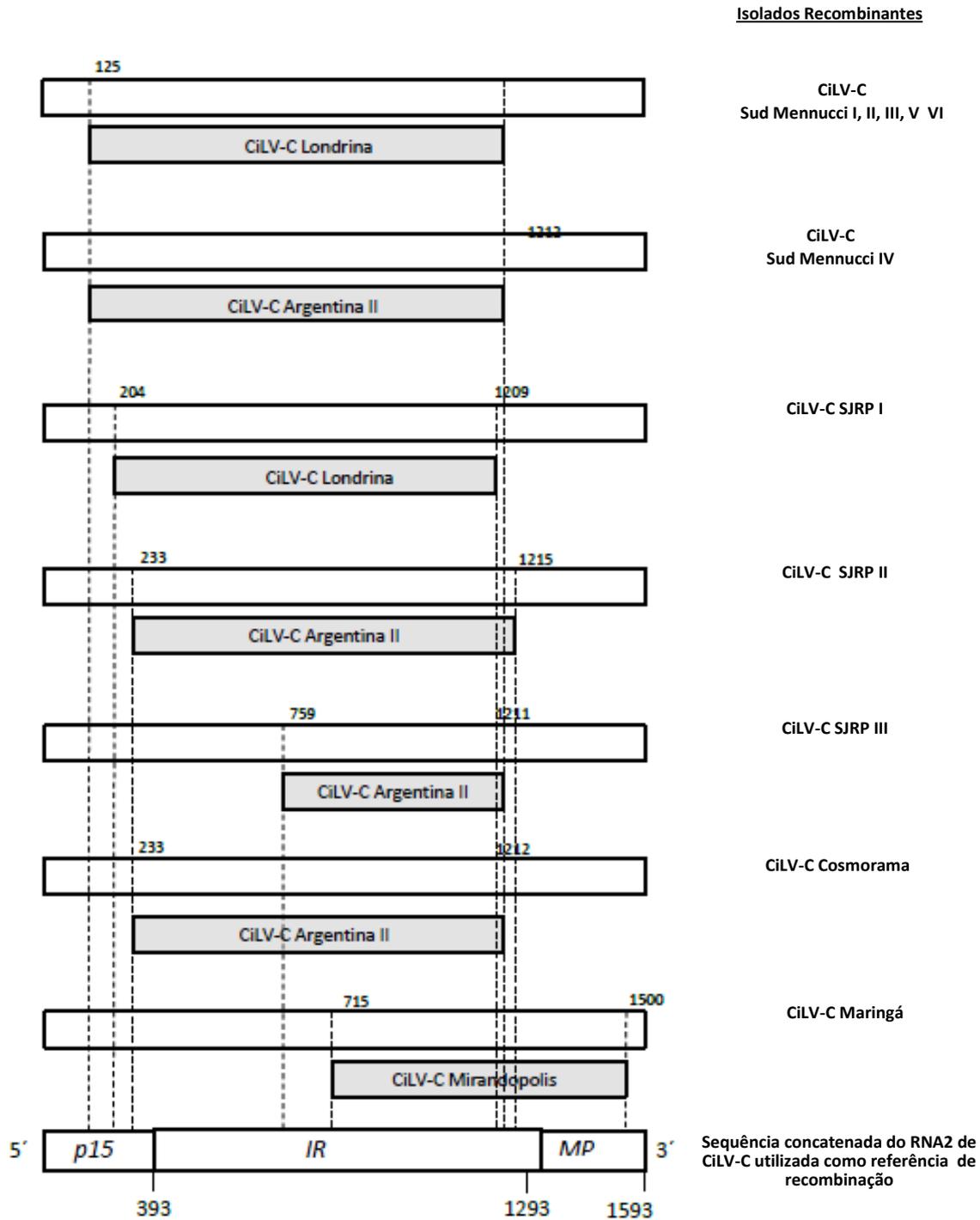


Figura 13 - Representação esquemática dos putativos eventos de recombinação na população de CiLV-C. Sequências concatenadas do RNA2 de CiLV-C são representados por uma barra e com o nome do isolado no lado direito. As posições dos possíveis eventos de recombinação estão marcadas com uma linha e uma barra cinza abaixo, indicando o possível parental minoritário. Os fragmentos de *p15*, *IR* e *MP* possuem 393, 900 e 300 nt, respectivamente

A variação genética é gerada por erros que ocorrem durante a replicação de genomas. Em vírus, os dois principais tipos de erros até agora descritos são de mutação e recombinação (RAMÍREZ et al., 1995; ROOSSINCK, 1997; GARCÍA-ARENAL et al., 2013). A recombinação é o processo pelo qual segmentos da informação genética são alterados entre as cadeias de nucleotídeos de diferentes variantes genéticas. O processo de recombinação é considerado uma das principais fontes de variabilidade molecular em vírus de plantas (GARCÍA-ARENAL et al., 2001; BUJARSKI, 2013). Em conjunto, os resultados evidenciam a recombinação como uma fonte de variabilidade genética em populações naturais de CiLV-C e sugere-se que a zona entre a *p15*-RI do RNA2 seja um ponto de entrecruzamento no genoma deste vírus.

O RNA sub-genômico específico para o gene *p61* foi detectado durante a replicação de CiLV-C e CiLV-C2 (PASCON et al., 2006; ROY et al., 2013b). A RI do RNA2 dos cilevirus encontra-se anterior a *p61* e provavelmente abriga elementos promotores necessários para dirigir a expressão do RNA sub-genômico da *p61*, essa associação de recombinação de RNA com a transcrição foi observada em outros vírus com esse sistema de expressão, como em *Brome mosaic virus* (WIERZCHOSLAWSKI et al., 2003, 2004).

Os eventos de recombinação na região *p15*-RI do RNA2 de CiLV-C ficam mais evidentes quando se tem destaque que esta região apresenta alta variabilidade entre CiLV-C e as espécies tentativas do gênero (ROY et al., 2013b; MELZER et al., 2013a). Em geral, a RI dos cilevirus apresenta pequenas regiões semelhantes a ORFs, uma delas que abriga uma ORF tentativa que codifica uma proteína de 7 kDa (*p7*). A *p7* é encontrada nas posições de 32, 160 e 515 nt após o gene *p15* em CiLV-C, CiLV-C2 e CiLV-C2 Hw, respectivamente; sendo que em CiLV-C2 Hw esse gene encontra-se parcialmente duplicado. Em CiLV-C2 e CiLV-C2 Hw a *p7* apresenta um domínio transmembrana não observado na proteína codificada pelo CiLV-C. Embora mais evidências sejam necessárias para compreender a evolução dos cilevirus, é possível supor que a região entre a *p15*-RI é propensa a eventos de recombinação inter e intra cilevirus.

4.1.3 Variabilidade genética da população de CiLV-C no Brasil

Para o estudo de variabilidade na população foram utilizadas as mesmas sequências detalhadas no estudo de filogenia (Tabela 3). As distâncias genéticas dentro e entre os clados definidas pelas sequências da *p29* e *MP* foram calculadas utilizando o programa MEGA6. Com base nas sequências de *p29*, a distância genética variou de 0,000-0,034 dentro do clado Cor, e 0,000-0,015 dentro do clado SJRP, sendo que os valores entre os clados foram bem maiores, de 0,140-0,188. Essa tendência também foi observada para as sequências de *MP*, entretanto em menor proporção, sendo para o clado Cor variou de 0,000-0,027, clado SJRP de 0,000-0,014 e entre os clados de 0,108-0,179. As distâncias genéticas para a *p15* apresentaram menor intervalo de valores (0,000-0,034) quando comparadas com os valores para RI (0,001-0,085).

A variabilidade molecular da população CiLV-C também foi estimada calculando vários parâmetros genéticos de população, tais como a diversidade de nucleotídeos (π) e diversidade de haplótipos (H_d) através da utilização do DnaSP 5. Apenas as sequências recuperadas a partir de citros foram consideradas nessas avaliações. Os valores de diversidade de nucleotídeos considerando todos os isolados dos dois clados variaram de 0,010-0,057, sendo os valores mais elevados os correspondentes às sequências da *MP* (0,057) e *p29* (0,053), ao passo que a RI apresentou um valor intermediário (0,021) e *p15* o valor mais baixo (0,010) (Tabela 5). Quando as mesmas análises foram realizadas com apenas os isolados agrupados no clado Cor, os valores de π associados às sequências de *p29* (0,009) e *MP* (0,010) foram cerca de seis vezes mais baixo do que os valores obtidos nas análises incluindo todos os isolados, enquanto para a RI (0,010) e *p15* (0,015) os valores apresentaram apenas pequenas reduções. A diversidade haplótipo (H_d) para a RI das sequências pertencentes ao clado Cor e SJRP atingiu o máximo ($H_d = 1$) indicando que cada isolado deste conjunto representa um haplótipo de CiLV-C (Tabela 5).

A diversidade de nucleotídeos de CiLV-C estimada para *p29* e *MP* (0,057 e 0,053) oscilou em uma faixa semelhante à observada em outras populações de vírus que infectam citros, *Citrus psorosis virus* ($\pi = 0.083$), *Citrus tristeza virus* (0.038) e *Citrus leaf blotch virus* (0.021) (RUBIO et al., 2001; VIVES et al., 2002; MARTIN, 2006). No entanto, a variabilidade molecular da população CiLV-C é principalmente

determinada pela existência dos isolados do clado SJRP. Quando as sequências destes isolados foram negligenciadas, os valores de p_{29} e MP (0,009 e 0,010) foram reduzidos quase seis vezes. A baixa variabilidade parece ser uma constante ao longo do genoma CiLV-C, que também é comprovado com as análises de p_{15} (0,010), e embora em menor extensão, com as sequências da RI (0,021). A diversidade de nucleotídeos associada a p_{15} e RI foram quase similares, quando calculada para toda a população e para o clado Cor ($\pi_{p_{15}} = 0,010$ e $\pi_{RI} = 0,015$). Esse resultado provavelmente reflete a aquisição dessa região por recombinação nos isolados do clado SJRP. Por outro lado, os resultados revelam que a subpopulação do clado Cor, que apresenta a menor variabilidade quando comparada como o clado SJRP, é amplamente distribuída por todo o território brasileiro. É interessante salientar que os isolados utilizados nas análises foram obtidos a partir de várias regiões do Brasil e também de outras regiões das Américas, a partir das sequências disponíveis no GenBank, e a presença de CiLV-C Cor foi confirmada em regiões desde o México até a Argentina. Consistentemente, a análise da sequência obtida recentemente de um isolado do CiLV-C, originalmente coletado na Argentina em 1967, também corroboram esses resultados. O isolado de CiLV-C da Argentina foi recuperado a partir da casca de frutos de laranja doce herbarizados apresentando sintomas de leprose que encontravam-se no herbário do USDA (HARTUNG et al., 2015). A partir desta amostra foi recuperado 87% da sequência do RNA1 e 98% RNA2 do genoma viral. Globalmente essas sequências apresentam mais de 99% de identidade de nucleotídeos com CiLV-C Cor, caracterizado em 2006, sugerindo que a baixa variabilidade de CiLV-C não é apenas espacial, mas também temporal.

A ausência da atividade de reparo da RNA polimerase dependente de RNA leva a altas taxas de mutações, sendo um fator com grande potencial de geração de diversidade genética em vírus de RNA (GIBBS et al., 1995; DOMINGO-CALAP; SANJUÁN, 2011). Além disso, a variabilidade de uma população também pode ser introduzida por recombinação (SIMON; HOLMES, 2011; GREENBAUM et al., 2012), como foi visto nos isolados da linhagem SJRP. No entanto, a baixa variabilidade genética parece ser comum em populações de vírus de plantas, o que provavelmente está associado a gargalos genéticos contínuos, ou seja, causada pela infecção de uma nova célula ou pelo vetor de transmissão (GIBBS et al., 1995; GARCÍA-ARENAL et al., 2001; GUTIÉRREZ et al., 2012; RAMALHO et al., 2015). A

este respeito, parece plausível que algumas características da biologia de CiLV-C contribuam para a baixa variabilidade genética e potencialização do impacto dos pontos de estrangulamento na diversidade da população viral. Apesar de CiLV-C infectar experimentalmente espécies de plantas pertencentes a 28 famílias, a gama de hospedeiros naturais do vírus é limitada a poucos gêneros de plantas (*Citrus* spp., *Commelina benghalensis* e *Swinglea glutinosa*). Em todos eles o vírus é incapaz de se espalhar sistemicamente (BASTIANEL et al., 2006; LEÓN et al., 2008; ARENA et al., 2013; GARITA et al., 2013, 2014). Em consequência, a transmissão do CiLV-C na planta ocorre exclusivamente mediada pelos ácaros virulíferos após a multiplicação em um baixo número relativo de células epidérmicas e do parênquima em torno dos locais de alimentação do ácaro (GARITA et al., 2013). Um estudo recente indica a multiplicação de cilevirus em seus ácaros vetores (ROY et al., 2015a). Neste contexto, a replicação alternativa em células vegetais e ácaros poderiam restringir ainda mais a variabilidade da população do vírus, como previamente observado para outros vírus que se propagam em seus vetores, como o CoRSV (RAMALHO et al., 2015), o *Rice dwarf virus* (PU et al., 2011) e o *Tomato spotted wilt virus* (SIN et al., 2005).

Tabela 5 - Parâmetros genéticos para quatro regiões genômicas de CiLV-C. Os valores foram analisados de forma independente incluído todos os isolados e também considerando apenas os isolados pertencentes ao clado Cor

Região do genoma	Comprimento da região (nt)	Clado ^a /Nº isolados	S	Eta(η)	k	π	h	Hd
p29	792	Todos/47	186	196	41.06	0.053	40	0.990
		Cor/38	83	84	7.59	0.009	32	0.986
p15	393	Todos/41	52	53	4.03	0.010	30	0.961
		Cor/31	49	50	4.21	0.010	24	0.953
MP	288	Todos/46	62	71	16.53	0.057	26	0.902
		Cor/36	31	33	2.79	0.010	20	0.851
IR	965	Todos/38	168	182	18.02	0.021	38	1
		Cor/28	133	143	12.99	0.015	28	1

^a foram considerados apenas isolados de CiLV-C a partir de citros;

S Número de sítios (segregantes) polimórficos; Eta (η): Número total de mutações; h: Número de haplótipos; k: número médio de diferenças de nucleotídeos; π : diversidade de nucleotídeos; Hd: diversidade de haplótipo

4.1.4 Estimativa da pressão de seleção sobre alguns genes de CiLV-C

A relação entre as frequências de substituição não sinônimas e sinônimas ($\omega = dN / dS$) foi estimada nos códons dos alguns genes de CiLV-C (Tabela 6). Em geral, os valores de ω foram inferiores a 1, indicando uma seleção negativa ou purificação, embora tenha sido observado um nível diferente de pressão sob cada gene analisado. De acordo com os resultados, *p29* ($\omega = 0,07$) e *MP* ($\omega = 0,10$) foram expostos a forças de seleção mais fortes quando comparados com *p15* ($\omega = 0,50$). Além disso, nas análises realizadas apenas com as sequências dos isolados do clado Cor os valores de ω para *p15* mantiveram-se inalterados, enquanto para *p29* (0,18) e *MP* (0,26) os valores aumentaram ligeiramente (Tabela 6).

Tabela 6 - Estimativa da pressão de seleção sobre quatro regiões genômicas de CiLV-C. Os valores foram obtidos incluindo todos os isolados e também considerando apenas os isolados pertencentes ao clado Cor

Modelo de ORF	substituição de nucleotídeo	Método	Pressão de seleção	Posição dos aminoácidos nas sequências de CiLV-C SJRP ^a
<i>p29</i>	TrN	SLAC-FEL-REL	purificação	27, 39, 113, 156, 157, 173, 207, 211, 227, 259
		FEL-REL		2, 7, 23, 30, 47, 49, 57, 58, 76, 87, 99, 100, 104, 116, 118, 133, 137, 140, 151, 154, 165, 171, 172, 180, 181, 190, 196, 202, 213, 214, 217, 219, 245, 254
<i>p15</i>	HKY85	SLAC-FEL-REL	positiva	-
		FEL-REL		91
<i>MP^b</i>	GTR	SLAC-FEL-REL	purificação	71, 112, 148
		FEL-REL		59, 74, 80, 84, 85, 92, 93, 96, 97, 98, 99, 102, 103, 111, 115, 118, 121, 136, 146

^a foram considerados apenas isolados de CiLV-C a partir de citros;

dS: frequência de substituição sinônima; dN: frequência de substituição não-sinônima; ω : pressão de seleção;

A baixa diversidade de gama de hospedeiro natural de CiLV-C e a transmissão mediada por *Brevipalpus* spp. também podem contribuir para o mecanismo de seleção negativa ou purificação sobre a evolução de CiLVC. Ramalho et al. (2015) também observaram mecanismos semelhantes na população de CoRSV. Através de análises com as sequências do gene *N* de 47 isolados de

CoRSV, os autores observaram valores de ω entre 0,2 a 0,3, sugerindo que esta região dos dichoravirus está sob seleção negativa (RAMALHO et al., 2015). A seleção negativa ou purificação é a principal força evolutiva que atua sobre populações de vírus de plantas, tendo como resultado a conservação de estruturas moleculares específicas (GARCÍA-ARENAL et al., 2001; THOMAS et al., 2003). Em particular, a p29 (tentativa proteína do capsídeo viral) e MP (proteína de movimento) de CiLV-C parecem seguir a regra, uma vez que devem estar envolvidas na formação das partículas virais, na interação do vírus com os seus vetores e no movimento célula-a-célula. Infelizmente, o papel funcional da p15 no ciclo de multiplicação viral continua ainda desconhecido.

Utilizando os métodos SLAC ($p < 0,1$), FEL ($p < 0,1$) e REL (fator de Bayes = 50) implementados em Hyphy, foi possível estimar as forças seletivas sob sítios específicos das ORF analisadas. Os modelos de substituição de nucleotídeos selecionados para as análises das sequências da p29 foi TrN93 (Tamura-Nei) para p15 e MP foi HKY85 (Hasegawa, Kishino e Yano). Os programas FEL e REL indicaram 22 códons sob forte seleção negativa em MP (Tabela 7), mas quando também se considerou o método SLAC, os valores foram reduzidos para três códons (71, 112 e 148). SLAC é um método que tende a ser mais conservador entre as três ferramentas utilizadas, reduzindo assim a possibilidade de identificação falsa de códons sob seleção (POON et al., 2009).

Tabela 7 – Dedução da pressão de seleção sobre aminoácidos codificados por CiLV-C

Região do genoma	Comprimento da região (nt)	Clado ^a /Nº isolados	dS	dN	ω (dN/dS)
p29	792	Todos/47	0.252 ± 0.037	0.018 ± 0.003	0.07
		Cor/38	0.022 ± 0.004	0.004 ± 0.001	0.18
p15	393	Todos/41	0.014 ± 0.004	0.007 ± 0.002	0.50
		Cor/31	0.014 ± 0.004	0.008 ± 0.002	0.57
MP	288	Todos/46	0.202 ± 0.043	0.021 ± 0.007	0.10
		Cor/36	0.019 ± 0.006	0.005 ± 0.002	0.26
IR	965	Todos/38	-	-	-
		Cor/28	-	-	-

^a KP336746 e KP336747, número de acesso no GenBank do RNA1 e RNA2 de CiLV-C SJRP, respectivamente.

Vários dos códons encontrados sob forte seleção negativa em CiLV-C estão envolvidos em sequências conservadas e motivos estruturais de proteínas de movimento de vírus planta da superfamília 30K (por exemplo, Ile₈₄ e Ser₈₅, na cadeia beta 2; Val₉₂, Pro₉₃, Pro₉₈ e Ala₉₉, na alça 2; Ser₁₀₂ e Lue₁₀₃ na cadeia beta 3; Leu₁₁₂ na alça 3; e Val₁₁₅ e Gln₁₂₁ na beta 4) realizada por um estudo recente (MUSHEGIAN E ELENA, 2015). Em *p15*, apenas o códon na posição 91 foi indicado sob seleção positiva utilizando os métodos FEL e REL, enquanto que em *p29*, 10 códons foram identificados sob seleção negativa pelos três métodos, e outros 34 códons também foram reconhecidos com FEL e REL (Tabela 7).

4.1.6 Estrutura secundária das proteínas p29 dos cilevirus

Para compreender melhor a proteína de capa (p29) de CiLV-C, aminoácidos desta região dos isolados Cor e SJRP foram analisados usando o algoritmo PROMALS, que geraram alinhamentos de sequências utilizando informações a partir de pesquisas de banco de dados e previsão de estrutura secundária. Sequências de aminoácidos deduzidas a partir de CiLV-C2 e CiLV-C2 Hw também foram incluídas no alinhamento, de modo a identificar elementos estruturais conservados através dessas proteínas. Foi possível identificar que cinco das oito posições sob seleção negativa, segundo os métodos SLAC, REL e FEL, são distribuídas na metade 3' do gene, quatro deles codificam para o aminoácido Asp e, destes, dois são parte da maior estrutura de alfa-hélice ao longo das quatro proteínas analisadas (Figura 14). A predição indicou uma estrutura secundária predominante em alfa-hélice ligada por regiões de estrutura beta (Figura 14). Os aminoácidos Pro₈₃ e Gln₈₄, introduzidos como consequência das inserções nucleotídicas na ORF *p29* do isolado SJRP, foram identificados na borda de uma pequena alfa hélice.

Proteínas da capa de vírus de RNA (+) estão envolvidas em várias funções durante a replicação, a interação com o vetor e o desenvolvimento de sintomas são determinantes da patogenicidade viral e da epidemiologia (BUJARSKI, 2013; WEBER; BUJARSKI, 2015). A este respeito, os nossos estudos sugerem que os aminoácidos codificados pelos códons selecionados negativamente podem desempenhar papéis funcionais ou estruturais importantes. Análises com um clone infeccioso de CiLV-C poderá determinar o papel dos aminoácidos selecionados

negativamente para o vírus e seu papel interação com o vetor e os hospedeiros vegetais.

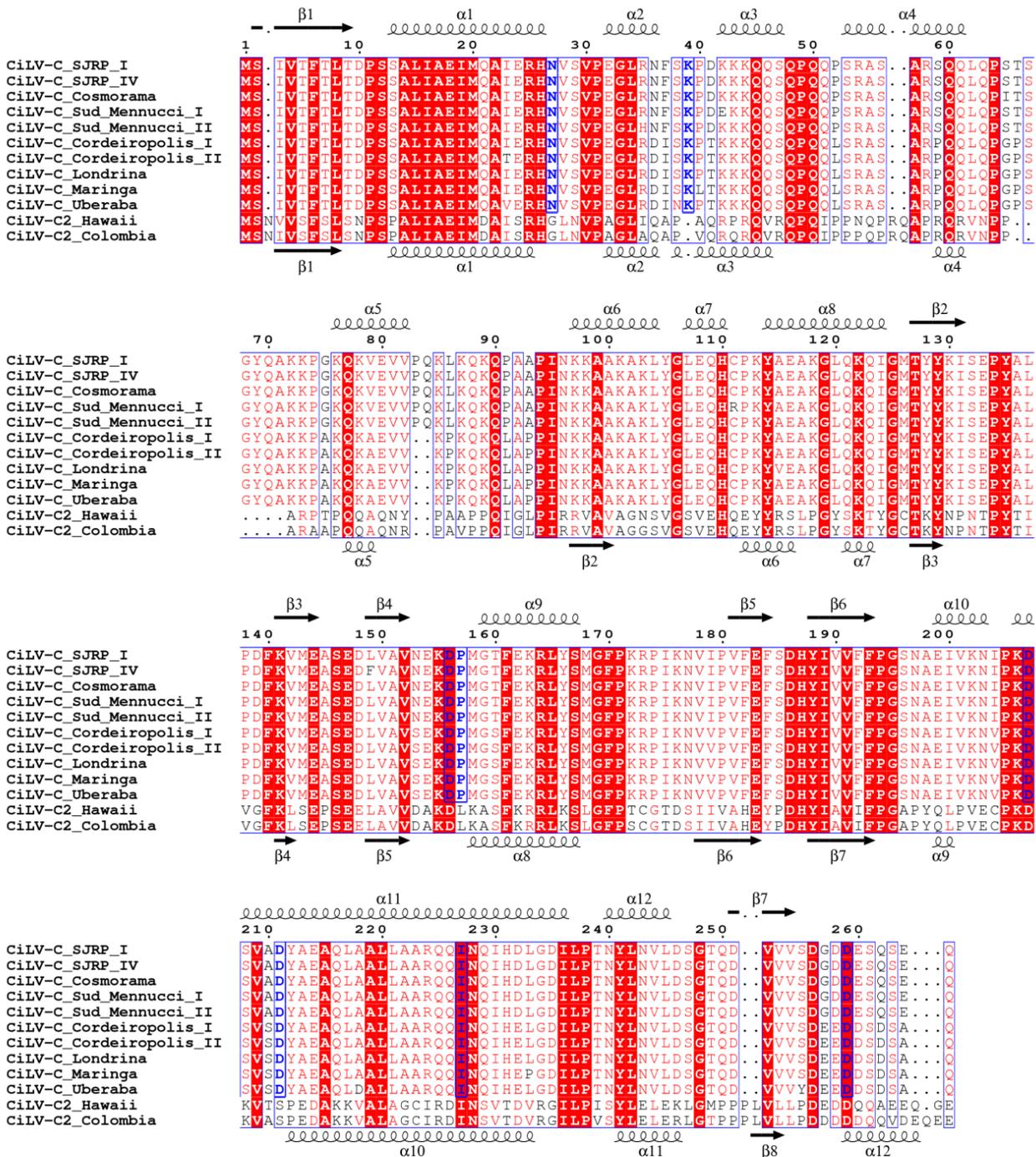


Figura 14 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos deduzidas da p29 a partir de isolados de CiLV-C e CiLV-C2. O consenso prevê a estrutura secundária (α: alfa hélice; β, beta) na parte superior de CiLV-C e na parte inferior de CiLV-C2. As letras em azul indicam as posições sob purificação em CiLV-C detectadas pelos métodos SLAC, FEL e REL

4.1.7 Eficiência de transmissão de CiLV-C SJRP mediada por *Brevipalpus yothersi*

Para verificar a transmissão de CiLVC SJRP pelo ácaro vetor, os ensaios foram realizados utilizando como fonte viral frutos de laranja doce sintomáticos coletados na planta onde o isolado CiLV-C SJRP I foi obtido. Após três dias de aquisição, os ácaros virulíferos foram transferidos para plantas saudáveis de *Citrus sinensis* e *Arabidopsis thaliana* e três experimentos independentes foram realizados. Os sintomas típicos de leprose foram observados entre 15-20 e 8-10 dias após a inoculação em *C. sinensis* e *A. thaliana*, respectivamente. A transmissão eficiente de CiLV-C SJRP foi confirmada em mais de 90% das plantas de *A. thaliana* e 93% das de citros (Tabela 8). As plantas de *A. thaliana* infectadas foram utilizadas como fonte secundária para a caracterização completa de CiLV-C SJRP. Os valores de eficiência de transmissão são semelhantes aos relatados para a transmissão de CiLV-C Cor (Arrivabem et al., 2005).

Tabela 8 - Eficiência de transmissão de CiLVC SJRP por ácaros *Brevipalpus* sp

Hospedeiro	Experimento	Nº de infecção ^a / Nº plantas inoculadas	Porcentagem de plantas infectadas
<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	15/15	100
	2	15/15	100
	3	14/15	93.3
<i>Citrus sinensis</i> var. Pera	1	10/10	100
	2	9/10	90
	3	10/10	100

^aa presença do vírus foi confirmada por ensaios de RT-PCR utilizando os iniciadores para amplificação parcial do gene *MP* de CiLV-C

4.2 Caracterização molecular de CiLV-C isolado de São José do Rio Preto (CiLV-C SJRP)

Através do estudo da filogenia e variabilidade populacional de CiLV-C foi possível detectar isolados recombinantes e com variabilidade genética distinta da maioria dos isolados da população. Esses isolados foram oriundos da região de São José do Rio Preto, SP, assim foi proposto o sequenciamento total do genoma de um

desses vírus, identificado como CiLV-C SJRP. Os extratos de RNA total foram obtidos a partir de plantas de *Citrus sinensis*, fonte primária do isolado, e também a partir de *Arabidopsis thaliana* resultantes do experimento de transmissão com o mesmo isolado. Portanto, as duas fontes de RNA foram processadas independentemente.

O sequenciamento de sRNA gerou uma biblioteca de 4.693.816 *reads* para *C. sinensis* e 2.264.321 *reads* para *A. thaliana* (Tabela 9). Após remoção das sequências derivadas de cada planta, os *contigs* gerados a partir de ambas as bibliotecas e que exibiam semelhanças mais elevadas com o RNA1 e o RNA2 de CiLV-C, foram alinhados. Os valores de identidade entre as sequências geradas a partir das duas plantas foram superiores a 98%, essas sequências foram analisadas em conjunto para gerar a montagem do genoma de CiLV-C SJRP.

Tabela 9- Composição da biblioteca e cobertura do genoma viral de CiLVC SJRP a partir do sequenciamento de próxima geração de sRNA derivados de *Citrus sinensis* e *Arabidopsis thaliana*

	Biblioteca de <i>Citrus sinensis</i>		Biblioteca de <i>Arabidopsis thaliana</i>	
Total de <i>reads</i> (20-25 nts de comprimento)	4.693.816		2.264.321	
	CiLV-C SJRP ^a			
	RNA1	RNA2	RNA1	RNA2
RNA viral correspondente aos <i>reads</i>	1.829.215	579.817	868.813	812.968
<i>Reads</i> não-específicos do RNA viral	2.864.601	4.113.999	1.395.508	1.451.353
Total de bases do RNA correspondente aos <i>reads</i>	40.291.858	12.775.407	19.878.115	18.582.061
Comprimento do RNA viral (nts)	8.753	5.004	8.753	5.004
Cobertura do RNA viral (%)	98	86	94	98
Cobertura do genoma viral	4603.9x	2552.6x	2271.0x	3713.9x

^a KP336746 e KP336747, número de acesso no GenBank do RNA1 e RNA2 de CiLV-C SJRP, respectivamente

Para obter as sequências não geradas pelo NGS e confirmar a sequência viral, foi desenvolvido um conjunto de 34 pares de iniciadores (Tabela 10), utilizando as informações resultantes do NGS como referência. O resequenciamento permitiu a obtenção do genoma completo de CiLV-C SJRP. As sequências completas do RNA1 e RNA2 de CiLV-C SJRP foram depositadas no GenBank, com os números de acesso KP336746 e KP336747, respectivamente.

Utilizando o genoma de CiLV-C SJRP como referência, foi determinada a porcentagem de leituras obtidas a partir de bibliotecas de *C. sinensis* e *A. thaliana*. Para citros, a porcentagem de cobertura foi de 98% e 86% do RNA1 e 2, respectivamente; e para *A. thaliana* foi de 94% para o RNA1 e 98% para o RNA2 (Tabela 9). Em ambas as bibliotecas, os sRNA virais mais abundantes foram aqueles com 21-22 nt de comprimento.

Tabela 10 - Lista dos iniciadores utilizados para amplificação completa do genoma (RNA1 e RNA2) de *Citrus leprosis virus C* SJRP, com base nas sequências geradas pela FASTERIS (Suíça)

(continua)

Sequência do iniciador (5' – 3')	Direção	Região-alvo	Tamanho do amplicon (pb)
RNA1			
GTCAAGTGATATAACCATTTTGC	F	9-33	666
TCATCGTCTTTTCTGTAACCG	R	655-665	
CGCACATAATAACGCTGCTG	F	595-614	677
GCAACAGAACCAAACATCTC	R	1259-1278	
TGTTCATAGGTTGGATGTGT	F	1171-1191	652
AGCAGATGATGGATGTCGG	R	1804-1820	
CGGTATAGTTCGGTTCCTTA	F	1750-1768	789
ACAAGCAAGCTGTAATGACT	R	2489-2508	
CCCATTTTCATCTCAAATAAAGG	F	2436-2458	685
CTAAATACCGCAGTTCACC	R	3101-3121	
TTCACCTGGTTTTAGGACGC	F	3022-3041	670
ACGTTTCATGTGTAGCAGAAG	R	3672-3691	
ACTTGAATCCGAATGCTTACA	F	3595-3615	688
AAAGATTACTGCCGGCTTTT	R	4263-4282	
TAAGGCTATCGTTGGTGTG	F	4201-4221	670
GCGGTTCTCAACAGTTGG	R	4853-4871	
CCTTGTTGGTCGATACTTTCT	F	4809-4829	664
AAGATTGAACCACCACTACTT	R	5452-5472	
GAAAGATAGATTTGACCATGAC	F	5377-5399	665
TTAGCTGCATGACCTCAAAC	R	6022-6041	
TGCTTAAATCTATTGTCGGTCA	F	5952-5974	660
CCCCAATCACCTCATCAAC	R	6592-6611	
CGCAATGTTCCCCAATTATC	F	6434-6453	767
TCATCACCGGAAAATACTGC	R	7181-7200	
ACACTGTTCTTATGGCTTT	F	7124-7143	651
TAGCCTGCATAATCTCAGCA	R	7755-7774	

Tabela 10 - Lista dos iniciadores utilizados para amplificação completa do genoma (RNA1 e RNA2) de *Citrus leprosis virus C* SJRP, com base na sequência geradas pela FASTERIS (Suíça) (conclusão)

Sequência do iniciador (5'–3')	Direção	Região-alvo	Tamanho do amplicon (pb)
RNA1			
ACCGTGAATTTGTATTTTGTCA	F	7686-7706	657
GTCAGCAACGGAATCCTTAG	R	8321-8341	
ACTGCCCTAAGTATGCTGAA	F	8036-8055	653
CAGCTGGAAGAGACTAGAAA	R	8668-8687	
RNA2			
TGTTCTAGGCTAATAACTCTCA	F	36-58	667-692
ATAAATCTAATCAAACCTATTGTA	Fa	11-45	
CTGAAACAGCTCATGAAACA	R	684-703	464
ACTTGTGTTTGTCAATTTGCC	F	608-627	
ATCGGCTTTATGACCTTACC	R	1052-1071	657
TATGTATTGAAGCGCGGTTT	F	931-951	
GCTTGATTTGTTGTAGGCTC	R	1568-1586	576
CAACCGGTTTGTACATATTGT	F	1492-1512	
AAGCCTTTGGTATTGAGTGA	R	2048-2067	682
GGGCAAGTACATATTGGTGA	F	1971-1991	
AACAACCAGATGATGTACAGA	R	2632-2652	650
TTCTGTGTCAATTATTCTATGC	F	2562-2584	
TCAATGGTATCAGCTATGTCG	R	3191-3211	667
GTTACTCCCAACTTACACTCA	F	3089-3109	
AACACGACCCGAAATGTTAT	R	3736-3755	550
GACAGGACTCATGTAAACGG	F	3669-3688	
CTGCTTGATGTCGGCAAC	R	4201-4218	813
CGAATAAACGCCTTTTGAGG	F	4130-4149	
CCACCAGCTAGAAGAGACTA	R	4921-4943	

O genoma completo do CiLV-C SJRP apresenta 13.757 nt de comprimento, distribuídos em 8.753 nt no RNA1 e 5.004 nt no RNA2. Globalmente, o RNA1 e RNA2 mostrou 85,6% e 88,3% de identidade, respectivamente, com o genoma de CiLV-C Cor (LOCALI et al., 2006) (Tabela 11). Os alinhamentos das sequências dos dois isolados de CiLV-C revelaram a presença de uma região altamente conservada nos primeiros 1400 nt da região terminal 5' do RNA2 (Figura 15). No RNA1, foram observados dois picos de alta semelhança entre os isolados, nas posições 500 e 1250, aproximadamente (Figura 15). Provavelmente essa região está associada com o motivo metiltransferase, codificado por sequências identificadas nesta região e conservados em uma ampla variedade de vírus de ssRNA (Rozanov et al., 1992). Outras comparações entre SJRP e Cor isolados revelou que os genes *RdRp* e *p29* apresentam 85,4 e 85% de identidade de nucleotídeos, respectivamente (Tabela 11). Na sequência da *p29* de CiLV-C SJRP detectou-se a presença de três aminoácidos deduzidos, nas posições 247 e 252 próximo ao local de início de

tradução da proteína, esses aminoácidos não são encontrados na sequência da *p29* de CiLV-C Cor.

Tabela 11 - Porcentagem de identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos entre o membro-tipo (CiLV-C) e as espécies tentativas (CiLV-C2) do gênero *Cilevirus*

CiLV-C SJRP	CiLV-C Cor		CiLV-C2 Colombia		CiLV-C2 Hawaii	
	Nt	Aa	nt	aa	nt	Aa
RNA1	85.6	-	60.1	-	60.1	-
ORF <i>RdRp</i>	85.4	93.1	61.4	58.5	61.4	58.4
ORF <i>p29</i>	85.0	89.4	49.2	32.7	49	32.1
RNA2	88.4	-	52.6	-	52	-
ORF <i>p15</i>	99.5	100.0	44.7	12.9	45.2	16.4
ORF <i>p61</i>	81.8	84.0	52	31.4	51.2	31
ORF <i>MP</i>	86.8	91.9	56.6	49.2	54.9	48.5
ORF <i>p24</i>	87.4	93.0	63.9	59.6	62	58.2
RI	96.7	-	46	-	46	-

As comparações de nucleotídeos das ORFs *p15*, *p61*, *MP* e *p24* do RNA2 apresentaram 99,5%, 81,8%, 87% e 87% de identidade, respectivamente com CiLV-C Cor (Tabela 11). A RI do RNA2, entre a *p15* e *p61*, mostrou 98,7% de identidade com a sequência de CiLV-C Cor. Apesar de terem sido observados elevados valores de identidade de nucleotídeos (> 98%) ao longo da *p15* e RI, excluindo esta parte, que abrange os primeiros 1400 nt do RNA2, o restante da molécula apresentou 84,2% de identidade com a região correspondente a CiLV-Cor. Curiosamente, a região 5' terminal do RNA2 de CiLV-C SJRP (*p15* e IR) apresentou os menores valores de identidade (\approx 45%) quando comparada com a região semelhante dos membros tentativos do gênero *Cilevirus*, CiLV-C2 e CiLV-C2 Hw (Tabela 11, Figura 15).

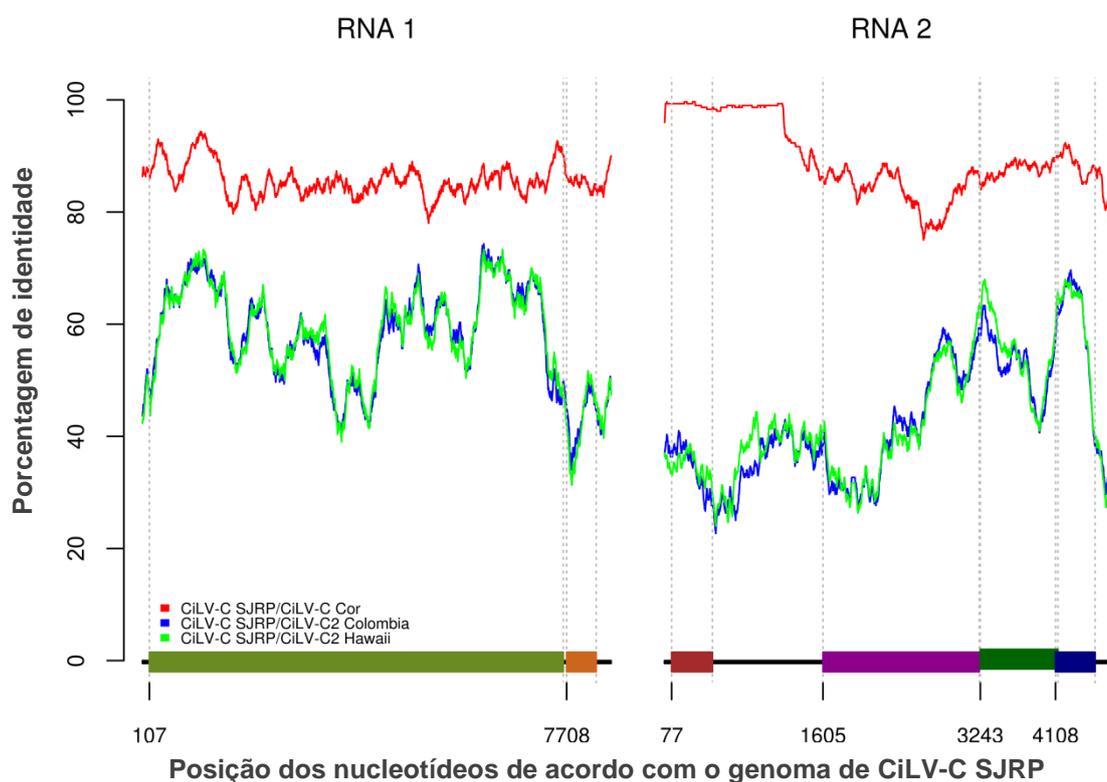


Figura 15 - Porcentagem de identidade de nucleotídeo ao longo da sequência genômica de CiLV-C SJRP comparada a CiLV-C Cor, CiLV-C2 Colômbia e CiLV-C2 Havaí. CiLV-C SJRP é referência para posição dos nucleotídeos e está indicado no início e fim de cada ORF

Em geral, os valores de identidade de nucleotídeos entre as ORFs de CiLV-C SJRP e CiLV-C2 foram menores (49-63,9%) do que os observados em comparação com CiLV-C Cor (85-99,5%) (Tabela 11). As sequências de aminoácidos deduzidos da RdRp de CiLV-C SJRP tem 93,1% de identidade com a região equivalente de CiLV-C Cor, ao passo que as proteínas previstas da *p24* e *MP* mostraram 93% e 91,4% de identidade, respectivamente. As comparações das proteínas codificadas pelas ORFs *p15* e *p61* mostraram a mais alta (100%) e a mais baixa (84%) identidade, respectivamente (Tabela 11).

CiLV-C SJRP apresenta as principais características biológicas semelhantes a CiLV-C Cor: transmissão por *Brevipalpus* sp., sintomas cloróticos/necróticos localizados, morfologia baciliforme e gama de hospedeiro. Atualmente não existe um limiar baseado na identidade de nucleotídeos ou mesmo critérios biológicos para definição das espécies do gênero *Cilevirus*. No entanto, com base nos dados de identidade do genoma de CiLV-C2 (ROY et al., 2013b), parece ser óbvia a existência de duas espécies de cilevirus associadas à leprose dos citros. O CiLV-C2 e CiLV-C

Cor apresentam 55% de identidade de nucleotídeo, por outro lado CiLV-C2 e CiLV-C Hw possuem cerca de 85% de identidade. Esses últimos vírus podem representar duas linhagens da espécie, separadas geograficamente e em diferentes hospedeiras (CiLV-C2 na Colômbia, infectando *C. sinensis* e CiLV-C2 Hw, no Havaí em hibisco). O CiLVC Cor e CiLVC SJRP também apresentam cerca de 85% de identidade de nucleotídeos ao longo do genoma; entretanto, as duas linhagens estão presentes na mesma área geográfica e compartilham os mesmos hospedeiros conhecidos até o momento, diferentemente do que é observado para CiLV-C2 e CiLV-C2 Hw. Mais trabalhos devem ser realizados com o objetivo de entender se outras forças (além da deriva genética) estão atuando sobre as duas linhagens de CiLV-C. Conhecer a relação vírus-vetor é uma etapa muito importante para relacionar a diversidade desses vírus com seus vetores. Recentemente, foi demonstrado que existe uma diversidade de *Brevipalpus* no Brasil (SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ et al., 2015), sendo que *B. phoenicis* passou a ser reconhecido como um complexo morfológico de espécies (BEARD et al., 2015) e *B. yothersi* é provavelmente o principal vetor de CiLV-C (BEARD et al., 2013; ROY et al., 2015a). Sendo assim, a caracterização das espécies de *Brevipalpus* vetores de CiLV-C Cor e SJRP é um ponto chave para a diferenciação entre essas linhagens.

4.2.1 Detecção diferencial de CiLV-C Cor e CiLV-C SJRP por RT-PCR

Um conjunto dos isolados do estudo de variabilidade foi analisado utilizando dois pares de iniciadores desenvolvidos para a identificação da *p29* de CiLV-C Cor e SJRP (Tabela 12). Como esperado, após análises de RT-PCR, fragmentos de aproximadamente 330 e 456 pb foram observados em amostras previamente identificadas como sendo infectadas por isolados do clado Cor e SJRP, respectivamente (Figura 16). Pôde-se observar a ausência de infecção mista nas amostras testadas. Nenhum dos pares de iniciadores detectou CiLV-C2, que foi amplificado apenas com os iniciadores específicos (ROY et al., 2013b) para a detecção deste vírus em amostra utilizada como controle positivo nas análises.

Tabela 12 - Iniciadores utilizados na detecção diferencial das estirpes de CiLV-C

Estirpe de CiLV-C	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Refêrencia
CiLV-C Cor	F: CAGAAGGCCGAGGTTGTAAAG	Este trabalho
	R: GTAGTGATCACTGAACTCGAATACC	
CiLV-C SJRP	F: GTAARCAAAAGGTCGAGGTTGTCC	Este trabalho
	R: TCTGTTGTCTAGCAGCRAGTAATG	

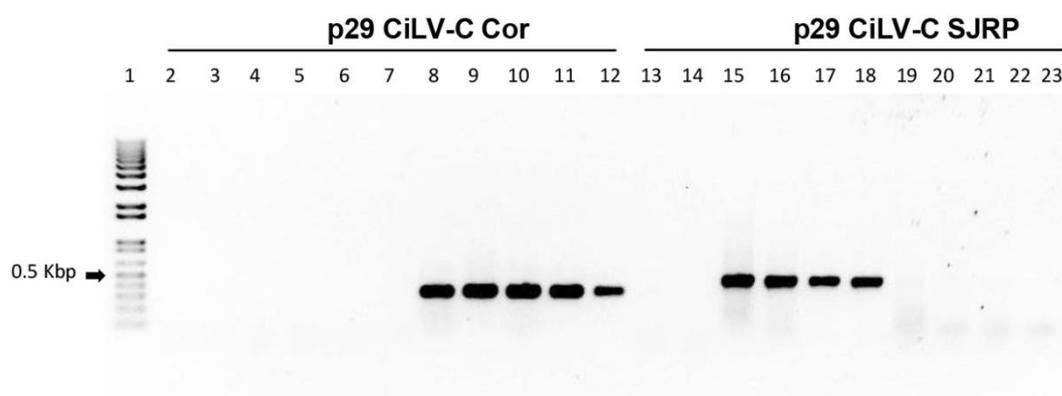


Figura 16 - Detecção diferencial entre isolados de CiLV-C Cor e CiLV-C SJRP por RT-PCR. Eletroforese de gel de agarose 1% dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de nove isolados de CiLV-C. p29 CiLV-C Cor e p29 CiLV-C SJRP indicam as reações realizadas com os iniciadores específicas para detecção de cada linhagem respectivamente. (1) Marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen, EUA); (2 e 13) Citros sadio; (3 e 14) Citros infectado com CiLV-C2, Colômbia; (4 e 15) *Arabidopsis thaliana* infectada com CiLV-C SJRP; (5 e 16) Citros, Cosmorama; (6 e 17) Citros, SJRP; (7 e 18) *Commelina benghalensis*, SJRP; (8 e 19) Citros, Argentina; (9 e 20) Citros, Londrina; (10 e 20) Citros, Brasília; (11 e 21) Citros, Maringá; (12 e 23) Citros, Salto de Itu

Em contraste com o diagnóstico tradicional de leprose dos citros baseado na amplificação parcial da *MP* (Locali et al., 2003), o qual detecta amplamente a população de CiLV-C no Brasil, a utilização dos dois pares de iniciadores com base na *p29* permite a detecção diferencial entre os isolados pertencentes ao clados Cor ou SJRP. Esse teste possibilitou identificar a presença do CiLV-C SJRP também nas cidades de Barretos e Reginópolis, além das localidades originais (Figura 17).

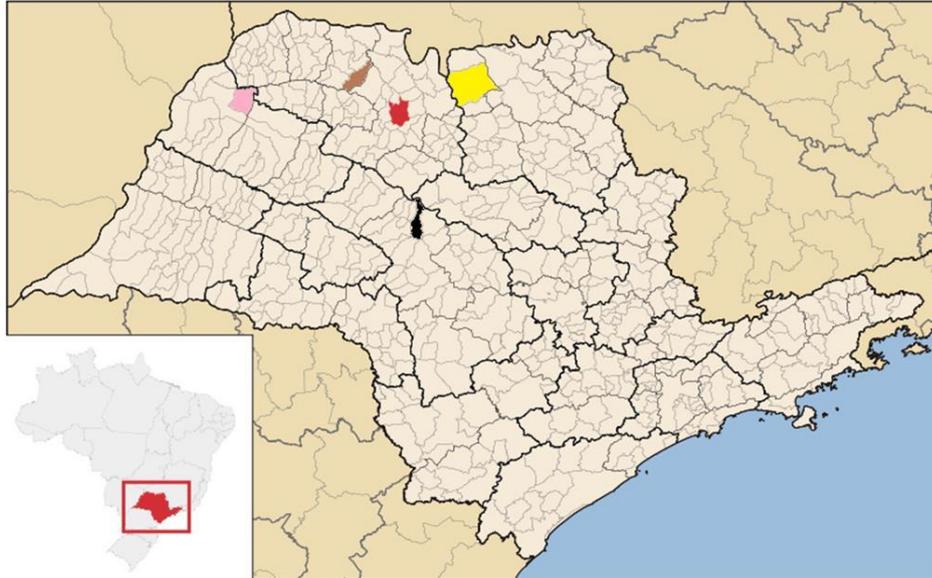


Figura 17 – Detecção por RT-PCR de isolados de CiLV-C da linhagem SJRP detectados no noroeste do estado de São Paulo, nas cidades de SJRP (rosa), Cosmorama (marrom), Sud Mennucci (vermelho), Barretos (amarelo) e Reginópolis (preto)

4.3 Caracterização molecular de Coffee ringspot virus isolado de Limeira, SP (CoRSV Limeira)

Até início de 2014, não se conhecia a sequência genômica completa do Coffee ringspot virus (CoRSV), agente causador da mancha anular do cafeeiro. Desta forma, um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar molecularmente CoRSV em plantas de *Coffea* sp. apresentando sintomas típicos da doença.

Para tanto, um isolado de CoRSV foi sequenciado a partir de plantas de *Coffea* sp. sintomáticas coletadas na região de Limeira, SP. O sequenciamento a partir de sRNA gerou uma biblioteca de 18.228.977 leituras. Foram retiradas as sequências genômicas de café (utilizou-se uma versão parcial do genoma desta planta), e os *contigs* que exibiam maior semelhança com os dichorhavirus foram alinhados, gerando o genoma inicial do isolado Limeira. Para validação do sequenciamento foram desenhados 24 pares de iniciadores (Tabela 13). Os fragmentos gerados foram sequenciados e as análises de bioinformática estão sendo realizadas para a obtenção do genoma completo de CoRSV Limeira. Para caracterização completa deste isolado também será realizado um novo sequenciamento dos extremos 3' e 5' das duas moléculas de RNA, pelo método Sanger, para posteriormente tornar essas sequências disponíveis no GenBank. No

entanto, com os as seqüências parciais de CoRSV Limeira, alguns resultados podem ser inferidos.

Tabela 13 - Lista dos iniciadores utilizados para amplificação completa do genoma (RNA e RNA2) de Coffee ringspot virus (CoRSV), com base nas seqüências geradas pela FASTERIS (Suíça)

Seqüência dos iniciadores (5'–3')	Direção	Região-alvo	Tamanho do amplicon (bp)
RNA1			
GAAACCAAAGACCCCACC	F:	1-18	650
ATAGGAACGGAGAGTGATCA	R:	631-650	
ATGAGACTTGCTGTGAAGAG	F:	551-570	682
CCTTCTGATGTTCTGAGAG	R:	1214-1233	
GCATCAAGGACAAAGCTAAC	F:	1140-1159	668
TGGGACTTGTTGATGAGATG	R:	1788-1807	
CCACCAAGATATGCAGGAAA	F:	1713-1732	665
ACAACAGAACACCATGTACT	R:	2358-2377	
TAGAGAGAGAAGACGCTGAA	F:	2289-2308	694
AACTGTCCTGCTTGATGATT	R:	2963-2982	
TTAGCAATATGGATGACGCA	F:	2905-2924	667
GAGTCAGTGTGGTGTAAATGT	R:	3552-3571	
TCCATATAACACGTCTGCTG	F:	3496-3515	650
GGGGATTAATCTTTTCCTTGG	R:	4125-4145	
CTGTTAAAAGGCCAGGTC	F:	4068-4086	679
AAGTCCTTTTCTCTGCTGTT	R:	4727-4746	
AACCTGGAATGCATAGATACA	F:	4657-4677	662
CTCCATATCCAACACCTTCC	R:	5299-5318	
GCTGCGGATTATGCTCTATA	F:	5220-5239	694
CTTTTATGTCTGGCCACTTG	R:	5894-5913	
GTCACATTCACATCAAGGAC	F:	5737-5756	480
TACGGTGTGCATCTGTTTT	R:	6198-6216	
RNA2			
CATAGTTTTACACATGATTTTCGC	F:	14-36	680
AGGCCATCTTCTATTCCGT	R:	675-693	
GCTAGATACATTCTTGCA	F:	595-614	650
ATCGTAGCTTTTCTAACCCC	R:	1225-1244	
GGCTCAATGTGCAACAAATT	F:	1149-1158	654
GGTGCTCAGTGATAGTGAAA	R:	1783-1802	
CTTCGCATTGATGTCTTTCA	F:	1750-1769	639
TCTGATAGAGATGTCATGAATGA	R:	2366-2388	
CAGACAGGGTTAATCAGGAC	F:	2298-2317	653
CTACGAAGAACAGCTAGACC	R:	2931-2950	
GTCTCGTTCGTTAGAGGATC	F:	2879-2898	666
GAGTATCTCCTTGACAGCAG	R:	3525-3544	
CACCAAAGAGAAGTTCAAGC	F:	3470-3489	662
ATCTGTCCTTACTTTGGCTG	R:	4112-4131	
AAATGATGACAAAATGGCGG	F:	4058-4077	666
GGGATTGATCTGGTTATGGG	R:	4704-4723	
CAATGTGATAGCCGACAGTA	F:	4655-4674	671
CTTGTGGACCATTGATCTCA	R:	5306-5325	
AGTTAGTTTCTCTGTTTCAAGC	F:	5237-5258	
TTGTGATAGGTCTCCGCTTA	R:	5697-5716	480

Até o momento, o genoma parcial de CoRSV Limeira apresenta 12.293 nt de comprimento, 6.481nt correspondem ao RNA1 e 5.812 nt ao RNA2. Durante o período do desenvolvimento deste trabalho foi disponibilizado o genoma do CoRSV isolado Lavras (RAMALHO et al., 2014). Globalmente CoRSV Limeira apresenta mais de 90% de identidade de nucleotídeos com o genoma de CoRSV Lavras (KF812525 e KF812526), 92,3% e 89,9% de identidade de nucleotídeo para o RNA1 e RNA2, respectivamente. A porcentagem de identidade de nucleotídeos entre as ORFs de CoRSV Limeira e CoRSV Lavras variou entre 97,4 (ORF5) e 98 (ORF3 e ORF4); contudo, a identidade de aminoácidos deduzidos foi superior a 98% em todas as ORFs analisadas. Na comparação com Orchid fleck virus (AB516441 e AB244418) a identidade foi de 46,5 e 58,2% para o RNA1 e RNA2, respectivamente, e com Citrus leprosis virus nuclear type (KF209275 e KF209276) a identidade foi de 52% para o RNA1 e 58,6% para o RNA2 (Tabela 14). Comparando a identidade de aminoácidos deduzidos de CoRSV Limeira com OFV, CiLV-N e CiNSV, os resultados variaram entre 45 e 71,4% (Tabela 14). De acordo com esses resultados, possivelmente CoRSV Limeira e CoRSV Lavras são estirpes de uma mesma espécie.

Tabela 14 - Porcentagem de identidade de nucleotídeo e aminoácidos deduzidos entre CoRSV Limeira e OFV e as espécies tentativas do gênero Dichorhavirus.

	CoRSV Limeira		CoRSV Lavras		OFV		CiLV-N		CiNSV	
	nt	aa	nt	aa	nt	Aa	nt	aa	nt	aa
RNA1	88,2	-	49,2	-	48,5	-	45,7	-		
ORF1	97,4	99,8	56,6	64,7	57	65	56,5	64,5		
ORF2	97,9	98,7	48,3	54,1	49,3	54,1	49,9	54,5		
ORF3	98	99,1	61,7	71,4	52,2	64,7	54,9	65		
ORF4	98	98,4	54,4	51,9	54,2	51,9	53,7	52,4		
ORF5	97,4	98,1	49	46	48,3	45	48,3	45		
RNA2	87,9	-	58,2	-	57,5	-	57,8	-		
ORF6	93	98	61,1	69,8	60,8	69,9	60,6	68,9		

^aCoRSV Lavras (KF812525 KF812526); ^bOFV (AB516441 e AB244418); ^cCiLV-N (KF209275 e KF209276)

No entanto, a identidade de nucleotídeos destes isolados com o OFV, membro-tipo do gênero proposto Dichorhavirus, é cerca de 60%, evidenciando se tratar de uma outra espécie. Isolados de CoRSV foram recentemente detectados em

vários estados brasileiros, como Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo (RAMALHO et al., 2015). Resultados sobre a filogenia e sintomatologia causada por CoRSV indicam que embora esses vírus apresentem baixa variabilidade, causam sintomas diferenciados, sendo que o clima e a cultivar do cafeeiro são os principais fatores relacionados a essa variação (RAMALHO et al., 2015).

Por outro lado, os dois vírus da leprose dos citros do tipo nuclear (CiLV-N e CiNSV) apresentam mais de 90% de identidade de nucleotídeos ao longo do genoma de OFV (Figura 18). Essas relações filogenéticas indicam que CiNSV e CiLV-N são estirpes de OFV que infectam citros e as pequenas diferenças no genoma destes vírus podem estar relacionadas com a adaptação a uma nova planta hospedeira e/ou vetor (RAMOS-GONZALÉZ et al., 2015; DIETZGEN et al. 2014; ROY et al., 2014b).

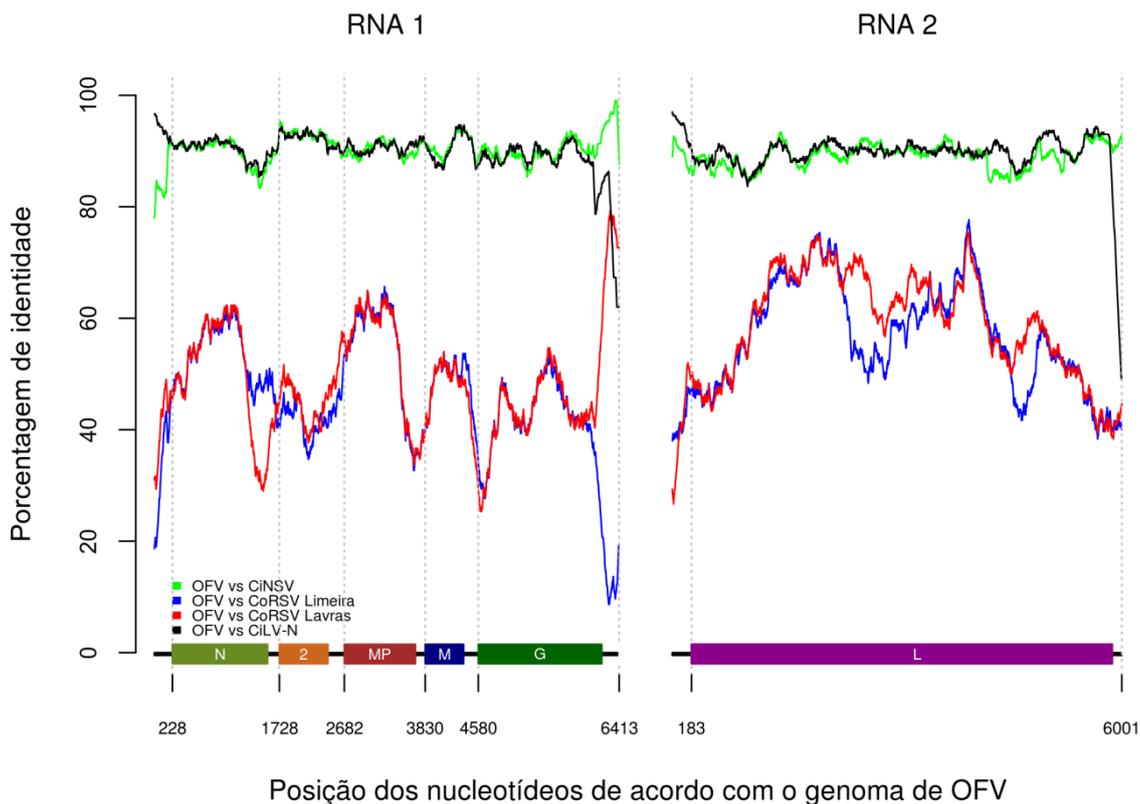


Figura 18 - Porcentagem de identidade de nucleotídeo ao longo da sequência genômica de OFV comparado a CoRSV Limeira, CoRSV Lavras e CiLV-N. OFV (NC009608 e NC009609) é referência para posição dos nucleotídeos e está indicado no início e final de cada ORF

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram identificadas duas linhagens de CiLV-C no Brasil, Cor e SJRP. O CiLV-C Cor encontra-se amplamente distribuído no país e em alguns outros países, como Argentina, México, Panamá e Paraguai, enquanto CiLV-C SJRP foi detectado apenas no noroeste do estado de São Paulo;

Globalmente, a população de CiLV-C apresenta uma variabilidade genética baixa, possivelmente resultado de contínuos efeitos de gargalo. No entanto, a ocorrência da linhagem SJRP imprime uma diversidade superior à espécie;

O CiLV-C SJRP é um recombinante natural, sendo que o parental minoritário é um isolado de CiLV-C pertencente a linhagem Cor e o parental maioritário é ainda desconhecido; eventos de recombinação similares estão presentes no RNA2 de todas as estirpes de CiLV-C SJRP estudadas;

Desenvolveu-se um teste baseado em RT-PCR que permite a detecção diferencial das estirpes Cor e SJRP de CiLV-C;

As sequências de CoRSV Limeira apresentam mais de 90% de identidade de nucleotídeos com CoRSV Lavras. Os dois isolados são estirpes de uma mesma espécie.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, B.K. ; KITAJIMA, E.W. ; KUBO, K; REZENDE, J.A.M. Transmissão do vírus da mancha clorótica do *Clerodendrum*. In. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1., 2005, Piracicaba **Resumos...** Piracicaba: ESALQ 2005. 1 CD-ROM

ALMEIDA, J.E.M.; FIGUEIRA, A.R.; COSTA, R.R.; GALVINO, S.B.F.; CAMARGOS, V.N.; RABELO FILHO, F.A.C.; OLIVEIRA, C.L. *Amaranthus deflexus*: uma nova hospedeira para Coffee ringspot virus (CoRSV). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, p. 295-295, 2008. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte.

ALMEIDA, J.E.M.; FIGUEIRA, A.R.; GALDINO, S.B.F.; FERRO, H.M.; PEREIRA, S.L. Erva de Santa Maria (*Chenopodium ambrosioides*) é uma hospedeira eficiente para o Coffee ringspot vírus (CoRSV). **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 32S, p. S 58, 2006. Suplemento. Apresentado no CONGRESSO PAULISTA, 39., 2006, São Paulo.

ALMEIDA, J.E.M.; MORI, A.E.; POZZA, E.A.; REIS, P.R.; FIGUEIRA, A.D. Temporal analysis and control of the ringspot disease and mite vector of Coffee ringspot virus. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 47, p. 913–919, 2012.

ANTONIOLI-LUIZON, R. **Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética**. 2009, 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ARENA, G.D.; BERGAMINI, M.P.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; FREITAS-ASTÚA, J. *Citrus leprosis virus C infects Arabidopsis thaliana*, the model for plant-pathogen interactions. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 95, n. 2, p. 447-452, 2013.

ARRIVABEM, F.; RODRIGUES, V.; FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; NOVELLI, V.M.; NAKAGAWA, E.K.; MACHADO, M.A. Transmissão diferencial do Vírus da Leprose dos Citros por populações de *Brevipalpus phoenicis*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 31, p. 64, 2005. Suplemento.

BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; YAKAMOTO, P.T. Adeus à leprose. **Revista Cultivar Hortaliças e Frutas**, Pelotas, v. 10, p. 6-8, 2002.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, p. 211-220, 2006.

BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.; KUBO, K.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n. 3, p. 284-292, 2010.

BASTIANEL, M.; CRISTOFANI, M.; OLIVEIRA, A.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; GARCIA, A.A.F.; RESENDE, M.D.V.; RODRIGUES, V.; MACHADO, M.A. Quantitative Trait Loci analysis of citrus leprosis resistance in an interspecific backcross family of (*Citrus reticulata* Blanco x *C. sinensis* L. Osbeck) x *C. sinensis* L. Osb. **Euphytica**, Wageningen, v. 169, n. 1, p. 101-111, 2009.

BEARD, J.J.; OCHOA, R.; BAUCHAN, G.R.; TRICE, M.; REDFORD, A.; WALTERS, T.; MITTER, C. **Flat mites of the world**. 2013. Disponível em: <<http://idtools.org/id/mites/flatmites/>> Acesso em: 08 nov. 2015.

BEARD, J.J.; OCHOA, R.; BRASWELL, E.W.; BAUCHAN, G.R. *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae): a closer look. **Zootaxa**, New Zealand, n. 3944, p. 1-68, 2015.

BERRY, J.A.; FAN, Q.-H. Biological notes and risk status of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) in New Zealand. **Systematic and Applied Acarology**, London, v. 17, n. 2, p. 224–230, 2012.

BERTRAND, B.; BOULANGER, R.; DUSSERT, S.; RIBEYRE, F.; BERTHIOT, L.; DESCROIX, F.; JOET, T. Climatic factors directly impact the volatile organic compound finger- print in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food Chemistry**, London v. 135, p. 2575–2583, 2012.

BITANCOURT, A.A. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 4, p. 404-405, 1938.

BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a leprose dos citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 161-231, 1955.

BITANCOURT, A.A. Relação das doenças e fungos parasitas observados na secção de Fitopatologia durante os anos de 1931 e 1932. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 5, p. 185-196, 1934.

BLANCHFIELD, A.L.; MACKENZIE, A.M.; GIBBS, A.; KONDO, H.; TAMADA, T.; WILSON, C.R. Identification of *Orchid fleck virus* by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and analysis of isolate relationships. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, p. 713-718, 2001.

BOARI, A. J.; FREITAS-ASTUA, J.; FERREIRA, P. T.; NEDER, D. G.; NOGUEIRA, N.; ROSSI, M. L.; KITAJIMA, E. W. Purification and serology of the Coffee ringspot virus (CoRSV). **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 453-58, 2004.

BOARI, A.J. **Mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus – CoRSV)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2011. 43 p.

BOARI, A.J.; FIGUEIRA, A.R.; NEDER, D.G.; SANTOS, R.C.; GOUSSAIN, M.M.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L. Vírus da mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus – CoRSV): influência na qualidade da bebida e na produção de grãos de café. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 192-194, 2006.

BOARI, A.J.; FREITAS-ASTUA, J.; FERREIRA, P.T.; NEDER, D.G.; NOGUEIRA, N.; ROSSI, M.L.; KITAJIMA, E.W. Purification and serology of the Coffee ringspot virus (CoRSV) and its relationship with Orchid fleck virus (OFV). **Virus Research and Research**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 201, 2003.

BUJARSKI, J.J. Genetic recombination in plant-infecting messenger-sense RNA viruses: overview and research perspectives. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, p. 1-68, 2013.

CÁCERES, S.; AGUIRRE, A.; COSTA, N.; COLL, O.; GONZÁLES SEGNANA, L.; FARIÑA, N.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; MORAES, G.J.; FREITAS-ASTUA, J.; PEREIRA, J.A.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Present status of citrus leprosis in Argentina and Paraguay. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, p. 282–294, 2013.

CHAGAS, C. M. **Mancha-anular do Cafeeiro: transmissibilidade, identificação do vetor e aspectos anátomo-patológicos da espécie *Coffea arabica* L. afetada pela moléstia**. 1978, 132p. Tese (Doutorado em Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

CHAGAS, C.M. Associação do ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes à mancha anular do cafeeiro. **O Biólogo**, São Paulo, v. 39, p. 229-232, 1973.

CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI-FABRIS, E. Isolado distinto do vírus da mancha anular do cafeeiro (CoRSV). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 135, 2007. Suplemento.

CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V. Coffee ringspot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in coffee. **Experimental and Applied Acarology**, Dordrecht, v. 30, p. 203-213, 2003.

CHAGAS, C.M.; ROSSETTI, V.V. Transmission of leprosis by grafting In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., Puerto Iguazu, 1984. **Proceedings**. Riverside: IOCV, 1984. p.211-214.

CHANG, M.U.; ARAI, K.; DOI, Y.; YORA, K. Morphology and intracellular appearance of orchid fleck virus. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 42, p. 156–167, 1976.

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 8, p. 813-816, 1986.

CHIGIRA, A.; MIURA, K. Detection of 'Candidatus Cardinium' bacteria from the haploid host *Brevipalpus californicus* (Acari: Tenuipalpidae) and effect on the host. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdã, v. 37, p. 107-116, 2005.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V. Notes on acari species on ornamental plants from Central America imported for propagation in Florida and potential risks of exotic pest introductions. **Florida entomologist**, Gainesville, v. 88, p. 408-414, 2005.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; DERRICK, K.S.; ACHOR, D.S.; FRENCH, J.V.; WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 181-202, 2003b.

CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; WELBOURN, W.C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 29-105, 2003a.

CHOUDHARI, K.G.; MALI, V.R. Leprosis disease and its role in citrus dieback. **Science & Culture**, Calcutta, v. 44, p. 166-167, 1978.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALETTI, S.R.; ROSSETTI, V.V.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.

CRUZ-JARAMILLO, J.L.; RUOIZ-MEDRANO, R.; ROJAS-MORALES, L.; LÓPEZ-BUENFIL, J.A.; MORALES-GALVÁN, O.; CHAVARÍN-PALACIO, C.; RAMÍREZ-POOL, J.A.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Characterization of a proposed *Dichorhavirus* associated with the citrus leprosis disease and analysis of the host response. **Viruses**, Warwick, v. 6, p. 2602–2622, 2014.

DAVIS, A.P.; GOLE, T.W.; BAENA, S.; MOAT, J., The impact of climate change on indigenous Arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. **PloS One**, San Francisco, v. 7, p. 479-481, 2012.

DELPORTE, W.; POON, A.F.Y.; FROST, S.D.W.; KOSAKOVSKY, SL. Pond Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. **Bioinformatics**. Oxford, v. 26, n. 19, p. 2455-2457, 2010. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/26/19/2455.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 nov 2015.

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. *Dichorhavirus* - a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 159, p. 607-619, 2014.

DOI, Y.; ARAI, K.; YORA, K. Ultrastructure of bacilliform virus found in *Euonymus japonicum* with mosaic and *Cymbidium* with ringspot. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, Tokyo, v. 35, p. 388, 1969.

DOI, Y.; CHANG, M.U.; YORA, K. *Orchid fleck virus*. **Descriptions of Plant Viruses**, Warwick, v. 183, p. 1-3, 1977.

DOMINGO-CALAP, P.; SANJUÁN, R. Experimental evolution of RNA versus DNA viruses. **Evolution**, Lancaste, v. 10, p. 2987–2994, 2011.

EASTON, A. J.; PRINGLE, C.R. Order Mononegavirales. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (eds) *Virus taxonomy— Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. **Elsevier/Academic Press**, London, p. 653–657, 2011.

EMBRAPA. **Produção integrada de citros – BA**. Comunicado Embrapa, 2007. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Citros/CitrosBahia_2ed/importancia.htm>. Acesso em: 10 nov 2015.

FAWCETT, H.S. **Citrus diseases and their Control**. New York, McGraw Hill 1936.582 p.

FAWCETT, H.S.; BURGER, O.F. A variety of *Cladosporium herbarum* on *Citrus aurantium* in Florida. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 1, p. 164-166, 1911.

FERREIRA, P.T.O. **Caracterização de um vírus baciliforme isolado de *Solanum violaefolium* transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari:Tenuipalpidae)**. 2005. 97 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

FIGUEIRA, A.R.; PASSETO, L.A.; CARVALHO, C.M. A disseminação do vírus da mancha anular do cafeeiro em Minas Gerais tem aumentado acima das expectativas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 317, 1998. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, n.31, 1998, Fortaleza. Abstracts 31.

FIGUEIRA, A.R.; REIS, P.R.; CARVALHO, V.L.; PINTO, A.C.S. Vírus da mancha anular do cafeeiro tem causado prejuízos relevantes aos cafeicultores da região do Alto Paranaíba. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 299, 1995. Suplemento.

FREITAS-ASTÚA, J.; FERREIRA, P.T.O.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Partículas baciliformes associadas a manchas verdes e cloróticas em folha de dama-da-noite (*Cestrum nocturnum* – Solanaceae). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 210, 2002. Apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 35., 2002a, Recife.

FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.; BASTIANEL, M. Identification of Citrus leprosis virus-nuclear type (CiLV-N) in sweet orange in the State of Rio Grande do Sul. **Virus Reviews & Research**, Rio de Janeiro, v. 9, supl. 1, p. 247, 2004.

FREITAS-ASTÚA, J.; MOREIRA, L.; RIVERA, C.; RODRIGUEZ, C.M.; KITAJIMA, E.W. First report of Orchid fleck virus in Costa Rica. **Plant Disease**, Saint Paul, v.86: p.1402, 2002b.

FREZZI, M.J. La lepra explosiva del naranjo. Investigaciones realizadas por el laboratorio de patología de Bela Vista (Corrientes). **Boletín Frutas y Hortalizas**. Buenos Aires, n. 5, p. 1-16, 1940.

GARCÍA-ARENAL, F.; FRAILE, A.; MALPICA, J.M. Variability and genetic structure of plant virus populations. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto; v. 39, p.157-186, 2001.

GARITA, L. **Relação vírus-vetor-hospedeiro no patossistema da leprose dos citros**. 2013. 96 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)– Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

GARITA, L.C.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.S.; RENATO, B.; ROMÃO, G.O.; KITAJIMA, E.W. Experimental host range of *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 43-55, 2014.

GIBBS, A.; CALISHER, C.; GARCÍA-ARENAL, F. **Molecular basis of virus evolution**. New York: Cambridge University Press, 1995, 624p.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A.; BLANCHFIELD, A.; CROSS, P.; WILSON, C.; KITAJIMA, E. W.; NIGHTINGALE, M.; CLEMENTS, M. Viruses of orchids in Australia; their identification, biology and control. **Australian Orchid Review**, Sydney, v. 65, p. 10–21, 2000.

GOMES, R.T.; KITAJIMA, E.W.; TANAKA, F.A.O.; MARQUES, J.P.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomia de lesões foliares causadas pelo vírus da Mancha Clorótica do *Clerodendrum*, transmitido pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* em diferentes espécies. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 4, p. 291-297, 2010.

GONZÁLES, R.H. Revision of the *Brevipalpus phoenicis* “complex” with descriptions of new species from Chile and Thailand (Acarina: Tenuipalpidae). **Acarologia**, Paris, v. 17, p. 81-91, 1975.

GOWANLOCK, D.H.; DIETZEGEN, R.G. Small rhabdovirus-like particles in violet (*Viola* spp.). **Australasian Plant Pathology**, Brisbane, v. 24, p. 215-216, 1995.

GRANER, E. A.; GODOY JUNIOR, C. **Manual do cafeicultor**. São Paulo: USP, 1967. 320 p.

GRÃO, L.V.C. **Comportamento da mancha anular do cafeeiro e sua influência na qualidade de bebida do café**. 2007. 82 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

GREENBAUM, B.D.; LI, O.T.W.; POON, L.L.M.; LEVINE, A.J.; RABADAN, R. Viral reassortment as an information exchange between viral segments. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 109, n. 9, p. 3341–3346, 2012.

GROSS, M. Coffee growers feel the heat. **Current Biology**, London, v. 19, p. 965–966, 2009.

GUTIÉRREZ, S.; MICHALAKIS, Y.; BLANC, S. Virus population bottlenecks during within-host progression and host-to-host transmission. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v. 2, suppl. 5, p. 546–55, 2012.

HARAMOTO, F.H. Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acarina: Tenuipalpidae). **Hawaii Agricultural Experimental Station Technical Bulletin**, Hawai, n. 68, p. 1-63, 1969.

HARTUNG, J.S.; ROY, A.; FU, S.; SHAO, J.; SCHNEIDER, W.L. BRLANSKY, R.H. History and diversity of *Citrus leprosis virus* recorded in herbarium specimens. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 3, p. 15-64, 2015.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV taxonomy history for higrevirus**. Disponível em: <http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20133510&taxa_name=Higre virus>. Acesso em: 06 maio 2015.

IZQUIERDO, C.I.; ZERMEÑO, D.L.F.; MENDEZ, W.; OTERO-COLINA, G.; FREITAS-ASTUA, J.; LOCALI-FABRIS, E.C.; MORAES, J.G.; CALEGARIO, R.F.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. Confirmation of the presence of the *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) in Southern Mexico. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 400-403, 2011.

JACKSON, A.O.; DIETZGEN, R.G.; GOODIN, M.M.; BRAGG, J.N.; DENG, M. Biology of plant rhabdoviruses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 623-660, 2005.

KITAJIMA, E.W.; CALEGARIO, R.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; FRANCISCHINI, F.J.B. *In situ* detection of

CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of virus/vector relationship and model for a virus circulation in the mite. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, p. 289, 2008a. Suplemento.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; BRAGHINI, M.T.; FAZUOLI, L.C. LOCALI-FABRIS, E.C.; SALAROLI, R.B. Natural infection of several *Coffea* species and hybrids and *Psilanthus ebracteolatus* by the Coffee ringspot virus (CoRSV). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, p. 503–507, 2011a.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. Citrus leprosis in Florida, USA, appears to have been caused by the nuclear type of Citrus leprosis virus N (CiLV-N). **Virus Review and Research**, Ribeirão Preto, v. 16, p. 23-27, 2011b.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus* transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 135-160, 2003a.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Partículas baciliformes associadas à mancha anular do cafeeiro. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 24, p. 542-545, 1972.

KITAJIMA, E.W.; GROOT, T.V.M.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ALBERTI, G.; MORAES, G.J. *In situ* observation of the *Cardinium* symbionts of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) by electron microscopy. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 42, p. 263-271, 2007.

KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; MACKENZIE, A.; REZENDE, J.A.M.; GIORIA, R., GIBBS, A.; TAMADA, T. Comparative cytopathology and immunocytochemistry of Japanese, Australian and Brazilian isolates of orchid fleck virus. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 67, p. 231–237, 2001.

KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; FERREIRA, P.T.O.; ALCÂNTARA, B.K.; BOARI, A.J.; GOMES, R.T.; FREITAS-ASTUA, J.; REZENDE, J.A.M.; MORAIS, J.M.; SALAROLI, R.B. Chlorotic spots on *Clerodendrum*, a disease caused by a nuclear type of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) transmitted virus. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 1, p. 36-49, 2008b.

KITAJIMA, E.W.; MORAES, G.J. Manchas cloróticas em *Clerodendrum x speciosum* e mancha anular em *Solanum violaefolium* associadas a efeitos citopáticos similares aos dos vírus transmitido pelo ácaro *Brevipalpus*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p. 133-134, 2000.

KITAJIMA, E.W.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, W. Short, rodlike particles associated with citrus leprosis. **Virology**, New York, v. 50, p. 254-258, 1972.

KITAJIMA, E.W.; PEDRAZZOLI, D.S.; NOVAES, Q.S.; GIORIA, R.; REZENDE, J.A.M.; MORAES, G.J.; RODRIGUES, J.C.V. Ivy green spot and *Schefflera* ringspot:

two additional cases of plant diseases caused by citrus leprosis type virus. **Virus Review Research**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 148–149, 1999.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V.; CHIAVEGATO, L.G.; PIZA JR., C.T.; MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 4, p. 555-559, 1997.

KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.V.C. Passion fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuiplapidae) in passion fruit in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 225-231, 2003b.

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTÚA, J. Updating the list of plant species naturally infected with viruses transmitted by *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuiplapidae). In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY- CARIBBEAN DIVISION, 45., San Jose. **Proceedings...** Saint Paul: APS Press, 2005. 1 CD-ROM.

KITAJIMA, E.W.; ROSILLO, M.A.; PORTILLO, M.M.; MÜLLER, G.W.; COSTA, A.S. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. **Fitopatologia**, Brasília, v. 9, p. 55–56, 1974.

KITAJIMA, E.W.; TASSI, A.D.; MORAES, G.J.; NOVELLI, V.M.; CACERES, S. Asymmetry in the number of solenidium in the tarsi of leg II in some *Brevipalpus* populations viruses. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ACAROLOGY, 13., 2010, Recife. **Proceedings...** Recife: Local Organizing Committee, 2010. p. 123.

KNORR, L.C. The etiology of leprosis in citrus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., 1968, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida Press, 1968. v. 4, p.332-341.

KONDO, H.; MAEDA, T.; SHIRAKO, Y.; TAMADA, T. Orchid fleck virus, a Rhabdovirus with an unusual bipartite genome. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 2413-2421, 2006.

KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T. *Orchid fleck virus: Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 215-223, 2003.

KUBO, K.S. **Detecção e variabilidade do gene do nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas (“Orchid Fleck virus” – OFV)**. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

KUCHIBHATLA, D.B.; SHERMAN, W.A.; CHUNG, B.Y.W.; COOK, S.; SCHNEIDER, G.; EISENHABER, B.; KARLIN, D.G. Powerful sequence similarity search methods and in-depth manual analyses can identify remote homologs in many apparently “orphan” viral proteins. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, p. 10-20, 2014.

LAL, L.; MUKHARJI, S.P. Observation of the injury symptoms caused by phytophagous mites. **Zoologiska Bidrag fran Uppsala**, Uppsala, v. 25, n. 1, p. 13–17, 1979.

LEÓN, M.G.; BECERRA, C.H.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) in Colombia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 1364, 2008.

LESEMANN, D.; DORAISWAMY, S. Bullet-shaped virus-like particles in chlorotic and necrotic leaf lesions of orchids. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 83, p. 27–39, 1975.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

Disponível em:

<<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/25/11/1451.full.pdf+html>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

LIMA, M.L.R.C.; COSTA LIMA N.V.; SOUZA, V.B.V. The causal agent of the *Ligustrum* ringspot disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 1216, 1991.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to the citrus production in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, p. 1317-1321, 2003.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M.A. Genus *Cilevirus*. In: KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J.(Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier, 2012. p. 1139-1142.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A. ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of *Citrus leprosis virus* cytoplasmic type. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 2721-2729, 2006.

MAEDA, T.; KONDO, H.; MISUHATA, K.; TAMADA, T. Evidence that orchid fleck virus is efficiently transmitted in a persistent manner by the mite *Brevipalpus californicus*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7., 1998, Edinburg. **Proceedings...** Edinburg: The International Society for Plant Pathology,

1998. p. 13-18. Disponível em: <<http://www.bspp.org.uk/icpp98/1.13/18.html>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

MARTIN, D.P.; LEMEY, P.; LOTT, M.; MOULTON, V.; POSADA, D.; LEFEUVRE, P.; RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. **Bioinformatics**. Oxford, v. 26, suppl. 19, p. 2462–2463, 2010. Disponível em: <<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/26/19/2462.full.pdf+html>>. Acesso em: 18 fev. 2015.

MASCARENHAS, G.; KITAJIMA, E.W.; PEREIRA, J.A.; KUBO, K.S.; FREITAS-ASTÚA, J. *Passiflora edulis*: uma nova hospedeira para o vírus da mancha anular do cafeeiro (CoRSV). **Tropical and Plant Pathology**, Brasília, v. 34, p. S269, 2009. Suplemento.

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; HU, J.S. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, n. 1, p. 122-127, 2013a.

MELZER, M.J.; SIMBAJON, N.; CARILLO, J.; BORTH, W.B.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; NEUPANE, K.R.; HU, J.S. A *Cilevirus* infects ornamental hibiscus in Hawaii. **Archives of Virology**, New York, v. 158, n. 11, p. 2421-2424, 2013b.

MIRANDA L.C.; NÁVIA D.; RODRIGUES J.C.V. *Brevipalpus* mites Donnadieu (Prostigmata: Tenuipalpidae) associated with ornamental plants in Distrito Federal, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina v. 36, suppl. 4, p. 587-592, 2007.

MORAES, F.H.R.; BELO, W.R.F.; MORAES, G.J.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência do vírus da pinta verde em maracujá no Estado do Maranhão, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 1, p. 100, 2006.

MUSHEGIAN, A.R.; ELENA, S.F. Evolution of plant virus movement proteins from the 30K superfamily and of their homologs integrated in plant genomes. **Virology**, New York, v. 15, p. 476-304, 2015.

NEVES, M.F.; JANK, M.S.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G.; FAVA, B.B. **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015**. São Paulo: CitrusBR, 2006. 89 p.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; LOPES, F.F.; KALAKI, R.; MILAN, P. **The orange juice business: a Brazilian perspective**. Wageningen: Wageningen Academic, 2011. Disponível em: <<http://www.crossref.org/iPage?doi=10.3920%2F978-90-8686-739-4>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**, São Paulo: CitrusBR, 2010. 138 p.

NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.; ANTONIOLI LUIZON, R.; SCHONS, J.; MACHADO, M.A. Evidence suggesting that *Brevipalpus phoenicis*-Citrus leprosis virus interaction may not be of the circulative propagative type. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 12., 2007, Adana. **Annals...** Adana: IOCV, 2007. p. 284-292.

NOVELLI, V. M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; LOCALI, E. C.; ARRIVABEM, F.; HILF, M. E.; GOTTWALD, T. R.; MACHADO, M. A. Detecção do vírus da leprose do citros (CiLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). **Fitopatologia Brasileira, Brasília** v.30 p.183, 2005.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; SEGATTI, N.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Aquisição e inoculação do vírus da leprose dos citros (CiLV-C) por machos e fêmeas de *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 32, p. S293, 2007. Suplemento.

NUNES, M.A.; BERGAMINI, MP, COERINI, LF, BASTIANEL, M., NOVELLI, VM, KITAJIMA, EW, FREITAS-ASTUA, J. *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) naturally infecting *Commelina benghalensis*, a prevalent monocot weed of citrus orchards in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 5, p. 770, 2012.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASSUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.; FRANCO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO, JÚNIOR H.; OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P.F.; FERRARI, F.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; FRANCISCHINI, F.J.B.; SILVA, J.M.F.; ARRUDA, P.; FERRO, J.A.; REINACH, F.; SILVA, A.C.R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of citrus leprosis associated virus, Cytoplasmatic type (CiLVC). **Virus Gene**, New York, v. 32, p. 289-298, 2006.

PEI, J.; GRISHIN, N.V. PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. **Bioinformatics**. Oxford, v. 23, p. 802-808, 2007.

Disponível em:

<<http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/23/7/802.full.pdf+html>>. Acesso 20 mar. 2015.

POON, A.F.Y.; FROST, S.D.W.; POND, S.L.K. Detecting signatures of selection from DNA sequences using datamonkey. In: POSADA, D. (Ed.). **Bioinformatics for DNA sequence analysis**. New York: Humana Press, 2009. v. 537, p. 163–183.

PU, Y.; KIKUCHI, A.; MORIYASU, Y.; TOMARU, M.; JIN, Y.; SUGA, H.; HAGIWARA, K.; AKITA, F.; SHIMIZI, T.; NETSU, O. SUZUKI, N.; UEHARA-ICHIKI, T.; SASAYA, T.; WEI, T. YI-LI, OMURA, T. *Rice dwarf viruses* with dysfunctional genomes generated in plants are filtered out in vector insects: implications for the origin of the virus. **Journal of Virology**. Washington, v. 23, p. 2975-2979, 2011.

RAMALHO, T.O.; FIGUEIRA, A.R.; SOTERO, A.J.; WANG, R.; GERALDINO DUARTE P.S.; FARMAN, M.; GOODIN, M.M. Characterization of Coffee ringspot virus - Lavras: A model for an emerging threat to coffee production and quality. **Virology**, New York, v. 464/465, p. 385–396, 2014.

RAMALHO, T.O.; FIGUEIRA, A.R.; WANG, R.; JONES, O.; HARRIS, L.E.; GOODIN, M.M. Detection and survey of coffee ringspot virus in Brazil. **Archives of Virology**, New York, v. 160, p. 1-9, 2015.

RAMÍREZ, B.C.; BARBIER, P.; SÉRON, K.; HAENNI, A.L.; BERNARDI, F. 1995. Molecular mechanisms of point mutation in RNA viruses. In: Gibbs, A.J.; Calisher, C.H.; García-Arenal, F. editors. **Bases moleculares da evolução do vírus**, Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press; v. 65, p. 105-118, 1995.

RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SARUBBI-ORUE, H.; GONZALES-SEGNANA, L.; CHABI-JESUS, C.; FREITAS-ASTÚA, F.; KITAJIMA, E.W. *Orchid fleck virus* infecting orchids in Paraguay: first report and use of degenerate primers for its detection. **Journal of Phytopathology**, St. Paul, v. 163, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jph.12420/epdf>>. Acesso em: 15 set. 2015.

REIS, P.R. *Brevipalpus phoenicis*, ácaro da mancha-anular do cafeeiro: bioecologia, dano e controle. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Anais...** Brasília: Embrapa Café, 2002. p. 257-280.

REYES, T. T. Seed transmission of coffee ring spot by Excelsa coffee (*Coffea excelsa*). **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 45, p. 185, 1961.

REYES, T.T. Ringspot of coffee in the Philippines. **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 8, p.11-12, 1959.

RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 59, p. 165–175, 2013.

RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; NOGUEIRA, N.L. Uma estratégia para o controle da leprose dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 22, p. 411-423, 2001.

RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161-179, 2003.

RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L.; FREITAS, D.S.; PRATES, H. Virus-like particles associated with *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae), vector of citrus leprosis virus. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, p. 391-395, 1997.

RODRIGUES, J.C.V.; RODRIGUES, C.M.; MOREIRA, L.; VILLALOBOS, W.; RIVERA, C.; CHILDERS, C.C. Occurrence of coffee ringspot virus, a *Brevipalpus* mite-borne virus in coffee in Costa Rica, Central América. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, n. 5, p. 564, 2002.

ROOSSINCK, M., J. Mechanisms of plant virus evolution. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, California, v.35, p.191–209, 1997.

ROSSETTI, V.; NAKADAIRA, J.T.; CALZA, R.; MIRANDA, C.A.B. A propagação da clorose zonada dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **O Biológico**, São Paulo, v. 31, n. 3, p.113-116, 1965.

ROY, A.; CHOUDHARY, N.; GUILLERMO, L.M.; SHAO, J.; GOVINDARAJULU, A.; ACHOR, D.; WEI, G.; PICTON, D.D.; LEVY, L.; NAKHLA, M.K.; HARTUNG, J. S.; BRLANSKY, R.H. A novel virus of the genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus leprosis. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 103, p. 488-500, 2013b.

ROY, A.; HARTUNG, J.S.; SCHNEIDER, W.L.; SHAO, J.; LÉON, G.; MELZER, M.J.; BEARD, J.J.; OTERO-COLINA, G.; BAUCHAN, G.R.; OCHOA, R.; BRLANSKY, R.H. Role bending: complex relationships between viruses, hosts, and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, p. 1013-1025, 2015a.

ROY, A.; LEON, M.G.; STONE, A.L.; SCHNEIDER, W.L.; HARTUNG, J.; BRLANSKY, R.H. First report of Citrus leprosis virus nuclear type in sweet orange in Colombia. **Plant disease**, Saint Paul, v. 98, n. 8, p. 28-98, 2014a.

ROY, A.; STONE, A.; OTERO-COLINA, G.; WEI, G.; CHOUDHARY, N.; ACHOR, D.; LEVY, L. Genome assembly of Citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with Orchid fleck virus. **Genome Announcements**, Washington, v. 1, n. 4, p. 4–5, 2013a.

ROY, A.; STONE, A.; OTERO-COLINA, G.; WEI, G.; CHOUDHARY, N.; ACHOR, D.; SHAO, J.; LEVY, L.; NAKHLA, K.M.; HOLLINGSWORTH, R.C.; HARTUNG, J.S.; SCHNEIDER, W.L.; BRLANSKY, R.H. Genome assembly of citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with *Orchid Fleck Virus*. **Genome Announcements**, v.1 n. 4, p. 1-2, 2014b. Disponível em: <<http://genomea.asm.org/content/1/4/e00519-13>>. Acesso em: 12 fev 2015.

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. Identification and molecular characterization of nuclear Citrus leprosis virus, a member of the proposed *Dichorhavirus* genus infecting multiple citrus species in Mexico. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, n. 4, p. 564-575, 2015b.

RUBIO, L.; AYLLÓN, M.A.; KONG, P.; FERNÁNDEZ, A.; POLEK, M.; GUERRI, J.; MORENO, P.; FALK, B.W. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. **Journal of virology**. Washington, v. 17, p. 8054–8062, 2001.

SALINAS-VARGAS, D.; SANTILLÁN-GALICIA, M.T.; VALDEZ-CARRASCO, J.; MORA-AGUILERA, G.; ATANACIO-SERRANO, Y.; ROMERO-PESCADOR, P. Species composition and abundance of *Brevipalpus* spp. on different citrus species in Mexican orchards. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 4, p. 419-425, 2013.

SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ, E.J.; SANTILLÁN-GALICIA, M.T.; NOVELLI, V.M.; NUNES, M.A.; MORA-AGUILERA, G.; VALDEZ-CARRASCO, J.M.; OTERO-COLINA, G.; FREITAS-ASTÚA, J. Diversity and genetic variation among *Brevipalpus* populations from Brazil and Mexico. **PLoS One**, San Francisco; v. 10, n. 7, p.338-361, 2015.

SANTOS FILHO, H.P. **Fatores químicos e biológicos do solo associados ao definhamento precoce do maracujazeiro**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1997. 3 p. (Pesquisa em Andamento, n. 47).

SILBERSCHMIDT, K. A transmissão experimental da mancha anular do cafeeiro. **O Biológico**, São Paulo, v. 7, p. 93-99, 1941.

SIMON-LORIERE, E.; HOLMES, E.C. Why do RNA viruses recombine? **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 8, p. 617–626, 2011.

SIN, S-H.; MCNULTY, B.C.; KENNEDY, G.G.; MOYER, J.W. Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, n. 14, p. 5168-5173, 2005.

SMILEY, R.L.; GERSON, U. Observations on the Tenuipalpidae (Prostigmata) and new subfamily classification. In: MITCHELL, R.; HORN, D.J.; NEEDHAM, G.R.; WELBOURN, W.C. (Ed.) **Proceedings acarology**. Columbus: Ohio Biological Survey, 1996. v. 1, p. 367-371.

SPEGAZZINI, C. Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de “agrios” en el Paraguay. **Anales de la Sociedad Científica Argentina**, Buenos Aires, v. 90, p. 155-188, 1920.

SUBBARAO, V.K.; SUNDIN, W.G.; KLOSTERMAN, J.S. Focus issue articles on emerging and re-emerging plant diseases. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 105, n. 7, p. 852-854, 2015.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S.; MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

THOMAS, M.A.; WESTON, B.; JOSEPH, M.; WU, W.; NEKRUTENKO, A.; TONELLATO, P.J. Evolutionary dynamics of oncogenes and tumor suppressor genes: higher intensities of purifying selection than other genes. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, p. 964–968, 2003.

VERGANI, A.R. La transmisión de la lepra explosiva de la ligustrina por ácaros. **Revista Argentina de Agronomía**, Buenos Aires, v. 9, p. 292–294, 1942.

VERGANI, A.R. **Transmisión y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo**. Buenos Aires: Ministerio de Agricultura de la Nación, Instituto Sanidad Vegetal. 1945. p. 1-11.

VIVES, M.C.; RUBIO, L.; GALIPIENSO, L.; NAVARRO, L.; MORENO, P.; GUERRI, J. Low genetic variation between isolates of *Citrus* leaf blotch virus from different host species and of different geographical origins. **Journal of General Virology**, London, v. 83, p. 2587-2591, 2002.

WEBER, P.H.; BUJARSKI, J.J. Multiple functions of capsid proteins in (+) stranded RNA viruses during plant-virus interactions. **Virus Research**, Amsterdam, v. 22, p. 140-149, 2015.

WEEKS, A. R.; VELTEN, R.; STOUTHAMER, R. Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London**, Londres, v.270, p.1857-1865, 2003.

WEEKS, A.R.; MAREC, F.; BREEUWER, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science**, Washington, v. 292, p. 2479-2483, 2001.

WIERZCHOSLAWSKI, R.; DZIANOTT, A.; BUJARSKI, J. Dissecting the requirement for subgenomic promoter sequences by RNA recombination of brome mosaic virus in vivo: evidence for functional separation of transcription and recombination. **Journal of Virology**, Washington, v. 78, n. 16, p. 8552-8564, 2004.

WIERZCHOSLAWSKI, R.; DZIANOTT, A.; KUNIMALAYAN, S.; BUJARSKI, J.J. A transcriptionally active subgenomic promoter supports homologous crossovers in a plus-strand RNA virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 12, p. 6769-6776, 2003.

WUNNER, W.H.; CALISHER, C.H.; DIETZGEN, R.G.; JACKSON, A.O.; KITAJIMA, E.W.; LAFON, M.; LEONG, J.C.; NICHOL, S.; PETERS, D.; SMITH, J.S.; WALKER, P.J. Rhabdoviruses. **Archives of Virology**, New York, v.140, supl. 10, p. 275-288, 1995.

ZULLO, J.; PINTO, H.S.; ASSAD, E.D.; DE AVILA, A.M.H. Potential for growing Arabica coffee in the extreme south of Brazil in a warmer world. **Climatic Change** Dordrecht, v. 109, p. 535–548, 2011.