

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

LEPROSE DO CITROS: INTERAÇÕES PLANTA x
VÍRUS x VETOR

FERNANDA NICOLINI-TEIXEIRA
Bióloga

Orientadora: Dra. Jurema Schons
Co-orientadora: Dra. Juliana Freitas-Astúa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de concentração em Fitopatologia.

Passo Fundo, maio de 2008.

Tudo tem o seu tempo determinado e há tempo para todo propósito debaixo do céu; há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de colher; tempo de derribar e tempo de edificar; tempo de chorar e tempo de rir; tempo de prantear e tempo de saltar de alegria; tempo de espalhar pedras e tempo de juntar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se; tempo de perder e tempo de ganhar; tempo de rasgar e tempo de coser; tempo de estar calado e tempo de falar; tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz.

Eclesiastes, 3.1-8

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo.

À Universidade de Passo Fundo pela realização do curso de pós-graduação.

À professora orientadora Dr^a Jurema Schons pela amizade, atenção, carinho, ensinamentos ao longo desta caminhada e principalmente pela oportunidade de ter alcançado meus objetivos.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”/IAC pela oportunidade de realização deste trabalho, principalmente ao Dr Marcos Machado que abriu as portas do Centro de Citricultura, somando para meu aprendizado acadêmico, muito obrigada.

À co-orientadora Dr^a Juliana Freitas-Astúa, pela oportunidade de fazer parte do grupo ‘leprose’, pela amizade, carinho, compreensão infinita, diálogo nestes dois anos de convivência.

À Dr^a Marinês Bastianel, pela amizade conquistada que sei que será pra toda vida, pelos ensinamentos, conversas e apoio incondicional.

A todos os amigos conquistados no Centro APTA Citros; citar o nome de cada um seria impossível, mas com certeza todos terão um lugar especial em meu coração para sempre.

Aos colegas da pós-graduação do Centro APTA Citros; Carol, Mariana, Raquel Caserta, Rafael, Thiago, Karen, Rodrigo, Samanta, Renata, Ju Batista, e amigas especiais como Andrea Gobbi, Andréia Kasumi e Renatinha pela convivência e amizade neste período que estive por aqui.

Ao Adriano Malosso pela ajuda nas reações do PCR em tempo real.

A todos os pesquisadores do Centro APTA Citros, Dr^a Ana Carla O. Silva-Pinhati, Dr^a Alessandra Alves de Souza, Dr Helvécio Dela-Colleta, Dr^a Valdenice Novelli, D Marco Aurélio Takita, Dr^a Eliane Locali-Fabris, Dr Berghem Ribeiro, Dr^a Maria Luisa P. N. Targon, Dr^a Mariângela Cristofani-Yaly, Dr Rodrigo Latado, Dr Sérgio Alves de Carvalho e ao Dr Eduardo Fermino Carlos pelas discussões para entender o PCR em tempo real.

A todos do grupo 'leprose', Val, Berghem, Li, Karen, Rê, Naiara, QQ, Juzinha, Dérick, Chris, muito obrigada pela convivência e amizade, vocês foram e serão muito importantes para mim.

Aos estagiários do laboratório de acarologia do Centro APTA Citros pelas tantas coletas de ácaros e instalação dos experimentos.

Aos meus pais, irmãos e principalmente ao Rogério por me apoiarem todos os dias em que estive a mais de 1.000 km de distância, agradecer é pouco, não tenho palavras para dizer o quanto eu amo vocês.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 A citricultura no Brasil.....	4
2.2 Interações planta-vírus-vetor.....	6
2.3 Leprose dos citros.....	11
2.3.1 Importância econômica	11
2.3.2 Histórico e ocorrência.....	13
2.3.3 Etiologia.....	14
2.3.4 Sintomas.....	17
2.3.5 Controle.....	19
2.4 Ácaro vetor <i>Brevipalpus phoenicis</i>	20
2.4.1 Descrição.....	20
2.4.2 Distribuição e ocorrência.....	21
2.4.3 Ciclo de vida.....	22
2.4.4 Importância econômica.....	24
2.4.5 Interação CiLV-C – <i>Brevipalpus</i>	25
2.4.6 Interação CiLV-C – hospedeiro vegetal (<i>Citrus</i> spp.).....	27
2.5 Outros vírus de importância transmitidos por <i>Brevipalpus</i> spp.....	29
2.6 Técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	31
2.6.1 Introdução.....	31
2.6.2 Quantificação absoluta e quantificação relativa.....	37
2.6.3 Quantificação de patógenos.....	37
 CAPÍTULO I	
INTERAÇÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DO CITROS E SEU HOSPEDEIRO VEGETAL	40
Resumo	40
Abstract	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	47

2.1 Material vegetal.....	47
2.2 Inoculação do vírus nas plantas hospedeiras.....	48
2.3 Extração e quantificação de RNA total.....	50
2.4 Síntese do cDNA.....	51
2.5 Desenho e síntese de primers e sondas.....	51
2.6 Construção da curva-padrão e quantificação do vírus.....	53
3. RESULTADOS.....	55
4. DISCUSSÃO.....	68

CAPÍTULO II

INTERAÇÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DO CITROS E DO ÁCARO VETOR.....	71
Resumo.....	71
Abstract.....	73
1. INTRODUÇÃO.....	74
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1 População de ácaros.....	81
2.2 Aquisição do CiLV-C pelo ácaro vetor.....	81
2.3 Aquisição do ClCSV pelo ácaro vetor.....	83
2.4 Comparação da quantidade de CiLV-C e VTBs nucleares no ácaro vetor e nas plantas hospedeiras.....	84
2.5 Extração de RNA total de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	85
2.6 Extração de RNA total de plantas.....	86
2.7 Síntese de cDNA.....	87
2.8 Desenho, síntese e validação dos primers e sondas.....	87
2.9 Quantificação do vírus/construção da curva-padrão.....	89
2.10 RT-qPCR.....	91
3. RESULTADOS.....	93
3.1 Quantificação do CiLV no ácaro vetor.....	94
3.2 Quantificação do ClCSV no ácaro vetor.....	100
3.3 Comparação da quantificação de CiLV e VTBs nucleares...	101
4. DISCUSSÃO.....	104
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA	Página
1. Seqüência de primers e sondas utilizados nas análises de Rt-qPCR.....	52
2. Vetor (plasmídeo) utilizado, tamanho do inserto e concentração inicial das soluções-estoque.....	54
3. Quantificação absoluta e relativa obtidas através da técnica Rt-qPCR com o gene <i>Hel</i> para os três genótipos em estudo.....	58
4. Quantificação absoluta e relativa obtidas através da técnica Rt-qPCR com o gene <i>p29</i> para os três genótipos em estudo.	59

CAPÍTULO II

TABELA	Página
1. Seqüência de primers e sondas utilizados nas análises de RT-qPCR.....	89
2. Vetor (plasmídeo) utilizado, tamanho do inserto e concentração inicial das soluções estoque.....	91
3. Seqüência dos primers utilizados como controle endógeno para a quantificação relativa com o sistema SYBR Green.....	93
4. Principais características associadas aos quatro tipos de interação vírus-vetor.....	108

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA	Página
1. Folhas de laranja Pêra com sintomas de leprose utilizadas como fonte de inóculo para os ácaros (A) e região da folha com cola entomológica e mistura de farinha, gesso, areia fina e água, utilizada para o experimento (B).....	49
2. Lesões jovens (A), intermediárias (B) e necróticas (velhas) (C) de leprose do citros em folhas de laranja Pêra causadas por CiLV.....	50
3. RNA 1 e RNA 2 do vírus da leprose dos citros.....	52
4. Número de partículas virais para o gene <i>Hel</i> nos diferentes tempos de coleta, para os genótipos laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada.....	63
5. Número de partículas virais para o gene <i>p29</i> nos diferentes tempos de coleta, para os genótipos laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada.....	64
6. Quantificação relativa para o gene <i>p29</i> nos diferentes tempos de coleta, para os genótipos laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada.....	65
7. Quantificação relativa para o gene <i>Hel</i> nos diferentes tempos de coleta, para os genótipos laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada.....	66
8. Amplicons gerados na comparação do título viral em lesões jovens, intermediárias e velhas de leprose dos citros, usando o gene <i>p29</i> (controle positivo).....	67

CAPÍTULO II

FIGURA	Página
1. Folha de laranja Pêra com sintomas de leprose utilizada como fonte de inóculo inicial (A), fruto de laranja Pêra utilizado no tratamento “inóculo constante”(B), fruto de limão Cravo (C), meio inerte (D) e folhas de clerodendrum (E).....	83
2. Folhas de coração-sangrento (<i>Clerodendrum x speciosum</i>) com sintomas de manchas cloróticas e necróticas do ClCSV.....	84
3. Folhas de café com sintomas de CoRSV.....	85
4. Quantidade inicial de vírus e a eficiência da reação (CT x Log de moléculas), equação da curva-padrão e coeficiente de regressão para todos os genes estudados.....	94
5. (A) Amplicons gerados pela análise da expressão do gene <i>Hel</i> , curva padrão. (B) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene <i>Hel</i> em ácaros submetidos à aquisição constante do vírus da leprose dos citros em folhas de laranja com sintomas.....	96
5. (C) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene <i>Hel</i> no tratamento em meio inerte após os ácaros serem submetidos a um período de 2 dias de aquisição do CiLV-C e (D) em fruto de limão Cravo. DAI=dias após inoculação.....	97
6. (A) Amplicons gerados pela análise da expressão do gene <i>p29</i> , curva padrão. (B) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene <i>p29</i> em ácaros submetidos à aquisição constante do vírus da leprose dos citros em folhas de laranja com sintomas.....	98
6. (C) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene <i>p29</i> em tratamento de meio inerte após ácaros serem submetidos a um período de 2 dias de aquisição do CiLV-C e (D) em fruto de limão Cravo. DAI=dias após inoculação.....	99

6. (E) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene <i>p29</i> em folhas de clerodendrum após ácaros serem submetidos a um período de 2 dias de aquisição do CiLV-C. DAI =dias após inoculação.....	100
7. (A) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão dos genes <i>p29</i> de CiLV-C em plantas de laranja Pêra com sintomas de leprose e ácaros virulíferos; (B) gene <i>Pol</i> do CICSV em plantas de clerodendrum com mancha clorótica e ácaros virulíferos; (C) gene <i>Rep</i> de CoRSV em plantas de café com sintomas de mancha anular e ácaros virulíferos. Os controles negativos foram plantas de citros, clerodendrum e café sadia.....	103
8. Proporção (%) entre o título viral no ácaro e nas plantas de clerodendrum, café e citros.....	104

1 INTRODUÇÃO

A leprose, causada pelo vírus da leprose do citros (*Citrus leprosis virus - CiLV*) é uma das principais viroses da citricultura brasileira nos dias de hoje. A mesma é transmitida pelo *Brevipalpus phoenicis*, ácaro cosmopolita e polífago que está presente em todas as regiões citrícolas do mundo. Este patossistema é complexo, pois envolve o agente causal, neste caso o CiLV, o ácaro vetor, a planta de citros e possivelmente um endosimbionte. A leprose é caracterizada pelo aparecimento de lesões locais nas folhas, frutos e ramos, no entanto, as partículas virais são encontradas em baixo título no hospedeiro vegetal. São conhecidas duas formas do CiLV, denominadas em função do local de acúmulo das partículas nas células vegetais: o tipo citoplasmático (CiLV-C), comum em mais de 99% dos casos e, por isso, normalmente referido apenas como CiLV, e o tipo nuclear (CiLV-N), de rara ocorrência. Apesar de avanços recentes em estudos genéticos que visam conhecer a resposta do hospedeiro vegetal ao vírus, o entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na resistência/suscetibilidade, assim como as relações ácaro - vírus - citros, ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que o vírus se replica no hospedeiro vegetal suscetível, e que circula no vetor. Estudos biológicos e de microscopia eletrônica, entretanto, não são determinantes para determinar se há a replicação do patógeno no ácaro. O seqüenciamento completo do genoma do CiLV, abriu portas para o uso de ferramentas moleculares possibilitando ampliar o conhecimento acerca do patossistema leprose. Com isso, o objetivo principal deste estudo foi quantificar, através de PCR quantitativo, o agente causal da leprose, tanto em plantas de

citros, como no ácaro vetor, e buscar o entendimento da replicação do vírus dentro dos seus hospedeiros naturais para melhor entender o patossistema CiLV – ácaro vetor – planta de citros.

2 REVISAO DE LITERATURA

2.1 A citricultura no Brasil

Os citros compreendem plantas do gênero *Citrus* e outros gêneros afins como *Fortunella* e *Poncirus* ou híbridos da família Rutaceae, representado por laranjas (*C. sinensis*), tangerinas (*C. reticulata* e *C. deliciosa*), limões (*C. limon*), limas ácidas como o Tahiti (*C. latifolia*) e o Galego (*C. aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*C. limettioides*), pomelo (*C. paradisi*), cidra (*C. medica*), laranja-azedada (*C. aurantium*) e toranjas (*C. grandis*) (MATTOS JÚNIOR et al., 2005).

O Brasil é o maior produtor de citros, sendo que a exportação de sucos de laranja na safra de 2006/07 superou U\$ 2,0 bilhões (SECEX/MEDIC, 2007). No entanto, a produtividade da citricultura brasileira ainda é relativamente baixa, basicamente por causa da ocorrência de pragas e doenças, cujos controles representam elevada parcela dos custos de produção. Dentre elas a leprose, que tem grande importância devido principalmente aos gastos no controle químico do vetor, que no estado de São Paulo são de mais de U\$ 80 milhões/ano (NEVES et al., 2004).

A citricultura brasileira está concentrada no estado de São Paulo (cerca de 85% da produção), onde a laranja doce (laranja Pêra) é altamente suscetível à leprose e se constitui na principal espécie

plantada (mais de 80%), sendo que no estado ainda há produção de lima ácida Tahiti e tangerinas, como a Ponkan e o tangor Murcott (MATTOS JÚNIOR et al., 2005).

Outros estados como Bahia, Sergipe, Minas Gerais, Pará, Paraná e Rio Grande do Sul também contribuem para o agronegócio citrícola, com produção principalmente, de laranjas, tangerinas e Tahiti. As laranjas representam a principal espécie cítrica cultivada no país e isso se deve ao grande mercado mundial para exportação de suco. A produção de citros *in natura* para o mercado interno e externo levado à crescente necessidade da melhoria da qualidade dos frutos. No caso do mercado interno, além do consumo da fruta, destaca-se a demanda de laranjas, tangerinas e limões para o preparo de suco fresco e também para o uso culinário para Tahiti e Galego (MATTOS JÚNIOR et al., 2005).

As tangerinas e limões são plantados basicamente para o mercado interno de frutas frescas, embora uma pequena parcela seja exportada para nichos de mercado específicos, como por exemplo, a lima ácida Tahiti produzida organicamente e exportada para países da Europa, sendo que as exportações brasileiras de Tahiti *in natura* aumentaram significativamente nas últimas décadas (LUCHETTI et al., 2003).

Apesar de a cadeia citrícola estar concentrada na região sudeste com destaque para o estado de São Paulo e triângulo mineiro, em todo o Brasil são cultivados citros, de Norte a Sul, uma vez que em todas as regiões são encontradas condições edafo-climáticas favoráveis para seu cultivo (PASSOS et al., 2005). Como segundo e terceiro produtores nacionais, destacam-se os estados da Bahia e

Sergipe, com 4,7 e 3,1% da produção nacional, respectivamente (PASSOS et al., 2005). Nos estados da Bahia e Sergipe, os relatos de leprose são recentes e existe uma preocupação crescente com a doença, porque a densidade populacional do vetor é elevada na região (BASTIANEL et al., 2008, *submetido*) e a laranja Pêra, altamente suscetível, é extensivamente usada, constituindo-se, a exemplo de SP, na principal variedade plantada (70%) (PASSOS et al., 2005).

2.2 Interações planta-vírus-vetor

Durante a evolução, plantas e vírus desenvolveram mecanismos complementares de ataque e defesa. O fenótipo de resistência ou de suscetibilidade das plantas à infecção por vírus irá depender do balanço entre estes mecanismos (ZERBINI et al., 2005).

Os vírus de plantas interferem nos processos normais da célula, provocando mudanças histológicas e citológicas, ruptura do balanço energético, alteração na síntese de proteínas, ácidos nucleicos e clorofila, além de alteração nas taxas respiratórias (MATTHEWS, 1991; FLINT et al., 2000). A entrada do vírus nas células vegetais é sempre um processo passivo, pois o vírus é introduzido via vetor biológico no caso de insetos, fungos, nematóides, ácaros etc, ou via ferimentos (MATTHEWS, 1991).

Os patossistemas virais apresentam maior complexidade quando comparados àqueles causados por outros agentes etiológicos, pois de certa forma há uma maior dificuldade em identificar precisamente os sintomas de viroses, uma vez que existem múltiplas doenças, pragas e deficiências nutricionais que causam sintomas semelhantes àqueles de vírus. Esta complexidade aumenta ainda

porque é resultante da interação existente entre o vírus, a planta hospedeira e o vetor (NUTTER, 1997; ZHANG et al., 2000).

Os vírus de plantas, tanto os de RNA como os de DNA, agem, basicamente, utilizando os mecanismos da planta para replicação do seu próprio ácido nucléico, interferindo desta maneira nas vias biossintéticas da célula vegetal, seja na transcrição do material genético ou na tradução do RNA mensageiro em proteínas, podendo levar à deficiência ou excesso de substâncias endógenas da planta, inclusive de hormônios, provocando desvios de desenvolvimento e de crescimento (MATTHEWS, 1991).

A entrada do vírus nos tecidos vegetais só é possível através de ferimentos por vetores como insetos, ácaros, fungos ou nematóides, danos mecânicos, ou pelo manuseio de plantas, pois estes patógenos não possuem enzimas e estruturas capazes de romper as barreiras naturais da planta, inclusive a epiderme (MEDEIROS et al., 2003).

Assim sendo, a maioria dos vírus de plantas são dependentes para sua sobrevivência da eficiente transmissão planta-a-planta por vetores específicos. Esta propagação assegura a sobrevivência do vírus, resultando muitas vezes em ocorrência de doença. Os primeiros estudos sobre transmissão de vírus de plantas por vetores demonstraram tanto a complexidade como a especificidade da interação vírus-vetor (NG & FALK, 2006).

WATSON & ROBERTS (1939), tentaram explicar que o mecanismo de interação vírus-vetor estaria envolvido na transmissão, levantando a hipótese de existir substâncias ou receptores específicos no vetor que poderiam afetar a estabilidade, retenção e a transmissão dos diferentes vírus de plantas pelos seus vetores. Os vírus são

absolutamente dependentes de vetores para sua propagação e os insetos são os mais comuns entre todos os vetores, sendo estes mecanismos altamente específicos (NG & FALK, 2006).

Como os vírus se movem célula-a-célula dentro da planta via plasmodesmos e codificam uma ou mais proteínas não estruturais, requerem para este movimento dentro de seus hospedeiros proteínas como a proteína capsidial (CP) (BOEVINK & OPARKA, 2005). O movimento célula-a-célula é geralmente um evento precoce no processo infeccioso, ocorrendo, por exemplo, em torno de cinco horas para o vírus do mosaico do fumo (*Tobacco mosaic virus* – TMV) em *Nicotiana tabacum* (FANNIN & SHAW, 1987; DERRICK et al., 1992).

Os vírus utilizam dois processos para a invasão na planta, um é o movimento de célula-a-célula pelos plasmodesmos e o outro é o transporte à longa distância, pelos tecidos vasculares do floema. O movimento célula-a-célula envolve proteínas de movimento (MP) codificadas pelos vírus e também de componentes codificados pelo hospedeiro (ATABEKOV & TALIANSKY, 1990).

Estudos citopáticos com vários luteovírus, como o *Potato leafroll virus* (PLRV), mostraram partículas virais em elementos do tubo crivado maduro, células companheiras e parênquima celular do floema, mas não em outros tipos celulares (ESAU & HOEFERT, 1972). A limitação ao floema sugere que a restrição dos luteovírus aos tecidos floemáticos é devido a uma falha no movimento do vírus e não à sua inabilidade de replicação (SMITH & BARKER, 1999).

Como os pulgões são os vetores mais abundantes de vírus e também os mais bem estudados, os mesmos servem de modelo para

estudo de interação vírus-vetor. A transmissão de vírus por pulgões pode ocorrer de diversas maneiras e isso acontece também com os outros vetores de vírus e, segundo INOUE-NAGATA & NAGATA (2002) podem ser:

1) Não-persistente: o vírus é retido na parte distal da ponta dos estiletes e é liberado com a secreção salivar durante a alimentação. A aquisição do vírus é rápida, em um período de poucos segundos a minutos, o tempo de retenção também é curto (minutos). As picadas de prova, que consistem em uma rápida inserção e retirada do estilete no tecido vegetal com o objetivo de verificar se o hospedeiro é adequado à sua alimentação é a mais eficiente para a aquisição e transmissão do vírus, visto que o vírus fica retido no estilete do inseto. O vetor perde o vírus que está preso ao estilete quando acontece a ecdise, não havendo período de latência. Assim, no mesmo instante que o vírus é adquirido pode ser transmitido para outra planta, não havendo circulação no corpo do inseto. A maioria dos vírus transmitidos por afídeos pertence a esta categoria, por exemplo: *Potato virus Y* (vírus Y da batata), *Cucumber mosaic virus* (vírus do mosaico do pepino), *Bean common mosaic virus* (vírus do mosaico comum do feijoeiro), *Lettuce mosaic virus* (vírus do mosaico da alface), *Papaya ringspot virus* (vírus do mosaico do mamoeiro).

2) Semi-persistente: a aquisição do vírus é mais lenta, necessitando de minutos a horas de alimentação. O vírus é retido por várias horas após a aquisição, e não requer período de latência. Não há passagem pela muda do inseto e o vírus não está presente na hemolinfa, também não se replica no vetor e não há passagem transovarial. O *Cauliflower mosaic virus* (vírus da faixa das nervuras

da couve-flor) e o *Citrus tristeza virus* (vírus da tristeza dos citros) são exemplos de vírus transmitidos desta maneira.

3) Persistente circulativo não-propagativo: o vírus é ingerido, passa pelo intestino, mas não infecta as células do intestino, é transportado para o ventrículo mediano e posterior e liberado na hemocele. Os vírus, então, associam-se às glândulas salivares e são liberados no canal salivar. O tempo necessário para aquisição é longo, de horas a dias, e o vetor retém o vírus por dias a semanas. O vírus é transmitido após a muda, pois está presente na hemolinfa. Desde a aquisição até a transmissão, o vírus precisa circular no corpo do inseto vetor com um período de latência, não há replicação no vetor. O *Potato leafroll virus* (vírus do enrolamento da folha da batata) e o *Tomato yellow top virus* (vírus do topo amarelo do tomateiro) são transmitidos de maneira circulativa não-propagativa.

4) Persistente propagativo: os vírus são ingeridos, infectam as células intestinais e subsequentemente outras células, associam-se às glândulas salivares principais e possivelmente às acessórias antes de serem liberados pelo canal salivar. O tempo para aquisição é relativamente longo, necessitando também de um período de latência para a sua transmissão. O vírus passa pela muda do inseto, pois está presente na hemolinfa. Neste tipo de interação, o vírus replica-se no vetor e frequentemente ocorre a transmissão transovarial. O *Passion fruit vein clearing virus* (vírus do enfezamento do maracujazeiro) e o *Lettuce necrotic yellows virus* (vírus da necrose amarela da alface) são vírus deste tipo de transmissão.

SANTOS et al. (2003) estudaram a interação do begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) com o seu vetor, a mosca

branca *Bemisia tabaci* biótipo B e determinaram os períodos de aquisição do vírus, de inoculação, de latência e retenção e transmissão à progênie. Para este experimento os autores utilizaram plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cultivar Santa Clara e cinco insetos por planta. Os mesmos verificaram um período de aquisição de 15 minutos, onde 6% dos tomateiros foram infectados e 65%, quando o período de aquisição foi estendido para 24 horas. O período de inoculação mínimo foi de 30 minutos registrando-se de 18% a 67% de infecção com 24 horas de inoculação. O período de latência foi de 16 horas após o vetor adquirir o vírus. Na detecção do vírus no vetor via PCR, os testes constataram o ToRMV em ninfas desenvolvidas em tomateiro infectado, em adultos com diferentes períodos de aquisição, mas não em ovos de fêmeas avirulíferas ovipositados em planta infectada.

Muitos patossistemas já foram estudados e amplamente entendidos, mas há outros, que precisam ser compreendidos quanto à interação planta-vírus-vetor em outros patossistemas como no caso do citros - CiLV-C - *Brevipalpus phoenicis* que é o objeto do presente estudo.

2.3 Leprose dos citros

2.3.1 Importância econômica

Embora a leprose do citros seja considerada hoje a virose de maior importância econômica da citricultura nacional, não se pode deixar de mencionar a tristeza dos citros, que é a virose de maior importância histórica na cultura do citros (FREITAS-ASTÚA et al., 2007b).

O uso predominante de variedades altamente suscetíveis, como as laranjas doces, que totalizam mais de 80% dos plantios, tem agravado a importância desta doença. Apesar de ter maior importância no Brasil, nos últimos anos a doença se tornou ainda mais importante para a citricultura mundial, haja vista o aumento no número de relatos em outros países produtores, principalmente da América do Sul e Central (BASTIANEL et al., 2006a).

Um dos fatores que contribuem para a importância da leprose dos citros é o fato de o agente causal, o vírus da leprose dos citros (Citrus leprosis virus - CiLV), ser transmitido por um ácaro polífago e cosmopolita, presente em todas as regiões citrícolas do mundo (CHILDERS et al., 2003a). No Brasil, o controle da leprose nos pomares envolve basicamente o controle químico do vetor, muitas vezes na ausência de focos da doença, o que representa uma parcela significativa de custos, dentre aqueles destinados aos tratamentos fitossanitários (RODRIGUES & MACHADO, 2000; BASTIANEL et al., 2006a).

O uso de acaricidas em larga escala para o controle do vetor, além de representar um alto custo para o produtor, pode induzir o aparecimento de populações resistentes de ácaros, o que gera uma grande preocupação econômica e ecológica. É por isso que cada vez mais, faz-se necessário buscar meios alternativos para controlar a leprose do citros, como uso de agentes de controle biológico e variedades de citros resistentes à doença (BASTIANEL et al., 2006a). No estado de São Paulo estima-se que os gastos podem chegar a US\$ 60 a 100 milhões por ano com acaricidas (NEVES et al., 2004).

2.3.2 Histórico e ocorrência

A doença foi relatada pela primeira vez no século XIX nos EUA por Fawcett (CHILDERS et al., 2003), sendo que há décadas não é mais encontrada naquele país. Na América do Sul, mais precisamente no Paraguai, a doença foi identificada em 1920 por Spegazzini e chamada de lepra explosiva, sendo logo depois observada também na Argentina. No Brasil, a leprose foi relatada na década de 30 no município de Sorocaba - São Paulo (BITANCOURT 1934; 1955), em folhas de laranja doce Bahia (*Citrus sinensis* L. Osbeck).

A leprose vem sendo encontrada praticamente em todas as regiões produtoras de citros do país (BRIOSO et al., 1998; RODRIGUES, 2000a; LOCALI et al., 2004). Embora tenha maior ocorrência no Estado de São Paulo, a leprose também vem sendo observada em outras regiões do Brasil, como Rio de Janeiro (BRIOSO et al., 1998), Tocantins (DOMINGUES & RODRIGUES, 1999), Rio Grande do Sul (FREITAS-ASTÚA et al., 2004b), Acre (FREITAS-ASTÚA et al., 2004a), Pará (BOARI et al., 2007a) e Sergipe (BOARI et al., 2007b), entre outras.

Além do Brasil, a leprose também é observada em países da América do Sul e Central (RODRIGUES et al., 2003), como Panamá (DOMINGUES et al., 2001), Guatemala (MEJIA et al., 2002), Costa Rica (ARAYA GONZÁLES, 2000) e Bolívia (GÓMEZ et al., 2005). O estabelecimento da leprose dos citros na América Central representa uma ameaça potencial para a citricultura norte-americana e de outras regiões do mundo (CHILDERS et al., 2003d).

2.3.3 Etiologia

A leprose é uma doença causada pelo Citrus leprosis virus – CiLV, sendo principalmente observada em laranja doce, causando lesões em folhas, ramos e frutos, reduzindo a produtividade e o valor comercial da fruta. Porém, pode ocorrer em diferentes níveis e em praticamente todas as espécies e variedades de citros (BITANCOURT, 1955; ROESSING & SALIBE, 1967; PRATES, 1984; TRINDADE & CHIAVEGATO, 1990), como tangerinas (*C. reticulata* Blanco) e mexericas (*C. deliciosa* Tenore) (MULLER et al., 2005; BASTIANEL et al, 2007). De maneira geral, limões, limas doces e alguns híbridos de tangerinas são considerados mais resistentes à leprose, enquanto laranjas doces e alguns híbridos de tangerinas têm se mostrado suscetíveis. A diferença de reação sintomatológica pode ser resultado não apenas do material genético, mas também da influência do local, da fase de desenvolvimento e do órgão afetado (MULLER et al., 2005).

Estudos iniciais sobre o CiLV apresentaram a hipótese de uma etiologia fúngica, sendo apontados os fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Hormodendron* sp. e *Cladosporium herbarium* var. *citri* como os possíveis causadores da doença. Com a demonstração do envolvimento de ácaros *Brevipalpus* com a leprose, VERGANI (1945) sugeriu que estas lesões seriam resultantes de toxinas injetadas na planta durante a alimentação do ácaro. Esta hipótese foi contestada e a etiologia viral da doença foi provada por microscopia eletrônica (KITAJIMA et al., 1972; COLARICCIO et al., 1995), transmissão mecânica (COLARICCIO et al., 1995) e enxertia de tecidos (KNORR, 1968; CHAGAS & ROSSETI, 1980).

A primeira caracterização do vírus da leprose dos citros foi em amostras de folhas de laranja infectadas, onde foi possível observar através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) a presença de partículas associadas ao núcleo das células. Posteriormente foi constatado que a maioria dos isolados brasileiros de CiLV estão presentes no citoplasma das células (KITAJIMA et al., 1972; COLARICCIO et al., 1995; LOCALI et al., 2003).

A morfologia das partículas virais e o local de ocorrência na célula levaram à classificação deste vírus como um membro tentativo da família *Rhabdoviridae* (KITAJIMA et al., 1972; KITAJIMA et al., 1974). Entretanto, há poucas características convergentes entre o CiLV e outros membros desta família, embora sejam morfologicamente semelhantes, embora o CiLV apresente partículas mais curtas, muitas vezes não-envelopadas e podem ser encontrados no núcleo ou no citoplasma de células infectadas (KITAJIMA et al., 1974; COLARICCIO et al., 1995).

Duas formas de vírus são associados à leprose dos citros, denominados em função da sua localização na célula vegetal, podendo ser do tipo citoplasmático (CiLV-C) e do tipo nuclear (CiLV-N) (RODRIGUES et al., 2003). A forma citoplasmática ocorre em mais de 99% dos relatos da doença, enquanto o CiLV-N tem sido observado em locais restritos, como por exemplo, uma localidade do Panamá e nos municípios de Marquês de Souza no Estado do Rio Grande do Sul, Monte Alegre, Amparo e São Roque no Estado de São Paulo, e recentemente em Andradas no Estado de Minas Gerais (RODRIGUES et al., 2003; KITAJIMA et al., 2004; FREITAS-ASTÚA et al., 2004; CHAGAS et al., 2006). Apesar de serem

transmitidas pelo mesmo vetor e causar sintomas idênticos, o recente desenvolvimento de testes de diagnóstico molecular através de amplificação de primers específicos indicou que as duas formas do vírus são distintas (FREITAS-ASTÚA et al., 2005).

O seqüenciamento completo do genoma do CiLV-C indicou alguma similaridade desse vírus com membros dos gêneros *Tobamovirus*, *Tobravirus*, *Bromovirus* e não com rhabdovírus (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006), e portanto, foi recentemente proposto que o CiLV-C deve ser o membro tipo de um novo gênero de vírus, denominado Cilevirus (LOCALI-FABRIS et al. 2006).

O genoma do CiLV-C é bipartido, constituído de duas moléculas de RNA fita simples (ssRNA) de sentido positivo, uma delas com aproximadamente 9Kb, compreendendo duas ORFs e a outra, 5Kb com 4 ORFs (LOCALI-FABRIS et al., 2006). O CiLV é um vírus pouco comum, pois induz a formação de lesões locais e não sistêmicas nas plantas hospedeiras, como ocorre com a maioria das viroses de plantas (MARQUES et al., 2007). Como o título viral é muito baixo na planta e associado à instabilidade de suas partículas, dificulta a sua purificação, caracterização e detecção (ROSSETTI, 1980; MULLER et al., 2005).

RODRIGUES et al. (1997) encontraram partículas virais no corpo de ácaros virulíferos sugerindo que a relação entre CiLV e o ácaro vetor é do tipo circulativa propagativa, ou seja, o vírus não somente circularia no interior do corpo do vetor, mas também se replica no mesmo. Entretanto, estudos de microscopia eletrônica indicam que o CiLV-C não se replica no ácaro, apenas circula no

interior do mesmo (KITAJIMA et al., 2006). O contrário parece acontecer com o CiLV-N, vírus da mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus) e mancha clorótica do Clerodendrum, todos tipo nuclear, que através de microscopia eletrônica apresentaram viroplasmas tanto no núcleo quanto no citoplasma de células das glândulas prosomais de ácaros procedentes de plantas infectadas, sendo uma relação vírus-vetor do tipo circulativa e propagativa (KITAJIMA et al., 2007).

2.3.4 Sintomas

A leprose dos citros causa sintomas em folhas, ramos e frutos, tornando estes últimos impróprios para a exportação, podendo prejudicar a planta e ao mesmo tempo a sua produção. Os sintomas podem variar de acordo com a espécie ou variedade do hospedeiro, a região onde ocorre a doença e a fase de desenvolvimento do órgão afetado no momento da infecção (BASTIANEL et al., 2006a).

Os sintomas foliares de leprose são caracterizados por manchas cloróticas, variando do amarelo-claro ao marrom, com formato geralmente circular, não delimitado pelas nervuras das folhas, apresentando algumas vezes um ponto central e círculos concêntricos. As lesões maiores encontram-se geralmente em folhas mais velhas localizadas na parte interna da copa, no período de maio a agosto para as condições do Estado de São Paulo. Algumas folhas com sintomas podem cair, mas as que permanecem servem tempo suficiente de fonte de inóculo para os ácaros transmitirem a doença para novas folhas (MÜLLER et al., 2005).

Os sintomas da doença são manifestados como lesões locais cloróticas ou necróticas, lisas ou salientes. Podem aparecer de 15 dias a meses após a inoculação do vírus pelo ácaro nas folhas, frutos e ramos (BASSANEZI et al., 2002). O número de lesões e a época de aparecimento dos sintomas podem causar intensa desfolha na planta e queda prematura dos frutos. As lesões nos ramos podem levar ao escamamento e a seca da casca, tornando-os improdutivos. Infestações altas de ácaros virulíferos podem 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., 2006a).

Nos frutos verdes as lesões são inicialmente amareladas e deprimidas, o que reduz muito o valor comercial dos mesmos. Nos ramos há formação de protuberâncias de coloração cinza ou marrom e textura de cortiça (RODRIGUES et al., 2003).

Nos ramos novos os sintomas começam com pequenas manchas amareladas ou cloróticas rasas que vão se tornando salientes, de cor marrom a avermelhada. As lesões mais velhas se transformam em lesões salientes (corticosas), ocasionando o descamamento e dependendo do número, o secamento do ramo (BITANCOURT, 1955; ROSSETI, 1995). Estas lesões corticosas podem muitas vezes ser confundidas com sintomas de cancro cítrico (ROSSETI, 1995).

Em trabalho recente de MARQUES et al. (2007), os autores estudaram a anatomia de tecidos (ramos e folhas) de laranja Pêra com sintomas de CiLV-C e observaram que nos dois tipos de lesões necróticas que formam pústulas e necróticas deprimidas, o parênquima floemático forma várias camadas de células estratificadas, o que acabou promovendo a falência das células condutoras do

floema. Sabe-se que para haver movimento do vírus a longas distâncias, o mesmo precisa entrar nos vasos condutores do floema para que haja translocação passiva juntamente com os fotoassimilados da planta (ROBERTS et al., 1997). Desta maneira, as alterações encontradas no floema de plantas sintomáticas pode estar evitando ou limitando o deslocamento do CiLV-C para regiões ainda não infectadas da planta. Isto poderia explicar o motivo pelo qual o vírus não se torna sistêmico, mesmo tendo sido encontradas esporadicamente partículas virais no parênquima floemático (BASTIANEL et al., 2006a).

2.3.5 Controle

A presença de *B. phoenicis* em todos os períodos do ano e a existência de fontes de inóculo nos pomares em todas as regiões citrícolas do Estado de São Paulo exige que a população do vetor seja mantida em baixas densidades no pomar, sendo, portanto, o controle químico do vetor a principal forma de controle da leprose (BASTIANEL et al., 2006a). Um dos problemas dessa forma de controle é que o uso contínuo de um mesmo princípio ativo induz seleção natural nos vetores resistentes (ALVES et al., 2004). Portanto é recomendado o uso alternado de acaricidas e também o uso de acaricidas seletivos que favoreçam a manutenção de ácaros predadores (GRAVENA, 2005).

Outra forma de controle são as práticas culturais são recomendadas para diminuir as fontes de inóculo, e os riscos da doença, tais como, poda de material vegetal afetado, utilização de quebra ventos nos pomares para reduzir a entrada do ácaro,

preferencialmente com plantas que não servem de hospedeiras para o mesmo; controle de plantas daninhas que também servem de hospedeiras para o ácaro e controle de entrada de pessoas e materiais (ferramentas) nos pomares. A utilização de resistência varietal como medida de controle para as doenças de plantas, não tem sido adotada pelo fato de atualmente não existir variedades de laranja, resistentes à leprose e, com características agronômicas desejadas para o consumo e para a indústria (RODRIGUES et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001).

2.4 Ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis*

2.4.1 Descrição

A família Tenuipalpidae (Acari) possui mais de 622 espécies distribuídas em 30 gêneros (CHILDERS et al., 2003a). Os ácaros desta família são conhecidos como ácaros planos e ocorrem geralmente em locais de clima tropical ou subtropical (BAKER & TUTTLE, 1987).

O gênero *Brevipalpus* é reconhecido como o mais importante grupo de espécies dentro da família. As espécies deste gênero possuem uma variedade no tamanho que varia de 200 a 410 µm de comprimento (HARAMOTO, 1969; BAKER & TUTTLE, 1987). Estes ácaros são geralmente de coloração avermelhada, mas podem variar de acordo com a espécie, podendo ser amarelos, vermelhos, verdes, verde ou preto avermelhados; são alongados e achatados dorsoventralmente. Possuem movimentos lentos, sendo considerados pragas de plantas, quando estão envolvidos como vetores de vírus (CHILDERS et al., 2003a).

As três espécies de *Brevipalpus* de importância econômica são: *B. californicus* (Banks), *B. obovatus* (Donnadieu) e *B. phoenicis* (Geijskes). Estas espécies são consideradas vetores da leprose, mas nas condições do Brasil apenas o *B. phoenicis* é considerado, esta espécie foi descrita pela primeira vez por D.C. Geijskes, em 1939, o qual deu o nome de *Tenuipalpus phoenicis*, apenas mais tarde outros autores o colocaram no gênero *Brevipalpus* (CHILDERS et al., 2003a).

A diferenciação entre *B. phoenicis*, *B. obovatus* e *B. californicus* é realizada com base em diferenças no padrão das setas dorsais no histerossoma e no número de solenídios no par de pernas II. *B. californicus* e *B. phoenicis* apresentam dois solenídios na extremidade do par de pernas II, enquanto *B. obovatus* apresenta um único. *B. californicus* apresenta seis pares de setas dorsais no histerossoma, enquanto *B. phoenicis* e *B. obovatus* apresentam cinco pares. Mas apenas *B. phoenicis* apresenta a combinação de cinco pares de setas histerossomais marginais e dois solenídeos (OOMEN, 1982).

2.4.2 Distribuição e ocorrência

Ácaros do gênero *Brevipalpus* são polípagos e apresentam distribuição cosmopolita, são encontrados na África, Ásia, Austrália, Europa, América do Norte, América do Sul e Ilhas do Pacífico (HARAMOTO, 1969). *B. phoenicis* é considerado vetor de pelo menos 24 vírus do tipo rhabdovírus para inúmeras espécies vegetais (KITAJIMA, et al., 2003). *B. phoenicis* é o ácaro mais importante que ocorre em citros, pois é o transmissor da leprose. Pode atacar folhas, ramos e frutos, mas prefere abrigar-se e alimentar-se em frutos novos.

O ácaro da leprose prefere viver em frutos maduros no interior da planta no período do inverno, mas pode ir para os ramos e folhas da periferia a partir da primavera. A forma de alastramento do ácaro no pomar dá-se principalmente pelo vento e muitas vezes pelo manejo da cultura (GRAVENA, 2005).

Apesar de relatos da transmissão de CiLV por *B. californicus* nos Estados Unidos e na Guatemala e *B. obovatus* na Argentina, no Brasil apenas o *B. phoenicis* é considerado vetor do CiLV. No entanto as espécies *B. californicus* e *B. obovatus* já foram encontradas no Brasil, mais precisamente no Estado de São Paulo, transmitindo vírus em orquídeas (FREITAS-ASTÚA et al., 1999; FERREIRA et al., 2003) e dama-da-noite (FREITAS-ASTÚA et al., 2002; FREITAS-ASTÚA et al., 2004) respectivamente, sugerindo que outras espécies de *Brevipalpus* também possam ser vetoras do CiLV.

Cerca de 1000 espécies vegetais foram relatadas como hospedeiras de ácaros *Brevipalpus* (CHILDERS et al., 2003a), muitas delas estão presentes nos pomares de citros. Mas até o momento, as únicas hospedeiras naturais do vírus relatadas são pertencentes ao gênero *Citrus*.

2.4.3 Ciclo de vida

O ciclo de vida de ácaros *Brevipalpus* consiste em ovo e quatro estágios ativos (larva, protoninfa, deutoninfa e adulto). Entre cada ínstar, o ácaro passa por períodos de imobilidade chamados de protocrisálida, deutocrisálida e teliocrisálida (HARAMOTO, 1969). Os ovos são colocados individualmente em locais protegidos como fendas, lesões, escamas de cochonilhas, exúvias de ácaros, além de

grânulos de poeira (CHIAVEGATO, 1986), mas agrupamentos de ovos também podem ser observados (HARAMOTO, 1969).

O ciclo biológico de *B. phoenicis* é fortemente influenciado por fatores como temperatura, umidade relativa e planta hospedeira (CHILDERS et al., 2003b). Por exemplo, segundo KENNEDY et al. (1996), o tempo de desenvolvimento de *B. phoenicis* a 26 °C foi de 9,53 dias para ovo, 19,13 dias para completar os estágios imaturos e 41,68 dias para o ciclo total. No caso de citros, o ciclo do ácaro em frutos de laranja Pêra, variou de 14,4 a 43,5 dias em temperaturas de 30 °C a 20 °C, respectivamente, e umidade relativa de 60%. Quando comparadas aos frutos, as folhas de citros foram consideradas menos adequadas como substrato para os ácaros, pois foi observado um número menor de descendentes por fêmea, maior tempo de incubação dos ovos obtidos e maior tempo de desenvolvimento do ciclo completo (17,6 a 30 °C dias e 60% de umidade relativa) (CHIAVEGATO, 1986).

Há estudos que comprovam que no caso de citros, as fêmeas de *B. phoenicis* ovopositam preferencialmente em ramos, folhas ou frutos com sintomas de verrugose, uma doença causada pelo fungo *Elsinoe fawcett*. A verrugose causa nas plantas, pequenas lesões que servem de abrigo para o ácaro os quais se agregam nestes locais para postura e alimentação (MATINELLI et al., 1976; CHIAVEGATO & KHARFAN, 1993; CHILDERS et al., 2001). Os ovos do ácaro da leprose são elípticos e de coloração alaranjado-brilhante, medindo cerca de 84 µm de comprimento por 60 µm de diâmetro (RODRIGUES & MACHADO, 1999). Após a fase de ovo, eclode a

larva que apresenta coloração vermelho-brilhante e é ativa. Na seqüência iniciam-se os estágios ninfais que dão origem aos adultos.

Estes ácaros apresentam reprodução do tipo partenogênese telítoca e automítica, onde fêmeas dão origem a fêmeas haplóides com dois cromossomos e machos são raramente encontrados (PIJNACKER et al., 1980). A haploidia entre fêmeas de *B. phoenicis* parece estar relacionada com a presença de bactérias endossimbióticas que se desenvolvem no interior do ácaro, causando um tipo de “feminilização” de indivíduos (WEEKS et al., 2001). A bactéria endossimbiótica que seria responsável pela feminilização dos machos, é do gênero *Cardinium* (CHIGIRA & MIURA, 2005; NOVELLI et al., 2005; NOVELLI et al., 2006). Este processo biológico ainda não foi totalmente esclarecido, mas sabe-se que na ausência destes microorganismos as fêmeas partenogenéticas podem dar origem a machos haplóides (WEEKS et al., 2001).

2.4.4 Importância econômica

Além da leprose, o *B. phoenicis* está associado com a transmissão de outros vírus, como a mancha anular do cafeeiro (CHAGAS et al., 2003); a mancha verde do maracujazeiro amarelo (KITAJIMA et al., 2003b) além de inúmeras viroses de plantas ornamentais (hibisco, ligustre, violeta, etc.) (KITAJIMA et al., 2003a).

O ácaro *B. phoenicis* ocorre em todas as regiões onde são cultivados os citros, mas somente nos locais em que ocorre associado ao vírus da leprose é considerada uma praga chave (RODRIGUES & MACHADO, 2000). RODRIGUES et al. (2001) observaram que a

presença do ácaro em locais onde não há a doença não provoca danos significativos à produção e, sendo assim, seu controle químico somente se justificaria nos pomares onde existem focos da doença ou riscos elevados de sua ocorrência.

Em pomares cítricos do estado de São Paulo, o ácaro *B. phoenicis* ocorre praticamente o ano todo, com picos populacionais em épocas de menor precipitação pluviométrica, ou seja, entre os meses de maio a agosto (OLIVEIRA 1986; RODRIGUES et al., 2003). Segundo RODRIGUES et al. (2003), o nível populacional do ácaro da leprose aumenta conforme o desenvolvimento dos frutos, ou seja, acompanhando seu crescimento após 150 a 170 dias do início da florada.

Em citros, a alimentação dos adultos ao longo da nervura central das folhas promove um amarelecimento dos tecidos da face oposta ao local onde os ácaros estão agregados. Esta alteração é causada pela injeção direta de substâncias tóxicas presentes na saliva dos ácaros, causando posterior necrose e conseqüente queda das folhas, principalmente em altas infestações (CHILDERS et al, 2003b).

2.4.5 Interação CiLV-C - *Brevipalpus*

De acordo com CHIAVEGATO (1996), todas as fases ativas do ácaro possuem capacidades idênticas de transmitir o vírus da leprose, sendo que as possíveis variações na eficiência de transmissão observadas, nas diferentes fases de desenvolvimento, podem ser decorrentes da maior ou menor facilidade (ou portunidade) em adquirir o vírus. Esses resultados não corroboraram aqueles obtidos por CHAGAS et al. (1983); FARIA et al (2008), que sugeriram que as larvas seriam

mais eficientes na transmissão da doença, embora, possa ser uma questão de oportunidade, já que as larvas se movimentam menos do que as outras fases ativas do ácaro permanecendo desta maneira mais tempo sobre as lesões.

NOVELLI et al. (2005) utilizando a técnica de RT-PCR, conseguiram detectar o vírus da leprose do citros em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro *B. phoenicis* (adultos, larvas e ninfas), mas não em ovos, confirmando desta maneira que não ocorre transmissão transovariana do CiLV-C.

Por não haver transmissão transovarial, o ácaro necessita alimentar-se em lesões da doença para aquisição e posterior inoculação do vírus, sendo então transmitido por toda a vida do vetor (CHIAVEGATO, 1986; CHIAVEGATO & MICHAN, 1987; BOARETTO et al., 1993). Embora em *B. phoenicis* não ocorra passagem transovariana do CiLV-C, há relatos, não confirmados, da transmissão do vírus pelos ovos em *B. obovatus* e *B. californicus* (KNORR, 1968).

Trabalhos de avaliação da influência do CiLV-C na capacidade reprodutiva e na longevidade de *B. phoenicis* já foram desenvolvidos na intenção de entender melhor a interação do vírus da leprose com o seu vetor. Aparentemente fêmeas virulíferas colocaram um número menor de ovos por dia e viveram em média menos dias quando comparadas com fêmeas sem o vírus, sugerindo de certa maneira que o CiLV-C exerce algum tipo de estresse sobre a biologia dos ácaros (GUIDOTTI et al., 2007; FARIA et al., 2008).

Até o momento, na literatura tem sido aceito que a interação do CiLV com o *B. phoenicis* é do tipo persistente propagativa

(RODRIGUES, 2000a), mas esta hipótese foi baseada somente na presença de supostas partículas virais no interior dos ácaros, por isso novos estudos devem ser realizados para comprovar o tipo de interação entre os mesmos.

2.4.6 Interação CiLV-C - hospedeiro vegetal (*Citrus* spp.)

São poucos os trabalhos sobre a interação do vírus da leprose e seu hospedeiro vegetal, pois até o momento, além do gênero *Citrus*, o único hospedeiro natural do CiLV é *Swinglea glutinosa*, uma rutácea próxima a citros comumente utilizada como cerca-viva em pomares de citros na Colômbia (LEON et al., 2006). Mecanicamente, em condições experimentais, algumas lesões já foram observadas em *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* e *Gomphrena globosa* (COLARICCIO et al., 1995).

Através do ácaro vetor é possível transmitir também o vírus para outros gêneros de plantas como, por exemplo, para feijoeiro (GROOT et al., 2006), *Solanum violaeifolium* (RODRIGUES et al., 2005), malvaisco, hibisco, trapoeraba, grevílea, sansão do campo e urucum (NUNES, 2007) e *Glycosmis pentaphylla* (FADEL et al., 2006), sendo estas, hospedeiras experimentais.

Dentro do gênero *Citrus*, a laranja doce (*C. sinensis*) é considerada a espécie mais suscetível à leprose, sendo que tangerinas (*C. reticulata*, *C. reshni*, *C. deliciosa*) e alguns híbridos, como o tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata*), são considerados menos suscetíveis. Outros, como o tangelo Lee (*C. clementina* x (*C. reticulata* x *C. paradisi*)) são suscetíveis à doença e limas ácidas (*C. aurantifolia*) e limões verdadeiros (*C. limon*) são considerados mais resistentes

(BITANCOURT, 1955; BASTIANEL et al., 2004; 2007). Mecanismos diferenciais parecem estar envolvidos com a resistência dos citros ao vírus e ao vetor, uma vez que plantas resistentes ao vírus não oferecem resistência à colonização pelo ácaro (RODRIGUES, 2003; BASTIANEL et al., 2006b).

A busca por fontes de resistência à doença dentro do gênero citros assume um papel muito importante no controle desta virose, já que são gastos milhões de dólares/ano com o controle químico do vetor. Um estudo com este objetivo foi conduzido no Banco ativo de Germoplasma do Centro de Citricultura Sylvio Moreira com 19 espécies de citros, onde nenhuma espécie apresentou um nível elevado de resistência ao vetor, mesmo sendo constatada a preferência do ácaro por alguns genótipos (FADEL et al., 2006).

BASTIANEL et al. (2006b) foram os primeiros a estudar a herança da resistência à leprose dos citros sugerindo a presença de um ou poucos genes relacionados à resistência em tangor Murcott. O fato do CiLV-C causar apenas lesões cloróticas e necróticas nas plantas hospedeiras e ser um vírus de lesão local, o que difere da maioria do vírus que são sistêmicos, levantou a hipótese de que os sintomas de leprose poderiam ser similares a uma reação de hipersensibilidade (HR) comumente observada em interações incompatíveis (resistência). Se as partículas virais não são reconhecidas pela planta hospedeira, a interação compatível, a favor do vírus, é estabelecida. Durante a HR são produzidas espécies reativas de oxigênio, síntese de calose e lignina, aumento nos níveis de ácido salicílico e produção de proteínas relacionadas à patogênese. Com isso a planta limita de certa forma o movimento a curta e a longa distância do patógeno. Porém, foi possível

comprovar várias diferenças entre resposta molecular de citros à leprose àquela induzida por vírus de interação incompatível (FREITAS-ASTÚA et al., 2007a).

2.5 Outros vírus de importância transmitidos por *Brevipalpus* spp.

Os vírus transmitidos por ácaros do gênero *Brevipalpus* (VTBs) têm em comum, além do vetor, semelhanças nos sintomas causados nas plantas hospedeiras, morfologia das partículas virais e efeitos citopatológicos. Os sintomas nos hospedeiros consistem em lesões locais (cloróticas, necróticas ou manchas verdes) nas folhas, ramos e frutos, os quais raramente se tornam sistêmicos (KITAJIMA et al., 2003a).

Espécies do gênero *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) constituem-se em um grupo importante de ácaros transmissores de diversos vírus de plantas. Muitas destas doenças virais são economicamente importantes, como é o caso da leprose dos citros (CHILDERS et al., 2003b; RODRIGUES et al., 2003), pinta verde do maracujazeiro (KITAJIMA et al., 2003), mancha anular do cafeeiro (CHAGAS et al., 2003) e mancha da orquídea (KONDO et al., 2003) etc. Entre os VTBs, o primeiro a ser morfológicamente e citopatologicamente estudado foi o que causa a mancha da orquídea (Orchid fleck virus – OFV), no Japão (DOI et al., 1969), que é transmitida por *B. californicus* (Banks) (MAEDA et al., 1998).

As partículas virais transmitidas por *Brevipalpus* podem ser encontradas no núcleo ou no citoplasma das células vegetais e induzem dois tipos característicos de alteração celular, o tipo nuclear (N) e o tipo citoplasmático (C) (KITAJIMA et al., 2003a).

O tipo nuclear foi observado primeiramente em orquídeas infectadas pela mancha da orquídea (DOI et al., 1969; KITAJIMA et al., 1974; DOI et al., 1977; KITAJIMA et al., 2001; KONDO et al., 2003), e posteriormente em alguns isolados do vírus da leprose dos citros, mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV), mancha clorótica do clerodendrum (Clerodendrum ringspot virus - ClRSV), mancha clorótica do hibisco (Hibiscus chlorotic spot virus - HCSV), mancha anular do malvavisco (Malvavirus ringspot virus) entre outros (KITAJIMA et al., 2003a).

Exemplos de VTBs do tipo citoplasmático seriam: Mancha anular de *Solanum violaeifolium* (*Solanum violaeifolium* ringspot virus - SvRSV), pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus - PFGSV), mancha verde do hibisco (Hibiscus green spot virus - HGSV), mancha anular do ligustre (*Ligustrum* ringspot virus - LiRSV), entre outros.

Em algumas hospedeiras podem ser encontrados o tipo nuclear (KITAJIMA et al., 1972) e o citoplasmático (COLARICCIO et al., 1995) como em citros, falsa hera (*S. violaeifolium*) (KITAJIMA & MORAES, 2000; KUBO et al., 2004; KITAJIMA et al., 2004), clerodendrum (KITAJIMA & MORAES, 2000), hibisco (KITAJIMA et al., 1999; KITAJIMA & RODRIGUES, 2001) e orquídeas (DOI et al., 1977; FREITAS-ASTÚA et al., 1999).

Foi constatado que pelo menos no caso da leprose dos citros, os tipos nuclear e citoplasmático apresentam seqüências nucleotídicas diferentes, uma vez que pares de “primers” que anelam ao longo do genoma do CiLV-C, não amplificaram amostras de CiLV-N (FREITAS-ASTÚA et al., 2005).

Muitas vezes a diferenciação dos tipos nucleares e citoplasmáticos se dá por comparação de lesões foliares. O tipo citoplasmático tende a induzir manchas verdes em folhas senescentes, enquanto que o tipo nuclear tende a induzir manchas cloróticas em folhas verdes (KITAJIMA et al., 2003a). No caso do CiLV essa tendência não é observada, uma vez que as lesões do tipo nuclear ou citoplasmático são sempre cloróticas ou necróticas. No entanto, as lesões foliares causadas por CiLV-C são em geral maiores e menos amareladas que aquelas causadas pelo CiLV-N; além disso, o CiLV-C tende a formar halos concêntricos de goma em torno das lesões (BASTIANEL et al., 2006a). O CiLV-N tende a formar lesões amareladas com um ponto necrótico em seu centro, o qual pode evoluir tomando grandes áreas da folha (KITAJIMA et al., 2003a).

2.6 Técnica de PCR quantitativo

2.6.1 Introdução

A técnica de PCR quantitativo (reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction – RT-qPCR) difere da PCR clássica pela capacidade de mensuração do produto de PCR amplificado em cada ciclo. Na prática, uma câmera de vídeo grava a luz emitida por um fluoróforo que é incorporado dentro dos novos produtos amplificados. Assim, a RT-qPCR permite que a amplificação seja acompanhada em tempo real, durante a fase exponencial da corrida, fazendo com que a quantidade de material inicial seja determinada precisamente. Comparada com outras técnicas de avaliação existentes, esta permite a detecção e quantificação de um

determinado ácido nucléico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível (GACHON et al., 2004).

BHOHM et al. (1999) foram os primeiros a empregar a técnica de RT-qPCR em plantas, para monitorar a presença de patógenos em espécies hospedeiras. A partir deste trabalho, vários outros têm sido publicados empregando a técnica para várias finalidades (GACHON et al., 2004), tais como detecção de SNP's (single nucleotide polymorphism), análise de seqüências virais, bacterianas ou de protozoários a partir de várias fontes, detecção de patógenos em alimentos, quantificação de produtos transgênicos, aplicação em diagnósticos como detecção de patógenos ou doenças onde o resultado requer rapidez e elevada sensibilidade, pois a técnica não requer a detecção em gel, por meio de eletroforese (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

Quando comparada com a PCR clássica, uma das principais vantagens da RT-qPCR é a rapidez em fornecer dados confiáveis e a sensibilidade da técnica. A RT-qPCR é altamente sensível na detecção de DNA, cDNA (ou transcritos) devido à combinação de amplificação realizada pelo passo de PCR e o sistema de detecção. Em qualquer caso a especificidade do processo pode ser checada depois da completa corrida de PCR, por eletroforese e execução da curva de dissociação e dados de seqüenciamento. É uma técnica muito conveniente para estudos com quantidade limitada de material inicial ou para avaliar a expressão de um grande número de genes com quantidades mínimas de RNA (FREEMAN et al., 1999).

A possibilidade de monitorar os fragmentos amplificados em cada ciclo fez com que a técnica de PCR em tempo real

revolucionasse o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. Esta técnica realiza a quantificação destes ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade porque determina valores durante a fase exponencial da reação. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR, sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e são proporcionais a quantidade de produto amplificado (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

O desenvolvimento da PCR em tempo real resultou da complementação da técnica de PCR criada por MULLIS (1986) com tecnologia de fluoróforos, óptica e informática. Na RT-qPCR, acrescenta-se, além dos iniciadores utilizados na PCR tradicional, um terceiro oligonucleotídeo como, por exemplo, a sonda TaqMan, com a extremidade 5' ligada a um fluoróforo e sua extremidade 3' a uma molécula *quencher*, capaz de, por um fenômeno físico denominado FRET- *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo após este ser estimulado por luz de comprimento de onda específico. Devido à propriedade 5'-3' exonuclease da enzima Taq DNA polimerase na reação de PCR, ocorre, durante a fase de extensão dos iniciadores, a separação de FAM (reporter) e TAMRA (quencher) da mesma molécula, o FRET é abolido e neste caso a fluorescência de FAM é captada pelo sistema óptico do aparelho de PCR em tempo real (DUARTE, 2006).

À medida que os ciclos da PCR vão se sucedendo, aumenta o número de fluoróforos FAM livres do fenômeno FRET e conseqüentemente a fluorescência gerada. Quando a fluorescência

emitida pelo fluoróforo atinge um limiar significativamente acima da fluorescência basal da reação e localizado na fase exponencial da mesma, o software do sistema correlaciona o ciclo que isto ocorre (Ct) com as informações decorrentes da curva padrão paralela à reação, o que possibilita a quantificação das amostras. É a propriedade de permitir uma avaliação da PCR em sua fase exponencial que qualifica a PCR em tempo real como metodologia quantitativa. Além disso, não existe comprometimento da sensibilidade original associada à técnica de PCR, o que também a credencia como metodologia qualitativa. Resumindo, este sistema informa se está ocorrendo a amplificação da molécula alvo e quantifica esta amplificação, uma vez que o software do sistema correlaciona a intensidade do sinal com a quantidade de amplificado formado (DUARTE, 2006).

Alguns desenvolvimentos realizados na década de 1990, utilizados conjuntamente, trouxeram possibilidades consideráveis ao método tradicional da PCR: 1) emprego da atividade 5'-3' exonuclease da enzima DNA polimerase para gerar um sinal específico detectável concomitante à reação de PCR; 2) sistema de detecção de sinal fluorescente simultâneo a realização da reação de PCR; 3) uso de sonda ligada covalentemente a fluóforo na reação de PCR (DUARTE, 2006).

Estes desenvolvimentos possibilitaram a criação da metodologia de PCR em tempo real, capaz de permitir a detecção do produto de PCR à medida que vai sendo formado, e não somente ao final da PCR. Dessa forma, acrescentou-se ao método da PCR tradicional, maior praticidade, menor tempo para obtenção do

resultado e maior sensibilidade, logo a contaminação cruzada é mais frequente (GIBSON et al. 1996).

A técnica de PCR quantitativa é um método usado para medir a quantidade inicial de ácidos nucleicos (cDNA/RNA) que será amplificada de acordo com a cinética da reação, analisada nas diferentes fases da PCR. A eficiência do qPCR vai depender de alguns pontos como: preparo da reação (pipetas calibradas); qualidade do template (molde); desenho dos primers (dimers); condições de termociclagem; concentração dos reagentes e tamanho do amplicon (50-150 bp) (APPLIED BIOSYSTEMS, 2006).

Alguns termos usados em qPCR e que devem ser mencionados são:

- **Baseline:** Fase onde a intensidade de sinal de produto amplificado ainda não ultrapassa a intensidade da fluorescência encontrada no meio.
- **Threshold:** Nível de fluorescência onde o sinal é detectado deve ser sempre realizado na fase exponencial.
- **Cycle Threshold (Ct):** Ciclo (ponto no tempo) onde a reação cruza o limiar de detecção (Threshold). Será neste ponto que os valores da intensidade de sinal serão coletados e utilizados para a quantificação das amostras.
- **Rn:** Sinal do reporter dividido pelo sinal de referência passiva (sinal do ROX). Normalização empregada para corrigir erros de pipetagem.

As estratégias capazes de detectar os produtos amplificados por RT-qPCR usam corantes fluorescentes e o processo combina amplificação e detecção dos produtos amplificados pela mensuração

da fluorescência gerada. Agentes intercalantes e sondas fluorogênicas são os dois principais tipos de moléculas usadas para detectar produtos amplificados por RT-qPCR (BUSTIN, 2000).

A estratégia SYBR-Green utiliza corantes fluorescentes que se intercalam às moléculas de DNA de fita dupla, é inespecífico em termos de sequência e necessita da execução de curva de dissociação ao final de cada corrida para garantir a inexistência de amplificação inespecífica. Já a estratégia TaqMan baseia-se na hibridação de sondas fluorescentes que se anelam no interior da sequência ser amplificada. (BUSTIN, 2000; GACHON et al., 2004). Em plantas, essas duas estratégias têm sido (BHOHM et al., 1999; BROUWER et al., 2003; SCHENK et al., 2003; SOUZA et al., 2003; CZECHOWSKI et al., 2004; GACHON & SAINDRENAN, 2004).

Como o agente intercalante se liga a qualquer fita dupla de nucleotídeo, a estratégia SYBR-Green pode ser usada para qualquer tipo de sequência, sendo uma vantagem econômica. Entretanto, apresenta uma desvantagem por ser igualmente incorporado em todos os amplicons. Caso seqüências inespecíficas forem amplificadas, o sinal emitido irá corresponder a ambos, seqüências específicas e não específicas, comprometendo a acurácia da quantificação. A curva de dissociação auxilia na detecção de produtos de amplificação múltipla. Para resolver este problema os agentes intercalantes podem ser substituídos por sondas que se ligam especificamente a seqüências alvo (BUSTIN, 2000), tais como as TaqMan.

2.6.2 Quantificação absoluta e quantificação relativa

Basicamente existem dois tipos de quantificação, a absoluta e a relativa. Na quantificação absoluta há a determinação da quantidade exata de moléculas. São obtidos valores numéricos apresentados em uma determinada unidade, como número de cópias ou nanogramas de DNA. Na quantificação relativa é realizada a análise comparativa do ácido nucléico alvo, normalizado por um controle interno, em relação ao calibrador. Os valores de Ct's (cycle threshold) de cada amostra e os resultados representam ordens de grandeza (ex.: 5x mais ou menos expressão de um determinado gene) (BUSTIN, 2000).

A quantificação absoluta é calculada com auxílio de uma curva padrão, construída por intermédio de diluições seriais de amostras padrão, contendo cópias da seqüência-alvo de DNA, geralmente obtidos de *amplicons* gerados via PCR ou plasmídeos contendo a inserção da seqüência-alvo ou ainda da própria célula ou microrganismo, desde que se saiba o número de cópias da seqüência-alvo em seu genoma (GINZINGER, 2002).

2.6.3 Quantificação de patógenos

A técnica de RT-qPCR é amplamente utilizada para a quantificação de patógenos de plantas e estudo de expressão gênica. BALAJI et al. (2003), utilizaram a técnica para quantificar o *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) e o *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) em plantas de aveia resistentes e suscetíveis. Os vírus BYDV-PAV e CYDV-RPV foram detectados 2 e 6 horas após a inoculação, respectivamente, em plantas de aveia suscetíveis, quando comparadas com 4 e 10 dias pelo teste de ELISA, comprovando que a técnica de

qPCR é altamente sensível e capaz de ser usada de forma rápida e precisa para diagnosticar doenças como as que causam nanismo amarelo em cereais de inverno.

Para a quantificação do *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV), que causa uma severa doença em abóbora, melão, melancia e outras cucurbitáceas, foi também utilizada a técnica de RT-qPCR com primers específicos. Foi possível detectar um baixo título viral de moléculas-alvo de cDNA de CVYV em folhas jovens de plantas resistentes e suscetíveis depois da inoculação mecânica. Diferenças significativas entre cDNA alvo foram encontradas entre os genótipos analisados, indicando diferenças na acumulação viral, correlacionando com os diferentes níveis de resistência (PICÓ et al., 2005).

OLMOS et al. (2004), utilizaram os métodos de SYBR-Green e TaqMan para quantificação do *Plum pox virus* (PPV) em plantas infectadas e também no afídeo vetor. Embora os dois métodos tenham sido capazes de detectar baixo número de cópias do alvo, o método TaqMan foi mais sensível, sendo utilizado com sucesso para detecção e quantificação do PPV no afídeo vetor. SCHNEIDER et al. (2004), também utilizaram qPCR e conseguiram detectar todas as estirpes do vírus PPV em vários hospedeiros e em diferentes tecidos da planta como folhas, galhos, raízes e brotos. Além disso, foi possível quantificar o nível de partículas virais adquiridas por diversas espécies de afídeos vetores. Mais uma vez pode-se observar que a técnica de qPCR é muito mais sensível do que a técnica de ELISA ou o PCR tradicional.

OSMAN et al. (2007), para detectar o *Grapevine leafroll associated viruses* 1–5 e 9 em plantas de videira (*Vitis vinifera*), de

vários locais geográficos, também utilizaram a técnica de RT-PCR em tempo real com a metodologia TaqMan e também a PCR convencional. Os autores fizeram uso do gene *18S* ribossomal de várias espécies de plantas como controle endógeno, para evitar possíveis resultados falso negativos. Através da RT-qPCR, 100% dos isolados dos vírus foram detectados, já com a RT-PCR convencional somente 89% dos isolados estudados puderam ser detectados. Com estes resultados é comprovada mais uma vez que a técnica de RT-PCR em tempo real é uma técnica rápida, confiável, sensível, fácil de aplicar, sendo possível detectar vários vírus na mesma reação.

Em insetos vetores, foi utilizado o sistema TaqMan para detectar e quantificar PPV (OLMOS et al., 2005). Recentemente o sistema TaqMan foi utilizado para detectar o vírus da tristeza dos citros (CTV), tanto no seu vetor (afídeos) como em plantas infectadas (BERTOLINI et al., 2008).

CAPÍTULO I

INTERAÇÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DO CITROS E SEU HOSPEDEIRO VEGETAL

RESUMO - A leprose é causada pelo vírus da leprose do citros (*Citrus leprosis virus* - CiLV) e transmitida de maneira persistente pelo *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). O CiLV é restrito à área da lesão, ocorrendo em baixo título na planta hospedeira. O presente estudo teve por objetivo comparar os níveis de resistência de laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada ao CiLV através da quantificação do vírus por RT-qPCR com base na expressão de quatro genes distintos do vírus (*MP*, *p29*, *p61* e *Hel*). Foram analisados RNAs totais extraídos de folhas coletadas em nove tempos após a inoculação pelo ácaro vetor, até o aparecimento dos sintomas em laranja Pêra, aos 40 dias. Observou-se um número muito maior de partículas virais em tecidos com lesão (10^{11}), enquanto em plantas assintomáticas, mesmo em laranja Pêra (altamente suscetível à doença). Tanto tangor Murcott quanto lima Dourada, consideradas resistentes à leprose, suportam um baixo título do vírus.

Palavras-chave: RT-qPCR, carga viral, Cilevirus, CiLV, citros, resistência viral.

¹Bióloga, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

²Colaborador Engenheira Agrônoma, Doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (CAPTACSM).

³Co-orientadora, Engenheira Agrônoma, Doutora em Virologia, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e do CAPTACSM.

⁴Colaborador Engenheiro Agrônomo, Doutor pesquisador do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (CAPTACSM).

⁵Orientadora, Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, professora do PPGAgro da FAMV e ICB/UPF.

INTERACTION OF THE VIRUS AND CITRUS LEPROSIS OF ITS HOST PLANT

ABSTRACT - Leprosis is caused by Citrus leprosis virus (CiLV) and transmitted in a persistent manner by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). CiLV is restricted to the lesion areas, occurring in low titer in its host plants. The objective of this study was to compare the levels of Pera sweet orange (*Citrus sinensis*), Murcott tangor (*C. sinensis* x *C. reticulata*) and *C. aurantifolia* resistance. Through RT-qPCR virus quantification based on four distinct genes (*MP*, *p29*, *p61* e *Hel* expression). RNAs extracted from leaves collected in nine different periods after the mite inoculation (up to the symptoms appearance in Pera sweet orange at 40 days after infestation) were analyzed. The CiLV detection in symptomatic tissues were consistently and significantly higher (10^{11}) than in asymptomatic plants even for the highly susceptible variety Pera. Both Murcott tangor and *C. aurantifolia*, considered resistant to leprosis, support low virus titers in their tissues.

Keywords: RT-qPCR, viral load, Cilevirus, CiLV, citrus, viral resistance.

¹Bióloga, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

²Colaborador Engenheira Agrônoma, Doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (CAPTACSM).

³Co-orientadora, Engenheira Agrônoma, Doutora em Virologia, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e do CAPTACSM.

⁴Colaborador Engenheiro Agrônomo, Doutor pesquisador do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (CAPTACSM).

⁵Orientadora, Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, professora do PPGAgro da FAMV e ICB/UPF.

1. INTRODUÇÃO

A leprose do citros é considerada uma das principais viroses na citricultura brasileira, devido ao uso predominante de variedades comerciais altamente suscetíveis como as laranjas doces, que totalizam mais de 80% dos plantios, e a presença endêmica do vírus e do vetor nas principais regiões de cultivo (BASTIANEL et al., 2006a).

A doença é causada pelo vírus da leprose dos citros (Citrus leprosis virus - CiLV), transmitida pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*, e caracteriza-se por induzir a formação de lesões locais restritas aos pontos de inoculação do vírus nas folhas, ramos ou frutos. O fato de o vírus permanecer apenas nas lesões, pois são observadas partículas nessas áreas e não nas adjacentes, torna o vetor ainda mais importante na epidemiologia da doença (COLARICCIO et al., 1995).

Os sintomas causados pelo vírus ocasionam reduções drásticas na produção, em função da queda prematura de folhas e frutos, seca de galhos, podendo no caso de ataque severo levar à morte da planta (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2006a). Um dos fatores que contribuem também para a importância da doença é o fato do agente causal, CiLV, ser transmitido por um ácaro polífago e cosmopolita, presente em todas as regiões citrícolas do mundo (CHILDERS et al., 2003b). No Brasil, o controle da leprose nos pomares se resume basicamente no controle químico do vetor, muitas vezes na ausência de focos da doença, o que representa uma parcela significativa de custos dentre aqueles destinados aos tratamentos fitossanitários (RODRIGUES & MACHADO, 2000; BASTIANEL et al., 2006a).

Ácaros do gênero *Brevipalpus* estão também associados com a

transmissão de inúmeros outros vírus de plantas, principalmente ornamentais. Os vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) têm em comum, além do vetor, semelhanças na sintomatologia causada nas plantas hospedeiras, morfologia das partículas virais e efeitos citopatológicos. Os sintomas nos hospedeiros consistem em lesões locais (cloróticas, necróticas ou manchas verdes) nas folhas, ramos e frutos, os quais raramente se tornam sistêmicos (KITAJIMA et al., 2003b).

As primeiras descrições de partículas do CiLV em tecidos foliares de citros foram relatadas por Kitajima et al. (1972). O vírus foi considerado inicialmente um membro tentativo da família *Rhabdoviridae* por sua morfologia e local de acúmulo na célula vegetal. Apenas com o seqüenciamento completo do genoma do vírus, o mesmo passou a ser considerado membro-tipo de um novo gênero de vírus, denominado Cilevirus (LOCALI-FABRIS et al., 2006).

Duas formas de vírus estão associadas à leprose dos citros, sendo denominadas em função da sua localização na célula vegetal: o tipo citoplasmático (CiLV-C) e o tipo nuclear (CiLV-N) (RODRIGUES et al., 2003). A forma citoplasmática ocorre em mais de 99% dos casos relatados da doença, enquanto o CiLV-N tem sido observado em locais restritos, como por exemplo em uma localidade do Panamá e nos municípios de Marquês de Souza no Estado do Rio Grande do Sul, Monte Alegre, Amparo e São Roque no Estado de São Paulo recentemente em Andradas no Estado de Minas Gerais (RODRIGUES et al., 2003; KITAJIMA et al., 2004; FREITAS-ASTÚA et al., 2004; CHAGAS et al., 2006). Apesar de serem transmitidas pelo mesmo vetor e causar sintomas idênticos, o recente

estabelecimento de testes de diagnóstico molecular através de primers específicos indicaram que as duas formas do vírus são bastante distintas (FREITAS-ASTÚA et al., 2005). Pelo fato do tipo citoplasmático ser o tipo de maior ocorrência e importância, o objeto deste estudo foi o CiLV-C, que será tratado no trabalho apenas como CiLV pois é convencionalmente aceito.

Além do gênero *Citrus* (RODRIGUES et al., 2003), a espécie *Swinglea glutinosa*, rutácea próxima ao citros (LEON et al., 2006) são os únicos hospedeiros naturais conhecidos do CiLV. Mecanicamente, em condições experimentais, algumas lesões já foram observadas em *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* e *Gomphrena globosa* (COLARICCIO et al., 1995) e, recentemente, tenha sido possível transmitir o vírus para outros gêneros de plantas através do ácaro vetor, como por exemplo, para feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), falsa hera (*Solanum violaeifolium*), cercas vivas, quebra-ventos e plantas daninhas como urucum (*Bixa orellana* L.), trapoeraba (*Commelina benghalensis* L), malvavisco (*Malvaviscum arboreus* Cav.), hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), e sansão do campo (*Mimosa caesalpineafolia*) comuns em pomares de citros (RODRIGUES et al., 2005; NUNES et al., 2006; GROOT et al., 2006; NUNES, 2007).

A laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) é considerada a espécie mais suscetível à leprose, sendo que tangerinas e alguns híbridos, como os tangores, são considerados menos suscetíveis, e os limoeiros, mais resistentes (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2006a). Sintomas menos intensos são observados nessas outras espécies e híbridos de citros, indicando que mesmo dentro do gênero existem respostas diferenciais à doença (BASTIANEL et al., 2008a

aceito para publicação). Além disso, foi observado que plantas resistentes ao patógeno não oferecem nenhuma resistência à colonização pelo ácaro, indicando a presença de mecanismos distintos envolvidos com a resistência dos citros ao vírus e ao vetor (RODRIGUES, 2000; BASTIANEL et al., 2004; FREITAS-ASTÚA et al., 2008 *submetido*).

Em relação aos mecanismos genéticos da planta envolvidos nas interações compatíveis e incompatíveis com o CiLV, muitos pontos ainda permanecem obscuros. Estudos recentes baseados em mapeamento genético de QTLs (*Quantitative Traits Loci*) sugerem uma resposta quantitativa, envolvendo mais de um gene de resistência e genes menores (BASTIANEL et al., 2008b *submetido*). Recentemente, com o seqüenciamento do genoma funcional dos citros (Expressed Sequence Tags–ESTs), foi sugerido que a resposta da interação compatível não parece ser de hipersensibilidade (FREITAS-ASTÚA et al., 2007a), resposta comum em doenças virais que se manifestam na forma de lesões locais em plantas.

O fato de CiLV não invadir seus hospedeiros sistemicamente leva a crer que mecanismos de inibição da passagem para o floema dessas plantas podem estar envolvidos, não sendo possível no entanto, descartar alguma dificuldade na replicação ou no movimento célula-a-célula das partículas. Baixo título viral tem sido detectado por testes moleculares em plantas assintomáticas de tangor Murcott, um híbrido natural de laranja e tangerina, sugerindo que mesmo altamente resistentes algumas plantas permitem a presença e uma baixa replicação do patógeno em seus tecidos (BASTIANEL et al., 2004).

Com o seqüenciamento completo do genoma do CiLV, novas perspectivas puderam ser agregadas aos estudos envolvendo as interações no patossistema leprose. A técnica de PCR quantitativo em tempo real (Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction – RT-qPCR) mensura o produto de PCR amplificado em cada ciclo da reação, permitindo a detecção de um dado ácido nucléico alvo de maneira rápida, específica e muito sensível, como também a quantificação absoluta inicial do material alvo (BUSTIN, 2000).

Essa técnica vem sendo amplamente utilizada para a quantificação de vírus como *Barley yellow dwarf virus*, *Cereal yellow dwarf virus* (BALAJI et al., 2003), *Cucumber vein yellowing virus* (PICO et al., 2005) e *Solenopsis invicta virus* (HASHIMOTO et al., 2007) em suas hospedeiras. Em afídeos vetores foi possível detectar e quantificar o *Plum pox virus* (PPV) (OLMOS et al., 2005) e o vírus da tristeza dos citros (CTV) (BERTOLINI et al., 2008).

Desta maneira o objetivo deste trabalho foi quantificar a expressão de alguns genes do CiLV, através da técnica de RT-qPCR, a fim de comparar os níveis de resistência de plantas com respostas contrastantes (suscetível e resistente) para a doença e, conseqüentemente, obter subsídios que possam auxiliar no entendimento do patossistema leprose dos citros.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Foram utilizadas plantas com aproximadamente seis meses de idade, originadas de borbulhas de laranja Pêra (*C. sinensis* (L.) Osbeck), tangor Murcott (*C. sinensis* x *C. reticulata* Blanco) e lima

Dourada (*C. aurantifolia* (Christm) Swingle) provenientes de material microenxertado, livres do vírus da tristeza dos citros (CTV) e enxertadas em limão Cravo (*C. limonia* Osbeck). As variedades e híbrido de citros são considerados, respectivamente, altamente suscetível, tolerante e resistente à leprose dos citros (RODRIGUES, 2000, BASTIANEL et al., 2006a). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e constou de três variedades x dois tratamentos (plantas infestadas com ácaros virulíferos e plantas controle, sem infestação por ácaros e sem vírus) x cinco repetições biológicas (cinco folhas) x nove tempos de coleta.

2.2 Inoculação do vírus nas plantas hospedeiras

Para inoculação do CiLV nas plantas de citros, foram utilizados *B. phoenicis* de uma população originária de laranja doce e mantida no Laboratório de Acarologia do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC. Indivíduos adultos foram transferidos para folhas destacadas de laranja com sintomas de leprose, para adquirir o vírus por um período de 72 horas. Foram coletadas três amostras com 10 ácaros cada, para confirmar a aquisição do vírus pelos mesmos, através de RT-PCR, conforme descrito por FREITAS-ASTÚA et al. (2005). Após esse período, 30 ácaros foram transferidos para uma área restrita de folha (cerca de 2 cm²), através da cola entomológica Tanglefoot. Nas folhas também foi aplicado uma mistura de farinha de trigo, gesso, areia fina e água (Figura 1), que simula um lugar de abrigo para o ácaro do mesmo modo que frutos com sintomas de verrugose no campo (RODRIGUES et al., 2007).

As folhas de cada genótipo foram coletadas individualmente

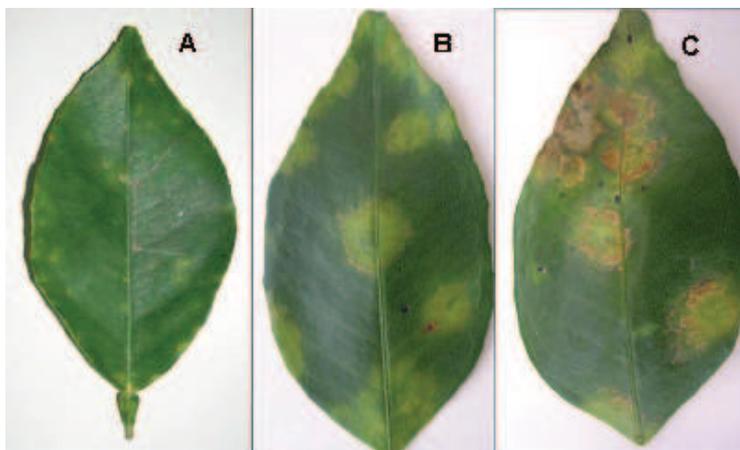


Figura 2. Lesões jovens (A), intermediárias (B) e necróticas (velhas) (C) de leprose do citros em folhas de laranja Pêra causadas por CiLV.

2.3 Extração e quantificação de RNA total

O RNA total foi extraído de 100 mg de cinco folhas (repetições) de cada tratamento, que foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino diretamente em tubos plásticos (eppendorfs) de 1,5 mL. Após a maceração, adicionou-se 1 mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies) por amostra para a extração do RNA. As amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, homogêneas no vortex e centrifugadas por 10 minutos a 4 °C a 12.000 rpm. Depois destas etapas, as amostras foram transferidas para um novo tubo, onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Após homogeneização por inversão, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos, centrifugadas por 6 minutos a 4 °C a 12.000 rpm e transferidas novamente para um novo tubo, onde se adicionou 500 µL de isopropanol 100%, misturou-se por

inversão e deixou-se 10 minutos a temperatura ambiente. Foi realizada outra centrifugação por 10 minutos a 4 °C a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado, lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 4 °C a 9.000 rpm e descartado novamente. O pellet foi seco em liofilizador e ressuscitado em 30 µL de água tratada com DEPC (Diethyl pyrocarbonato). Em seguida, as amostras foram tratadas com DNaseI RNase free para eliminar qualquer contaminação por DNA. O RNA total foi quantificado em gel de agarose 1% e em espectrofotômetro a 260 nm e armazenado a uma temperatura de -80 °C.

2.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com 1000 ng de RNA total, utilizando-se random primers e as enzimas M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) e RNase-OUT (Invitrogen).

2.5 Desenho e síntese de primers e sondas

Para desenho de primers e sondas, listados na Tabela 1, foi utilizado o *software* Primer-Express (Applied Biosystems). Para as análises de RT-qPCR, foram utilizados quatro pares de primers baseados nos genes da possível capa protéica (*p29*), helicase (*Hel*), proteína de movimento (*MP*) e uma ORF com função desconhecida (*p61*), desenhados a partir de ORFs do genoma do CiLV (as duas primeiras no RNA 1 e as demais no RNA 2) (LOCALI-FABRIS et al., 2006). A Figura 3 mostra um modelo esquemático do genoma do vírus da leprose do citros.

Todos os primers e as sondas marcadas com MGB FAM foram sintetizados através do Custom TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) e amplificam fragmentos em torno de 100 pb.

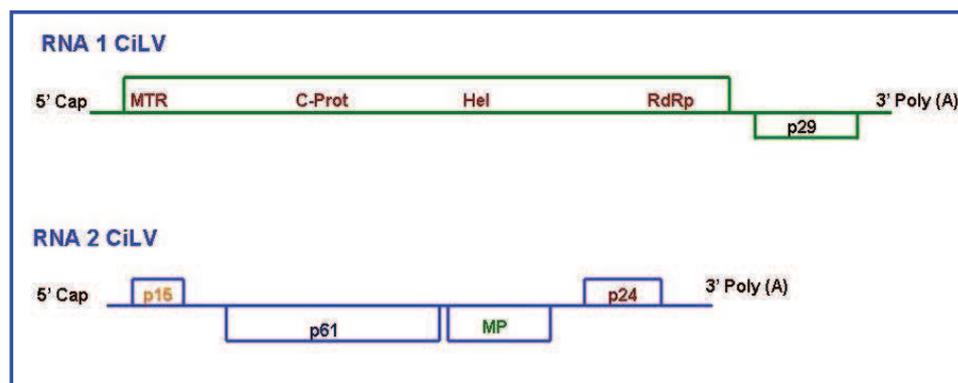


Figura 3. RNA 1 e RNA 2 do vírus da leprose dos citros. Fonte: LOCALI-FABRIS et al., 2006.

Tabela 1. Seqüência e tamanho de primers e sondas e utilizados nas análises de RT-qPCR

Gene	Seqüência do primer (5'-3')	Seqüência da sonda (marcação FAM)
<i>p29-R</i>	CGGCATATTTTGGGCAGTGTTG	CTCCAACCCATAAAGTTT
<i>p29-F</i>	CCATAAATAAGAAAGCGGCGAAAGC	
<i>p61-R</i>	CGGGAGCAGTAGCAATAACAAAATC	TTCCGCCAATTCATCTTTGTT
<i>p61-F</i>	TGCTTGCCTATCCTTCATTATTGATGT	
<i>Hel-R</i>	CAAGATACCCGTTGATGGTTCTGA	ACGGCAATCGACTTCT
<i>Hel-F</i>	GCATTAAGCGTCGTTATCCTGATTT	
<i>MP-R</i>	TGATTATCATCCTCACTCTTGTCTCGTA	CTTAACCGTCAAGTCAATCG
<i>MP-F</i>	ACTCACCCTCCTCTGAATCGT	

2.6 Construção da curva-padrão e quantificação do título viral

A quantificação das amostras por RT-qPCR foi realizada com base em uma curva-padrão que foi construída com alíquotas de concentrações conhecidas do plasmídeo. A amplificação das amostras padrão foi realizada paralelamente à amplificação das amostras teste, ou seja, na mesma placa do RT-qPCR.

Para a obtenção da curva-padrão foram utilizadas diluições seriais (diluição de 100 vezes) partindo de uma solução estoque de 10^{10} cópias/ μL de plasmídeos contendo o inserto do gene *p61* e uma solução de 10^9 cópias/ μL contendo os demais genes avaliados (Tabela 2). Foram obtidas seis diluições para cada gene e as alíquotas de cada diluição foram armazenadas à -20°C . Para saber a concentração inicial das soluções-estoque (moléculas/ μL), a conversão para número de transcrito foi realizada de acordo com BERTOLINI et al. (2007), descrita abaixo:

$$1) \text{ Peso em Daltons (g/mol)} = (\text{tamanho do plasmídeo} + \text{inserto}) \\ (330 \text{ Da} \times 2 \text{ nucleotídeos/bp})$$

$$\text{Ex: } 3.929 \text{ (tamanho do plasmídeo pCR® 2.1 em pb)} + 849 \\ \text{(tamanho do inserto da Hel em pb)} \times 660 = 3.153.480 \text{ g/mol}$$

$$2) \text{ g/molécula} = \text{número de cópias} = \text{g/mol/número de Avogrado} \\ (6.02214199 \times 10^{23})$$

$$\text{Ex: } 3153480 / 6.02214199 \times 10^{23} = 5.2383389 \times 10^{-18} \text{ g/molécula}$$

3) Conhecendo o número de cópias para o plasmídeo e a concentração do plasmídeo que é adicionada em cada PCR, o número de moléculas na reação é determinada pela concentração do plasmídeo (g/ μL)/gramas/moléculas.

$$\text{Ex: } 50 \times 10^{-9} \text{ g}/\mu\text{L} * 5.2383389 \times 10^{-18} \text{ g/molécula} = 9.54 \times 10^9$$

*concentração da solução contendo plasmídeo pCR® 2.1 (Invitrogen) e o gene da Helicase, inferida em gel de agarose e/ou espectrofotômetro.

Informações sobre os plasmídeos, tamanhos dos insertos e as concentrações são detalhadas na Tabela 2. As curvas-padrão foram obtidas por meio de quantificação absoluta, utilizando o ABI PRISM 7000 *Sequence Detector System* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL, contendo 1 µL da soluções de plasmídeos, 1 µL do assay (sonda mais primers), 8 µL de H₂O e 10 µL de Mix Taqman. As condições térmicas da RT-qPCR foram 50 °C por 2 min, 94 °C por 10 min e 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C, cada ciclo, sendo a duração da reação de 1h e 50 min aproximadamente.

Tabela 2. Vetor (plasmídeo) utilizado, tamanho do inserto e concentração inicial das soluções-estoque

Gene	Plasmídeo	Tamanho do plasmídeo	Tamanho do inserto	Concentração inicial
<i>p61</i>	pGem-T Easy	3015 pb	1611 pb	1.97 x 10 ¹⁰ g/mol
<i>Hel</i>	pCR® 2.1	3929 pb	849pb	9.54 x 10 ⁹ g/mol
<i>MP</i>	pCR® 2.1	3929 pb	891pb	5.87 x 10 ⁹ g/mol
<i>p29</i>	pCR® 2.1	3929 pb	789pb	9.67 x 10 ⁹ g/mol

Na Figura 3 (A, B, C e D), pode-se observar a eficiência da reação (Ct x Log de moléculas), da curva-padrão e coeficiente de regressão para todos os genes estudados.

Como normalizador foi utilizado o gene que codifica para *18S* RNA, marcado com o fluoróforo VIC-MGB (Applied Biosystems),

que visa normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA. As reações no RT-qPCR foram realizadas em duplicatas, e com pelo menos três repetições biológicas, sendo que em alguns casos testaram-se cinco repetições biológicas.

A estimativa do título viral de cada amostra de cDNA foi feita através da comparação com as curvas-padrão, incluídas em todas as RT-qPCR realizadas. Para cada reação foram utilizados 3 μ L de cDNA, 10 μ L de Mix TaqMan (Applied Biosystems), 5,4 μ L de água Mili-Q, 0,6 μ L de cada primer + sonda e 1 μ L do *18S* para um volume final de 20 μ L. As amostras foram processadas em duplicatas, com as mesmas condições térmicas utilizadas para a obtenção das curvas-padrão. Os resultados foram normalizados utilizando Cts obtidos para o controle endógeno presente na mesma reação. O Ct é definido como o primeiro ciclo de amplificação no qual a fluorescência indica que um produto de PCR é detectado acima do limiar.

Adicionalmente, foi realizada a expressão relativa dos genes do vírus no hospedeiro vegetal, neste caso os resultados foram normalizados utilizando Cts obtidos para o controle endógeno presente na mesma reação e como calibrador foi utilizado o Ct da planta sadia, ou seja, o controle negativo.

3 RESULTADOS

O presente trabalho apresenta dados de detecção e quantificação absoluta e relativa de CiLV por RT-qPCR utilizando uma alíquota do cDNA.

Os sintomas surgiram no genótipo suscetível, laranja Pêra, aos 40 dias após inoculação, estando de acordo com a literatura que relata

que sintomas de lesões cloróticas ou necróticas, típicos de leprose, podem aparecer de 15 dias a meses após a inoculação do vírus pelo ácaro nas folhas, frutos e ramos (BASSANEZI et al., 2002).

Diluições seriadas a partir de 9.67×10^9 g/mol, 9.54×10^9 g/mol, 5.87×10^9 g/mol, 1.97×10^{10} g/mol, respectivamente para os genes *p29*, *Hel*, *MP* e *p61* foram utilizadas para gerar as curvas-padrão para cada gene estudado. A equação foi determinada por análise de regressão linear, e a quantidade de partículas virais em 50 ng de solução de plasmídeos contendo cada um dos genes foi extrapolada através das curvas-padrão. As diluições seriadas permitiram a quantificação de genes do CiLV por até cinco pontos de magnitude para todos os genes estudados, com valores de Ct variando de 4 a 34 ciclos de qPCR.

A quantidade de partículas contidas em 1000 ng de RNA total (RNA de vírus e planta), foi estimada através da curva padrão, colocada em cada placa de reação (qPCR), para os quatro genes avaliados, já a quantificação da expressão dos genes foi calculada utilizando a planta sadia (controle negativo) como calibrador e o gene que codifica a região *18S* como normalizador.

Para os genes *p61* e *MP* não houve amplificação nos tempos de coleta, apenas no controle positivo, mesmo os primers desenhados estarem funcionando, pois amplificaram amostras com sintomas de leprose para os dois genes citados acima, a expressão dos mesmos deve ser menor do que os genes *Hel* e *p29* que estão relacionados respectivamente com a replicação e o capsídeo viral. Outro fato que deve ser mencionado é que para os genes *Hel* e *p29*, no controle positivo foi possível detectar a presença do vírus muito antes do que nas plantas assintomáticas. Os dados obtidos mostraram que dos genes

de CiLV estudados e que foram amplificados, o mais expresso foi *Hel*.

Na quantificação absoluta, o número de partículas para os três genótipos estudados, quando analisado o gene *Hel*, a quantidade de partículas (média de três repetições biológicas) variou em torno de 22 a 663 partículas/ng de RNA total e para o gene *p29*, cerca de 1 a 2.943 partículas/ng de RNA total (Tabela 3).

Para o gene *Hel*, na quantificação absoluta, tanto para o genótipo laranja Pêra como para tangor Murcott houve aumento no número de partículas virais no tempo de 6 dai com diminuição no decorrer das demais coletas e aumento novamente aos 30 dai. Já para o genótipo lima Dourada o pico de aumento no número de partículas foi na coleta de 9 dai, e diminuiu nas demais coletas (Figura 4). Neste caso, é importante salientar que lima Dourada é o genótipo resistente à leprose e uma possível explicação poderia ser que os mecanismos de defesa da planta podem estar retardando de certa maneira o estabelecimento do patógeno, quando comparado com os genótipos suscetível e tolerante.

Para o gene *p29*, na quantificação absoluta, no genótipo laranja Pêra o aumento no número de partículas também tem pico aos 6 e 30 dai, assim como para *Hel* (Tabela 4). Para tangor Murcott, o que se observa é que aos 12 dai o número de partículas começa a aumentar, com pico aos 18 e 30 dai novamente. No genótipo lima Dourada este aumento no número de partículas inicia aos 9 e 12 dai com declínio e aumento novamente aos 40 dai (Figura 5). O que se pode observar e concluir é que para laranja Pêra, genótipo suscetível, tanto para o gene *Hel* como para *p29*, o número de partículas virais, bem como a

expressão destes genes inicia antes (6 dai) do que os genótipos tangor Murcott e lima Dourada, respectivamente tolerantes e resistentes.

Tabela 3. Quantificação absoluta e relativa obtidas através da técnica Rt-qPCR com o gene *Hel* para os três genótipos em estudo

<i>Hel</i>	Quantificação absoluta (qt partículas)			Quantificação relativa (n x mais do que o controle negativo)			
	Tempo coleta (Dias)	Pêra	Murcott	lima Dourada	Pêra	Murcott	lima Dourada
2		114.18	42.67	49.35	0.29	0.16	6.37
3		125.51	32.94	65.75	1.47	0.02	0.84
6		204.78	69.03	77.47	14.01	0.02	4.17
9		70.35	48.48	662.63	0.11	0.01	76.142,75
12		42.79	33.21	634.01	0.05	0.01	3.296,56
18		53.01	21.77	296.40	5.99	0.00	129.39
24		51.47	29.05	213.33	0.06	0.00	13.84
30		114.95	38.19	56.82	0.01	0.00	1.56
40		24.42	32.14	28.71	0.02	0.11	0.29
Sint.		13.832.673.775.88			84.695,64		

Na quantificação relativa, a expressão dos genes do CiV foi calibrada com o controle negativo e no geral, o gene *Hel*, que está envolvido na replicação viral também teve maior expressão do que o gene *p29* (possível capsídeo), sendo que o gene *Hel*, quando comparando os três genótipos, foi mais expresso no genótipo lima Dourada no tempo de 9 dai (Figura 6) e menos expresso em tangor

Murcott, onde o gene parece começar a se expressar somente aos 40 dai (Tabela 4). Para laranja Pêra pode-se observar maior expressão aos 6 e 18 dai.

Tabela 4. Quantificação absoluta e relativa obtidas através da técnica Rt-qPCR com o gene *p29* para os três genótipos em estudo

<i>p29</i> Tempo coleta (Dias)	Quantificação absoluta (qt partículas)			Quantificação relativa (n x mais do que o controle negativo)		
	Pêra	Murcott	Lima Dourada	Pêra	Murcott	Lima Dourada
2	121.03	338.87	0.11	3.11	0.16	0.03
3	189.45	473.97	0.28	4.10	0.02	0.00
6	231.40	469.32	0.45	11.73	0.02	0.08
9	147.59	289.48	8.55	2.40	0.01	27.33
12	104.05	1.185,66	10.41	0.49	0.01	48.49
18	119.35	2.942,81	6.24	4.92	0.00	4.29
24	105.92	407.42	4.16	2.82	0.00	0.15
30	146.25	772.31	0.11	0.10	0.00	0.00
40	83.33	282.27	2.82	3.01	0.11	0.03
Sint.	228.541.133,01			2.446.690,19		

A expressão do gene *p29*, observado para laranja Pêra também teve maior expressão aos 6 e 18 dai, iniciando novamente a expressão aos 40 dai. Para tangor Murcott a expressão do gene *p29*, assim como para *Hel*, teve aumento somente aos 40 dai (Figura 7). De maneira geral, o padrão observado para laranja Pêra (genótipo suscetível) com relação à expressão dos genes *Hel* e *p29*, ocorreu em tempos de coleta

anteriores ao genótipo resistente lima Dourada, o que pode ser explicado, já que em plantas resistentes e tolerantes, o estabelecimento da doença pode ser mais tardio do que em plantas suscetíveis. BALAJI et al., (2003) através de RT-qPCR observaram maior quantidade de partículas de BYDV no genótipo suscetível em comparação ao genótipo resistente.

Diferenças no título de partículas virais entre repetições biológicas e até mesmo entre genótipos, pode ser devido às diferenças na alimentação do vetor que adquirem e inoculam o vírus de maneira desigual. Foi observado menor título viral detectado por RT-qPCR nos estágios anteriores ao aparecimento de sintomas para todos os genótipos, quando comparado ao controle positivo, sendo na ordem de 10^8 a 10^{11} ou seja, milhares de vezes.

Os mecanismos de defesa da planta podem ser rapidamente ativados, e desta maneira retardar o estabelecimento do patógeno, desta maneira pode não estar permitindo que o CiLV se torne sistêmico na planta ficando restrito apenas à área da lesão. MARQUES et al. (2007) mostraram que lesões de leprose em citros promovem colapso das células condutoras do floema e necrose do parênquima paliçádico atingindo desta maneira os feixes vasculares. Estes sintomas podem impedir de certa maneira que as partículas do CiLV translocam para áreas ainda não infectadas, dificultando e até mesmo impedindo o movimento do vírus célula-a-célula, estando aí uma possível explicação para o CiLV induzir apenas lesão local e não invadir a planta sistemicamente.

Os sintomas foram observados somente no genótipo suscetível, mas devido ao baixo título viral nos tecidos vegetais, o que vai ao

encontro da literatura, que relata que mesmo para genótipos suscetíveis o CiLV é encontrado em baixas concentrações nos tecidos da planta (BASTIANEL et al., 2006a), não foi possível afirmar se estas partículas, principalmente nos primeiros tempos de coletas, seriam resultantes da própria inoculação do ácaro ou da replicação do vírus.

Através dos dados obtidos, sugere-se que apesar dos genótipos tangor Murcott e lima Dourada serem considerados tolerantes e resistentes respectivamente, os mesmos podem hospedar o vírus da leprose, sem a manifestação de sintomas. Um fato observado nos resultados é que não foi detectada expressão para os genes *MP* e *p61* (ambos no RNA 2 do CiLV) em nenhum dos tempos de coleta, apenas em lesões de leprose, desta maneira, pode estar havendo algum mecanismo, de silenciamento gênico, pois a replicação e o movimento do vírus neste caso podem estar ocorrendo mais lentamente, e como resultado, partículas de CiLV são detectadas apenas quando ocorre o surgimento dos sintomas.

Sabe-se que o silenciamento gênico refere-se a uma série de mecanismos dos quais a expressão de um ou mais genes é regulada negativamente, constituindo um mecanismo eficiente de defesa de plantas contra vírus (VAUCHERET et al., 2001). Os vírus necessitam de duas etapas fundamentais para o estabelecimento da infecção em suas plantas hospedeiras, a primeira é a replicação dentro das células infectadas, o que necessita de proteínas codificadas pelo seu próprio genoma, assim como fatores do hospedeiro. A segunda, o movimento célula-a-célula, responsável pela dispersão do vírus na planta, sendo que, uma das proteínas envolvidas para este mecanismo é a proteína

de movimento (*MP*) (MATTHEWS, 1991). Deste modo, mecanismos desenvolvidos pela própria planta na tentativa de controlar a dispersão do vírus poderiam estar inibindo de alguma maneira a replicação e o movimento das partículas do CiLV dentro da planta.

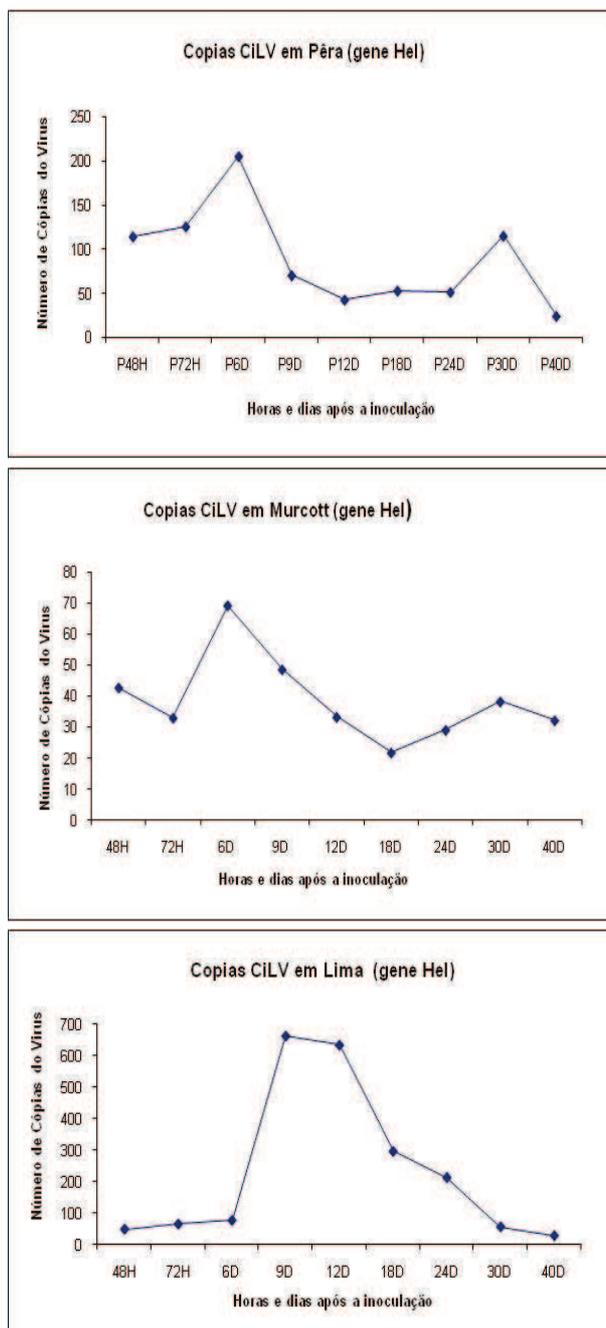


Figura 4. Número de partículas virais para o gene *Hel* nos diferentes tempos de coleta, para os genótipos laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada.

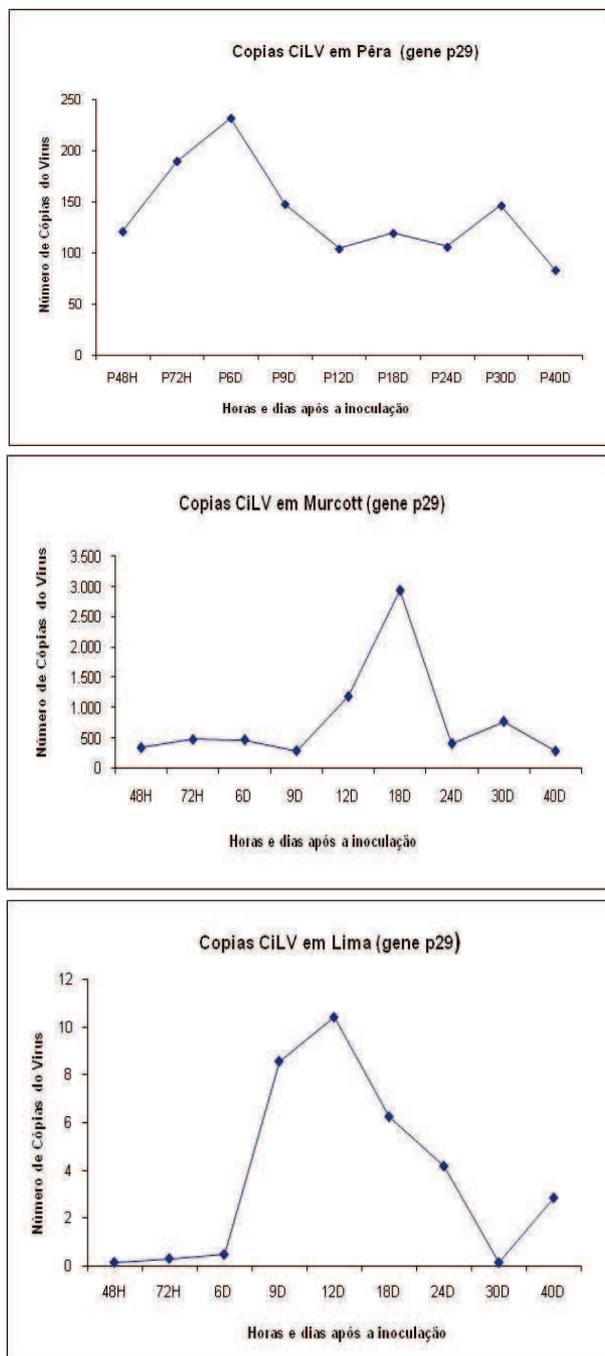


Figura 5. Número de partículas virais para o gene *p29* nos diferentes tempos de coleta, para os genótipos laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada.

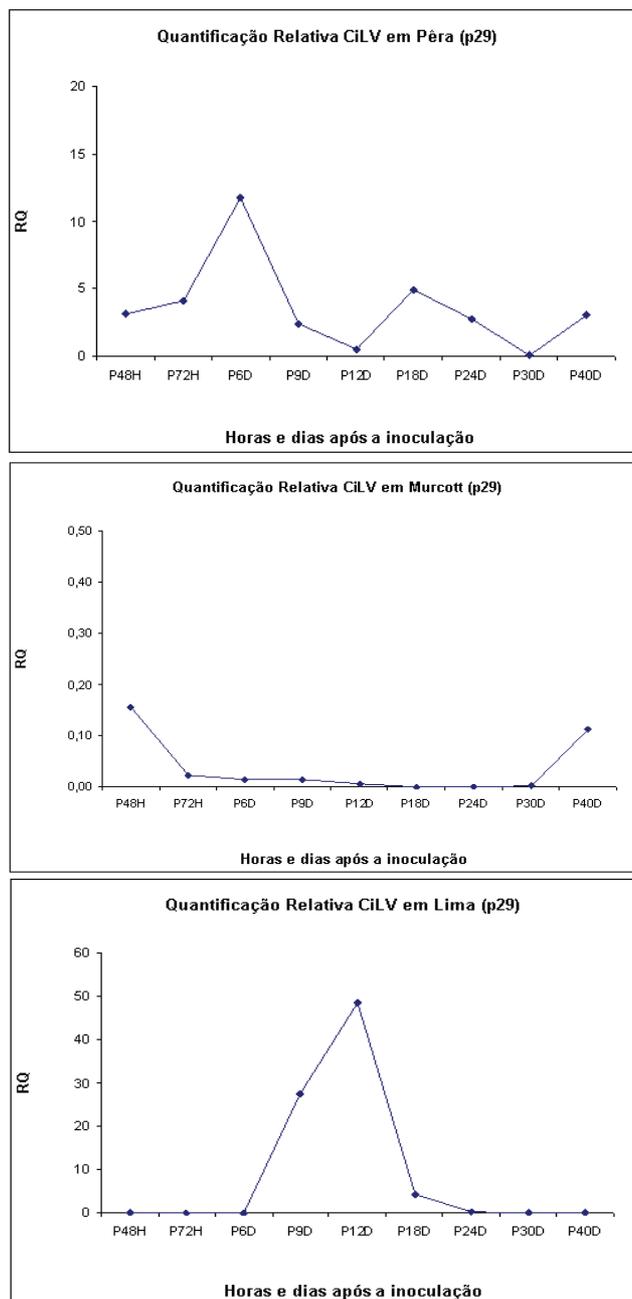


Figura 6. Quantificação relativa para o gene *p29* nos diferentes tempos de coleta, para os genótipos laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada.

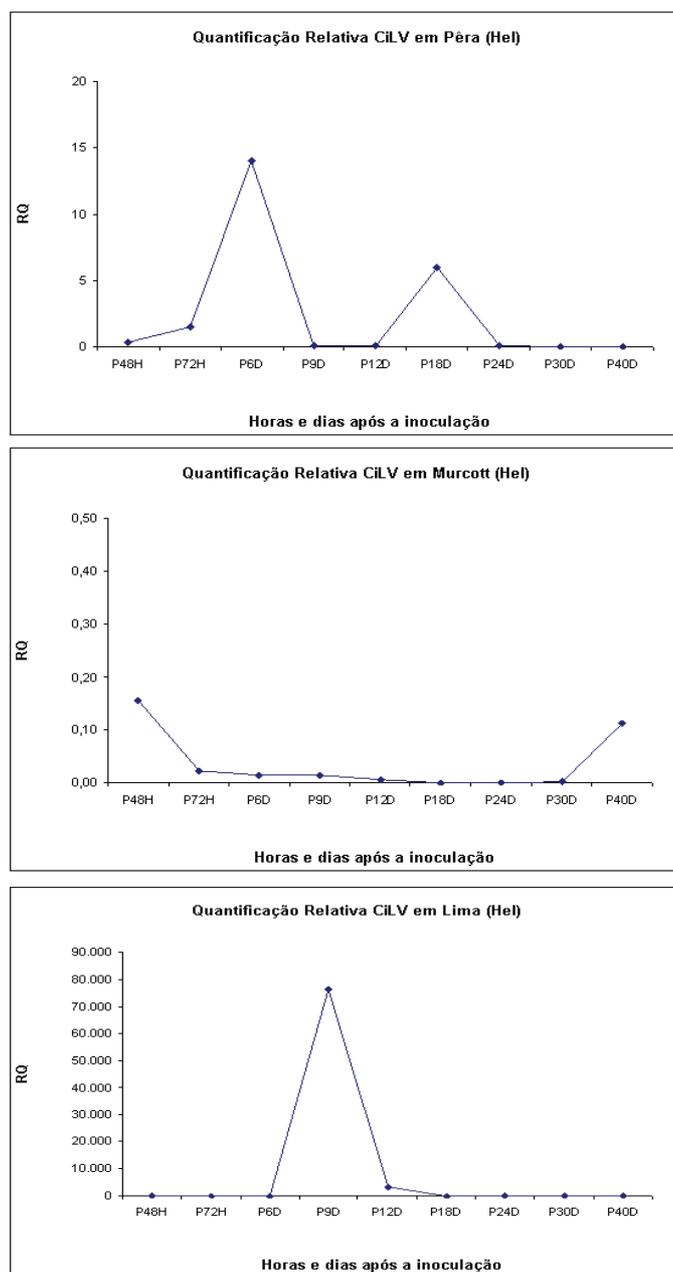


Figura 7. Quantificação relativa para o gene *Hel* nos diferentes tempos de coleta, para os genótipos laranja Pêra, tangor Murcott e lima Dourada.

Quanto às análises por RT-qPCR de lesões jovens, intermediárias e necróticas de leprose dos citros, o título do CiLV é consistentemente maior em lesões mais velhas, ou seja, já necróticas, sendo que em lesões jovens o vírus é detectado em menor concentração. Isto também vai ao encontro dos resultados obtidos por Calegario (*comunicação pessoal*), que trabalhando com antissoro recombinante produzido contra o gene *MP* observou que a reação sorológica foi maior em lesões velhas e intermediárias em relação a lesões jovens. A Figura 8 mostra o plot de amplificação no RT-qPCR para o gene *p29*.

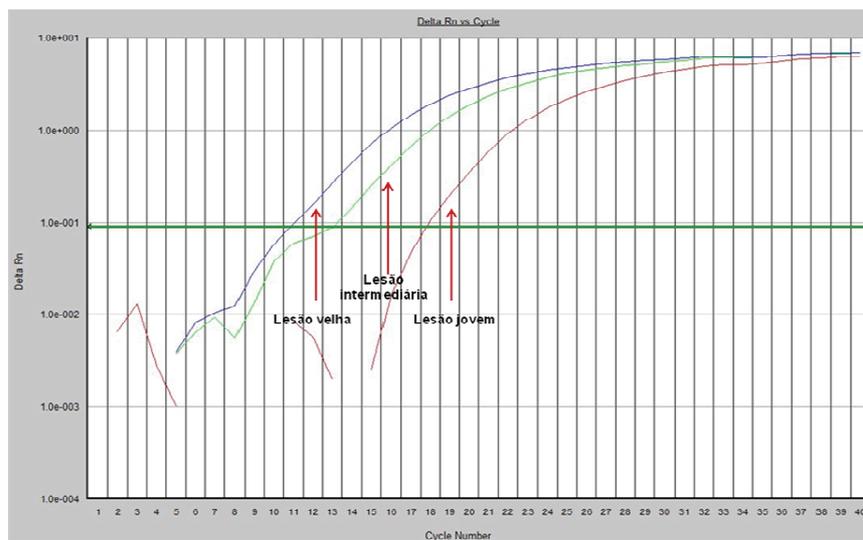


Figura 8. Amplicons gerados na comparação do título viral em lesões jovens, intermediárias e velhas de leprose dos citros, usando o gene *p29*.

4 DISCUSSÃO

A citricultura no Brasil exerce papel importante no agronegócio, gerando na safra de 2006/07 um faturamento superior a U\$ 2,0 bilhões com a exportação de suco concentrado e outros produtos, além de gerar milhares de empregos diretos e indiretos (SECEX/MEDIC, 2007). Mas problemas fitossanitários ainda são as maiores causas da baixa produtividade dos citros e é por este motivo que o entendimento dos principais patossistemas é de extrema importância para suprir esta lacuna que se faz presente nas grandes culturas agrícolas como no caso dos citros.

A tecnologia de qPCR é um teste muito sensível para a detecção de vírus em seus hospedeiros. Entre as vantagens destacam-se a avaliação do número de moléculas, permitindo a resolução de diferentes quantidades de ácido nucléico, tempo reduzido de processamento das amostras entre outras (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

Em experimento conduzido por BALAJI et al. (2003), os mesmos quantificaram o vírus do nanismo amarelo da cevada (BYDV) e o vírus do nanismo amarelo dos cereais (CYDV), em plantas de aveia e trigo suscetíveis e resistentes a estas duas viroses, onde avaliou-se também 12 tempos de coletas após inoculação com afídeos virulíferos. Para BYDV em plantas de aveia a replicação começou 2 horas após a inoculação (hai) do vírus, sendo que o acúmulo de RNA viral atingiu o máximo 8 hai e então caiu significativamente 12 hai. Para os autores, uma possível explicação seria a degradação do RNA viral pela planta através de um mecanismo de defesa da mesma, ou seja, pelo silenciamento de alguns genes

virias, ou ainda a possibilidade da planta ter um ritmo mais rápido de crescimento em relação à replicação e acúmulo do vírus, isto poderia estar reduzindo a quantidade de RNA viral por unidade de RNA total.

Para o vírus da tristeza dos citros (CTV), quando avaliou-se dois hospedeiros vegetais, laranja Pêra (genótipo suscetível) e tangerina Ponkan (genótipo tolerante), dois isolados do vírus, CTV-IAC, isolado fraco e CTV-CB, isolado severo e os genes *p23*, *p25* e *p27* em sete tempos de coleta, os resultados demonstraram que o nível de expressão dos genes de CTV avaliados neste trabalho, aumentou desde as fases iniciais da infecção em todas as combinações de hospedeiro/isolado de CTV, sendo que a expressão do isolado fraco foi mais elevada do que a do isolado severo. A exceção foi observada para o gene *p27* em tecidos de Pêra inoculados com CTV-CB. A maior expressão dos genes de CTV em ambos os hospedeiros foi o gene *p23* (TARGON *et al*, *comunicação pessoal*).

Em trabalho recente, FREITAS-ASTÚA *et al.* (2007) encontraram 254 genes putativos sendo diferentemente expressos em plantas de laranja Pêra desafiadas ou não com o CiLV, sendo a maior parte deles envolvida no metabolismo da planta, enquanto outros estavam relacionados a respostas a estresse e tradução de sinais. Sabe-se que infecções causadas por vírus têm efeitos prejudiciais no metabolismo da planta, afetando inúmeros processos celulares como síntese de ácidos nucléicos e proteínas, metabolismo de lipídios e carboidratos e funcionamento de enzimas e hormônios. Dos 254 genes encontrados, 193 foram induzidos e 61 reprimidos, foi observado também repressão de genes que codificam enzimas chaves envolvidas na fotossíntese, sugerindo que mesmo antes do aparecimento dos

sintomas de lesões cloróticas e necróticas, típicos de leprose, genes envolvidos na respiração são reprimidos, fortalecendo a hipótese da resposta dos citros ao CiLV ser diferente da observada em outros hospedeiros que desenvolvem lesão local necrótica quando desafiadas com um agente viral.

As alterações observadas nos sintomas de leprose são muito parecidas com reação de hipersensibilidade (RH), motivo pelo qual chegou a ser comentado a possibilidade da doença ser uma reação de hipersensibilidade nas plantas de citros, mas como a leprose não se manifesta em poucas horas ou dias e não resulta em uma interação incompatível não pode ser considerada uma RH. Estudos moleculares de interações compatíveis confirmam que a leprose dos citros difere de respostas normalmente associadas a RH em outras interações patológicas (FREITAS-ASTÚA et al., 2007).

Nos resultados obtidos para o patossistema citrus-CiLV-*B. phoenicis*, não foi possível observar um aumento crescente no número de partículas virais nos diferentes tempos de coleta após a inoculação, o que observa-se, são picos de aumento e diminuição, ou seja muita variação, tanto no número de partículas virais como na expressão dos genes. Estes resultados também demonstram a complexidade dos mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos no patossistema leprose dos citros e que há ainda muita coisa a ser realizada para elucidar este patossistema.

CAPÍTULO II

INTERAÇÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DO CITROS E DO ÁCARO VETOR

RESUMO - A leprose é causada pelo vírus da leprose do citros (Citrus leprosis virus - CiLV) e transmitida de maneira persistente por *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). O ácaro vetor se reproduz por partenogênese telítica, onde fêmeas dão origem a fêmeas haplóides com dois cromossomos e machos são raramente encontrados, não havendo passagem transovariana do CiLV-C para os descendentes. Cada indivíduo precisa alimentar-se em lesões para adquirir o vírus e poder então transmiti-lo durante toda a vida do vetor. Embora tenha sido sugerido que ocorra replicação do vírus no interior do ácaro, sendo esta relação do tipo circulativa-propagativa, estudos de microscopia eletrônica indicam que isso pode ser verdadeiro para os vírus da leprose dos citros tipo nuclear [CiLV-N, vírus distinto do CiLV-C, raramente encontrado], da mancha anelar do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV) e da mancha clorótica do Clerodendrum (Clerodendrum chlorotic spot vírus - CICSV), todos do tipo nuclear. O presente trabalho teve por objetivo quantificar através da técnica de qPCR, o número de partículas virais em ácaros. Para tanto, os vetores foram submetidos à quatro tratamentos, após terem sido submetidos a um período de aquisição de 48 horas e com esta finalidade entender se ocorre ou não a replicação do vírus no vetor, através da expressão de três genes do CiLV-C (*MP*, *p29*, e *Hel*). Adicionalmente as interações do CICSV e CoRSV com o vetor também foram estudadas. Os

resultados indicam que as partículas virais de CiLV-C somente circulam no interior do vetor, sem se replicar nos mesmos, diferentemente do que ocorre nos VTBs nucleares.

Palavras-chave: VTBs, transmissão persistente, CiLV-C, CiLV-N, RT-qPCR.

¹Bióloga, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

²Colaborador, Engenheira Agrônoma, Doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (CAPTACSM)

³Co-orientadora, Engenheira Agrônoma, Doutora em Virologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e do CAPTACSM.

⁴Colaborador, Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fisiologia, pesquisador do CAPTACSM e coordenador do Laboratório de Biotecnologia.

⁵Orientadora, Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, professora do PPGAgro da FAMV e ICB/UPF.

INTERECTION OF THE CITRUS LEPROSIS VIRUS AND THE MITE VECTOR

ABSTRACT - The leprosis is caused by the virus leprosis of citrus (Citrus leprosis virus - CiLV) in a manner transmitted by persistent *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). The mite vector is reproduced by thelytokous parthenogenesis, where females give rise to females with two haploid chromosomes and males are rarely found, no passage of CiLV for descendants. Although it has been suggested that occurs replication of the virus within the mite, and this relationship of the circulative and propagative manner, studies of electron microscopy indicate that this may be true for the virus of citrus leprosis type nuclear [CiLV-N, a virus distinct the CiLV-C, rarely found], the ring of coffee stain (CoRSV) and the chlorotic spots of *Clerodendrum* (CICSV), all of the nuclear kind. This study aimed to quantify through the technique of qPCR, the number of viral particles in mites undergoing constant source of inoculum, inert medium and hosts the mite and not just the virus, having been subjected to a period of 48 hours of purchase and thus contribute to the understanding occurs or is not a replication of the virus in the vector. We studied the expression of three genes of CiLV-C (*MP*, *p29* and *Hel*). Besides the interactions of CICSV and CoRSV with vector were also studied. The results indicate that for the C-CiLV the only viral particles circulating inside the vector without replicating the same, different from what occurs in nuclear VTBs.

Key-words: VTBs, transmission persistent, CiLV-C, CiLV-N, RT-qPCR.

¹Bióloga, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAMV) da Universidade de Passo Fundo (UPF).

²Colaborador, Engenheira Agrônoma, Doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (CAPTACSM)

³Co-orientadora, Engenheira Agrônoma, Doutora em Virologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e do CAPTACSM.

⁴Colaborador, Engenheiro Agrônomo, Doutor em Fisiologia, pesquisador do CAPTACSM e coordenador do Laboratório de Biotecnologia.

⁵Orientadora, Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, professora do PPGAgro da FAMV e ICB/UPF.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de citros, sendo que a exportação de sucos de laranja na safra de 2006/07 superou U\$ 2,0 bilhões (SECEX/MEDIC, 2007). No entanto, a produtividade da citricultura brasileira ainda é relativamente baixa, devido basicamente à ocorrência de pragas e doenças, cujos controles, geralmente químicos, representam elevada parcela dos custos de produção.

Dentre as doenças da cultura dos citros, a causada pelo vírus da leprose (*Citrus leprosis virus - CiLV*) tem grande importância, devido principalmente aos gastos no controle químico do vetor, que no estado de São Paulo correspondem a mais de U\$ 80 milhões/ano (NEVES et al., 2004). A aplicação de pesticidas se dá em função da presença do ácaro, muitas vezes na ausência de focos da doença, o que causa também um problema ambiental significativo (RODRIGUES & MACHADO, 2000; BASTIANEL et al., 2006).

O gênero *Brevipalpus* é reconhecido como o mais importante dentro da família Tenuipalpidae, compreendendo espécies consideradas sérias pragas de plantas (CHILDERS et al. 2003a), especialmente por serem vetoras de pelo menos 40 vírus baciliformes para inúmeras espécies vegetais (KITAJIMA et al., 2004). Muitas das viroses transmitidas por esses ácaros são economicamente importantes, como a leprose dos citros (RODRIGUES et al., 2003), a pinta verde do maracujazeiro (KITAJIMA et al., 2003), a mancha anular do cafeeiro (CHAGAS et al., 2003) e a mancha da orquídea (KONDO et al., 2003), entre outras. Os vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) têm em comum, além do vetor, os sintomas

causados nas plantas hospedeiras [lesões locais cloróticas, necróticas ou manchas verdes nas folhas, ramos e frutos, os quais raramente se tornam sistêmicos (KITAJIMA et al, 2003)], a morfologia das partículas e os efeitos citopáticos, que podem ser de dois tipos: nucleares (N) ou citoplasmáticos (C).

O tipo nuclear foi observado primeiramente em orquídeas infectadas pela mancha da orquídea (Orchid fleck virus – OFV) (DOI et al., 1969; KITAJIMA et al., 1974), e posteriormente em cafeeiro com mancha anular (Coffee ringspot virus - CoRSV), clerodendrum com mancha clorótica (Clerodendrum chlorotic spot virus - CICSV), entre outros. Exemplos de VTBs do tipo citoplasmático são CiLV-C, mancha anular de *Solanum violaefolium* (*Solanum violaefolium* ringspot virus - SvRSV), pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus – PFGSV), entre outros (KITAJIMA et al., 2003). Em algumas hospedeiras, como citros, *S. violaefolium*, clerodendron, hibisco e orquídeas podem ser encontrados vírus tanto do tipo nuclear quanto citoplasmático (DOI et al., 1977; COLARICCIO et al., 1995; FREITAS-ASTÚA et al., 1999; KITAJIMA et al., 1999; KITAJIMA & MORAES, 2000; KITAJIMA & RODRIGUES, 2001; KITAJIMA et al., 2004; KUBO et al., 2004).

O CiLV-N é de rara ocorrência, é associado a partículas baciliformes que ocorrem no núcleo de células infectadas e produz efeitos citopáticos similares aos induzidos pelo OFV (KITAJIMA et al., 1972, RODRIGUES et al., 2003). O CiLV-C também é associado a partículas baciliformes, mas observadas no retículo endoplasmático e à presença de viroplasma denso no citoplasma (KITAJIMA et al., 1974; COLARÍCCIO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2003).

Presumia-se que os dois tipos de partículas poderiam ser estádios diferentes de desenvolvimento do mesmo vírus ou dois vírus distintos (KITAJIMA et al., 1995). No entanto, com o recente seqüenciamento do genoma do CiLV-C, foi demonstrado que as duas formas do vírus não compartilham seqüências genômicas, sendo vírus distintos (FREITAS-ASTÚA et al., 2005; LOCALI-FABRIS et al., 2006). Tentativas de estudos biológicos e moleculares com o CiLV-N não lograram sucesso (Kubo, K. & Kitajima, E.W., comunicação pessoal).

Apesar de relatos da transmissão de CiLV por *B. californicus* nos Estados Unidos e na Guatemala e *B. obovatus* na Argentina, no Brasil apenas o *B. phoenicis* é considerado vetor do CiLV-C, embora as outras espécies supracitadas já tenham sido encontradas no país transmitindo VTBs para orquídeas (FREITAS-ASTÚA et al., 1999; FERREIRA et al., 2003), dama-da-noite e *S. violaeifolium* (FERREIRA et al., 2007; FREITAS-ASTÚA et al., 2002; 2004), respectivamente.

O ciclo de vida do ácaro consiste em ovo e quatro estágios ativos (larva, protoninfa, deutoninfa e adulto), que são fortemente influenciados por fatores como temperatura, umidade relativa e planta hospedeira (CHILDERS et al., 2003b). Os ovos são colocados individualmente em locais protegidos como fendas, lesões, escamas de cochonilhas, exúvias de ácaros, além de grânulos de poeira (CHIAVEGATO, 1986), mas agrupamentos de ovos podem ser observados (HARAMOTO, 1969). Em citros, as fêmeas de *B. phoenicis* ovopositam preferencialmente em ramos, folhas ou frutos com sintomas de verrugose, uma doença causada pelo fungo *Elsinoe*

fawcett (MATINELLI et al., 1976; CHIAVEGATO & KHARFAN, 1993; CHILDERS et al., 2001).

Estes ácaros apresentam reprodução do tipo partenogênese telítoca e automítica, onde fêmeas dão origem a fêmeas haplóides com dois cromossomos e machos são raramente encontrados (PIJNACKER et al., 1980). A feminilização de indivíduos parece estar relacionada com a presença de bactérias endossimbióticas do gênero *Cardinium* (WEEKS et al., 2001; CHIGIRA & MIURA, 2005; NOVELLI et al., 2005; 2006), apesar de existirem populações apossimbióticas compostas apenas de fêmeas (GROOT et al., 2006; KITAJIMA et al., 2007).

Todas as fases ativas do ácaro são capazes de transmitir o vírus da leprose sendo as larvas mais eficientes (CHAGAS et al., 1983; FARIA et al., 2008), possivelmente pelo fato de elas se movimentarem menos do que as outras fases ativas, permanecendo mais tempo sobre as lesões (FARIA et al., 2008). Trabalhos de avaliação da influência do CiLV-C na capacidade reprodutiva e na longevidade de *B. phoenicis* já foram desenvolvidos com a intenção de entender melhor a interação vírus-vetor. Aparentemente não houve diferença estatisticamente significativa entre número de ovos e longevidade média das fêmeas virulíferas quando comparadas com as avirulíferas, sugerindo que o CiLV-C não interfere na biologia dos ácaros (FREITAS-ASTÚA et al., 2008).

Há relatos, não confirmados, da transmissão do vírus pelos ovos em *B. obovatus* e *B. californicus* (KNORR, 1968). Entretanto, para *B. phoenicis*, estudos recentes com RT-PCR confirmaram que não ocorre transmissão transovariana do CiLV-C (NOVELLI et al., 2005) e,

portanto, o ácaro necessita alimentar-se em lesões da doença para aquisição e posterior inoculação do vírus, sendo então transmitido por toda a vida do vetor (CHIAVEGATO, 1986; BOARETTO et al., 1993), mesmo que se alimente posteriormente em tecidos sadios (RODRIGUES, 2000).

O estudo das interações vírus-ácaro ainda é pouco explorado, sendo apenas adaptado do modelo vírus-inseto, que congrega a maior parte da informação disponível sobre os quatro tipos de interação: não-persistente, semi-persistente, persistente circulativa e persistente propagativa (INOUE-NAGATA & NAGATA, 2002). Até o momento, tem sido aceito que a interação do CiLV-C com o *B. phoenicis* é do tipo persistente propagativa (RODRIGUES, 2000). No entanto, esta hipótese foi baseada somente na presença de supostas partículas virais no interior dos ácaros e, possivelmente, no relato de transmissão transovariana de CiLV-C para espécies de *Brevipalpus* (KNORR, 1968). Por outro lado, indícios biológicos, como a capacidade de transmissão do vírus pela fase larval do ácaro (CHAGAS et al., 1983; FARIA et al., 2008), indicam pequeno período de latência, o que sugere que talvez o vírus não se multiplique no vetor.

Apesar das semelhanças entre VTBs citoplasmáticos e nucleares, existem também diferenças relevantes entre os vírus desses dois grupos. O único VTB nuclear que teve o genoma completamente seqüenciado foi o OFV que, segundo KONDO et al. (2006), deve pertencer à família *Rhabdoviridae*, tendo sido tentativamente classificado como membro-tipo de um novo gênero, *Dichorhabdovirus*. Por outro lado, apenas CiLV-C foi seqüenciado entre os VTBs citoplasmáticos, evidenciando que não apresenta

qualquer similaridade com rhabdovirus e, portanto não deve ser considerado como membro dessa família (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006). Ao nível de gênero, foi sugerida a criação do Cilevirus, tendo o CiLV-C como membro tipo (LOCALI-FABRIS et al., 2006).

Ainda não se conhece o tipo de interação dos VTBs nucleares com o ácaro vetor, mas, como hipótese, suspeita-se que seja persistente-propagativa, como acontece com os rhabdovirus. Para CoRSV, CICSV e CiLV-N foram encontrados viroplasmas tanto no núcleo como no citoplasma de células das glândulas prossomais de ácaros, indicando que os mesmos replicam-se nos tecidos dos vetores (KITAJIMA, 2007). No entanto, o mesmo parece não acontecer para o CiLV-C, já que cortes ultrafinos de mais de 300 ácaros não detectaram a presença de viroplasmas no vetor, evidenciando apenas raras partículas virais em poucos indivíduos (*E.W. Kitajima, comunicação pessoal*). É importante mencionar que os rhabdovirus apresentam interação circulativa propagativa com seus vetores, um exemplo pode ser o vírus da faixa clorótica do milho (*Maize mosaic virus - MMV*) que é um rhabdovírus transmitido de forma persistente pela cigarrinha *Peregrinus maidis*, sendo que o tempo de acesso para a aquisição do vírus é de algumas horas e o período latente, até o início da transmissão pode variar de uma a sete semanas (OLIVEIRA et al., 2003) e o vírus *Lettuce necrotic yellows virus* (LNYV) que também se replica no inseto vetor *Hyperomyzus lactucae*, sendo transmitido para sua progênie (RANGLES & CARVER, 2002).

Em função da relevância de se determinar qual a natureza dessa relação, uma vez que ela está diretamente relacionada com o

manejo da doença no campo, o objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento do CiLV-C em *B. phoenicis* a fim de tentar esclarecer a ocorrência ou não da replicação desse vírus no interior do ácaro vetor e, conseqüentemente, elucidar o tipo de interação vírus-vetor para esse patossistema, através da quantificação do vírus no vetor por qPCR (Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction – RT-qPCR). Essa técnica vem sendo amplamente utilizada para a quantificação de vírus como *Barley yellow dwarf virus*, *Cereal yellow dwarf virus* (BALAJI et al., 2003), *Cucumber vein yellowing virus* (PICO et al., 2005) e *Solenopsis invicta virus* (HASHIMOTO et al., 2007) em seus hospedeiros vegetais. Em afídeos vetores foi possível detectar e quantificar *Plum pox virus* (PPV) (OLMOS et al., 2005) e o vírus da tristeza dos citros (CTV) (BERTOLINI et al., 2008). Adicionalmente, foram estabelecidos experimentos com CICSV e CoRSV para comparar VTBs nucleares com CiLV-C, ao nível de quantidade no ácaro vetor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três estudos (i) quantificação do CiLV em ácaros submetidos a diferentes tratamentos (ii) quantificação do CICSV em ácaros submetidos a diferentes tratamentos e (iii) quantificação de CiLV, CICSV e CoRSV em ácaros virulíferos (72 horas de aquisição) e nos respectivos hospedeiros vegetais sintomáticos, cujas etapas são descritas a seguir. Este último foi realizado com o objetivo de comparar a quantidade de vírus nucleares (CICSV e CoRSV) e citoplasmáticos (CiLV-C), nos seus respectivos hospedeiros naturais.

2.1 População de ácaros

Foram utilizados ácaros avirulíferos de populações de *B. phoenicis*, mantidos e multiplicados em frutos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) no Laboratório de Acarologia do CAPTACSM (Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC) em Cordeirópolis, SP. A mesma população foi utilizada para os três estudos realizados.

2.2 Aquisição do CiLV pelo ácaro vetor

Folhas de laranja doce com sintomas recentes de CiLV foram coletadas de plantas localizadas no campo experimental do CAPTACSM, as quais serviram como fonte de inóculo do vírus. As folhas foram isoladas com algodão embebido em água, restringindo as lesões da doença, formando arenas. Ácaros avirulíferos foram transferidos para as folhas citadas acima com pincéis de poucos pêlos, onde permaneceram para a aquisição do vírus por dois dias. Após esse período, os ácaros foram transferidos para cada tratamento proposto. Por ocasião da transferência dos ácaros para os tratamentos, três amostras de dez ácaros (três repetições biológicas) foram coletadas para a quantificação do CiLV-C adquirido e utilizadas nas análises de RT-qPCR como controle, assim como três amostras de ácaros avirulíferos foram coletadas antes de serem submetidas ao período de aquisição, utilizados como controle negativo nas RT-qPCRs. Os tratamentos utilizados para este estudo foram:

a) inóculo constante, que foi constituído de fruto de laranja Pêra (*C. sinensis*) com sintomas de leprose. Os frutos eram inspecionados diariamente, e quando havia postura, os ovos eram retirados para evitar a coleta de ácaros de gerações subsequentes;

b) fruto de limão Cravo (*C. limonia* Osbeck), planta supostamente hospedeira somente do ácaro e não do vírus da leprose;

c) folhas de clerodendrum (*Clerodendron speciosum*), marcadas e isoladas na planta com cola entomológica, sendo esta também supostamente hospedeira somente do ácaro e não do vírus;

d) meio inerte, que consistiu de placa de Petri pincelada com uma mistura de farinha e gesso para servir de abrigo aos ácaros (RODRIGUES et al., 2007). Neste tratamento, os mesmos ficavam sem alimentação.

O fruto de limão Cravo e as folhas de Clerodendrum foram avaliados por RT-qPCR de modo a certificar que o CiLV não foi transmitido para essas plantas e desta forma possivelmente re-adquirido pelos ácaros. A Figura 1 mostra os substratos (frutos, folhas ou placa) utilizados nos quatro tratamentos.

Foram coletados 10 ácaros, com três repetições, por tratamento. As coletas para os tratamentos de inóculo constante e fruto de limão Cravo foram realizadas aos 2, 5, 7, 9, 12, 14, 16, 19, 21, 23, 26 dias após a transferência dos ácaros supostamente virulíferos. Para o tratamento em folhas de clerodendrum, as coletas foram realizadas nos mesmos períodos/intervalos, porém até 19 dias após a inoculação. Os ácaros mantidos em meio inerte foram coletados diariamente de dois a sete dias, em função de um menor tempo de sobrevivência dos mesmos.

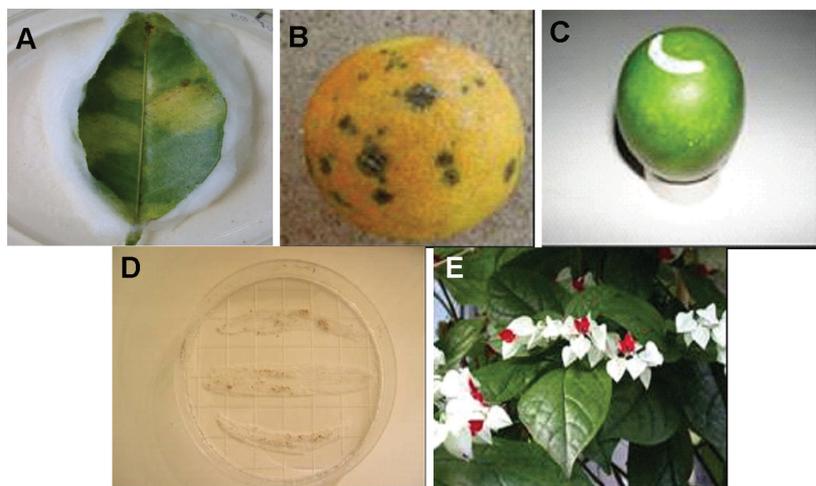


Figura 1. Folha de laranja Pêra com sintomas de leprose utilizada como fonte de inóculo inicial (A), fruto de laranja Pêra utilizado no tratamento inóculo constante (B), fruto de limão Cravo (C), meio inerte (D) e folhas de clerodendrum (E).

2.3 Aquisição do CICSV pelo ácaro vetor

Folhas de clerodendrum com sintomas causados por CICSV, provenientes da ESALQ-USP (Piracicaba-SP) (Figura 2), gentilmente cedidas pelo prof. E.W.Kitajima, foram utilizadas como fontes de inóculo para *B. phoenicis*. Estes ácaros permaneceram 72 horas no inóculo, sendo então transferidos para fruto de laranja Pêra (supostamente não hospedeira do CICSV), meio inerte (como descrito anteriormente para o CiLV) e deixados em inóculo constante (folhas destacadas de clerodendrum com sintomas). As coletas também constaram de três repetições com 10 ácaros para cada repetição.

Para o tratamento com inóculo constante, as coletas foram

realizadas aos 3, 5, 7 e 10 dias após a inoculação. As coletas em fruto de laranja foram realizadas aos 2, 4, 9 e 14 dias após inoculação, enquanto aquelas do tratamento meio inerte foram aos 2, 4 e 7 dias da transferência dos ácaros. As coletas para o inóculo constante foram feitas apenas até 10 dias devido à rápida oxidação das folhas de clerodendrum, impedindo o desenvolvimento dos ácaros por períodos maiores de tempo.



Figura 2. Folhas de coração-sangrento (*Clerodendrum x speciosum*) com sintomas de manchas cloróticas e necróticas do CICSV.

2.4 Comparação da quantidade de CiLV-C e VTBs nucleares no ácaro vetor e nas plantas hospedeiras

B. phoenicis foram colocados para se alimentar em inóculo de clerodendrum, café e citros, respectivamente folhas com sintomas visíveis de CICSV, CoRSV e CiLV-C, por um período de 72 horas, conforme metodologia descrita nos itens anteriores. Após esse período, três amostras, contendo 10 ácaros, foram coletadas de cada fonte de inóculo para análise do título viral por RT-qPCR. Folhas com

sintomas bastante evidentes, para as três viroses, foram coletadas de plantas mantidas em casa de vegetação para posterior análise por RT-qPCR (controles positivos).



Figura 3. Folhas de café com sintomas de CoRSV.

2.5 Extração de RNA total de *Brevipalpus phoenicis*

Os ácaros coletados, em todos os experimentos, foram colocados em microtubos de 1,5 mL do tipo “eppendorf” e congelados no freezer -80 °C por 15 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C para que os ácaros se concentrassem no fundo dos tubos. Estes foram macerados com bastão de vidro e adicionados de 50 µL do tampão CTAB (com 0,5% de β-mercaptoetanol). Após agitação no vortex as amostras foram incubadas em banho-maria por 15 minutos a 55 °C. Adicionou-se então 150 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), as amostras foram agitadas no vortex e centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A fase aquosa (sobrenadante) foi removida e transferida para

um novo tubo, onde foi repetida a limpeza com clorofórmio: álcool isoamílico. O RNA das amostras foi precipitado adicionando-se 1/10 de acetato de amônio 7,5M e 1 volume de isopropanol 100%. Após inversão dos tubos, as amostras foram mantidas em freezer -20°C por 15 minutos. Procedeu-se nova centrifugação por 5 minutos a 12.000 (4°C) e o sobrenadante foi descartado com a pipeta. Adicionou-se 150 μL de etanol 70% com água DEPC e centrifugou-se por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado com a pipeta e o pellet foi seco no liofilizador. O pellet foi ressuscitado em 5 μL de água DEPC autoclavada e as amostras armazenadas em freezer -80°C .

2.6 Extração de RNA total de plantas

A extração de RNA foi a partir de 100 mg de folhas ou casca de frutos previamente lavados com H_2O estéril, com ou sem sintomas, dependendo do tratamento/experimento, conforme descrito na metodologia.

O RNA total foi extraído de 100 mg de uma amostra composta de três folhas (três repetições) de cada tratamento, que foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino diretamente em tubos plásticos (eppendorfs) de 1,5 mL. Após a maceração, adicionou-se 1 mL de Trizol (Invitrogen Life Technologies) por amostra para a extração do RNA. As amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente, homogeneizadas no vortex e centrifugadas por 10 minutos a 4°C a 12.000 rpm. Depois destas etapas, as amostras foram transferidas para um novo eppendorf, onde foram adicionados 200 μL de clorofórmio. Após homogeneização por inversão, as amostras foram mantidas a

temperatura ambiente por 2 a 3 minutos, centrifugadas por 6 minutos a 4 °C a 12.000 rpm e transferidas novamente para um novo eppendorf, onde se adicionou 500 µL de isopropanol 100%, misturou-se por inversão e deixou-se 10 minutos a temperatura ambiente. Após nova centrifugação por 10 minutos a 4 °C a 12.000 rpm o sobrenadante foi descartado e lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 4 °C a 9.000 rpm e descartado novamente. O pellet foi seco em liofilizador e ressuscitado em 30 µL de água tratada com DEPC (Diethyl pyrocarbonato). Em seguida, as amostras foram tratadas com DNaseI RNase free para eliminar qualquer contaminação por DNA. O RNA total foi quantificado em gel de agarose 1% e em espectrofotômetro a 260 nm e armazenado a uma temperatura de -80 °C.

2.7 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se 5 µL do RNA total extraído de ácaro, folha ou fruto, 1 µL de 2,5mM de dNTP, 1 µL de “random primer” (Invitrogen) e 7,5 µL de H₂O DEPC por amostra. Após a adição destes reagentes, houve desnaturação a 70 °C por 5 minutos, sendo então as amostras imediatamente colocadas no gelo. Em seguida foram acrescentados 4 µL de tampão 5X; 2 µL de dTT 2mM (Invitrogen); 0,5 µL da transcriptase reversa (M-MLV-RT Invitrogen) e 0,5 µL do inibidor RNase (RNase out Invitrogen). A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora e 30 minutos, sendo posteriormente armazenada em freezer -20 °C.

2.8 Desenho, síntese e validação dos primers e sondas

Os desenhos dos primers e sondas do CiLV-C, utilizados para RT-qPCR, foram realizados através do software Primer-Express (Applied Biosystems). Foram utilizados três pares de primers baseados nos genes da possível capa protéica (*p29*), helicase (*Hel*) e proteína de movimento (*MP*), desenhados a partir de ORFs do genoma do CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2006), sendo essa última apenas utilizada para o tratamento a, onde os ácaros foram submetidos a alimentação em inóculo constante. Todas as sondas foram sintetizadas com a marcação MGB FAM, através do Custom TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). As seqüências dos primers e sondas utilizadas para a quantificação do CiLV-C estão descritas na Tabela 1.

Para CoRSV e CICSV foram utilizados, respectivamente, primers gentilmente cedidos por Eliane Locali-Fabris e Karen Kubo (Laboratório de Biotecnologia do CAPTACSM), desenhados com base nos putativos genes da replicase (*Rep*) e polimerase (*Pol*). As seqüências desses primers não estão disponíveis, porque fazem parte de trabalhos desenvolvidos no Laboratório e que ainda não foram publicados. Para esses dois vírus foi utilizado o sistema SYBR Green (Applied Biosystems). Para o experimento de comparação do título viral entre os três VTBs, os primers que amplificam o gene da possível capa protéica (*p29*) foram sintetizados separadamente e sem marcação para ser utilizado com o mesmo sistema de detecção.

Tabela 1. Seqüência de primers e sondas, utilizados nas análises de RT-qPCR

Gene	Seqüência do primer (5'-3')	Seqüência da sonda (marcação FAM)
<i>P29 R</i>	CGGCATATTTTGGGCAGTGTTG	CTCCAACCCATAAAGTTT
<i>P29 F</i>	CCATAAATAAGAAAGCGGCGAAAGC	
<i>Hel R</i>	CAAGATACCCGTTGATGGTTCTGA	ACGGCAATCGACTTCT
<i>Hel F</i>	GCATTAAGCGTCGTTATCCTGATTT	
<i>MP R</i>	TGATTATCATCCTCACTCTTGTCTCGTA	CTTAACCGTCAAGTCAATCG
<i>MP F</i>	ACTCACCCTCCTCTGAATCGT	

2.9 Quantificação do vírus/ construção da curva-padrão

A quantificação absoluta da qPCR foi realizada com base em uma curva-padrão que consistiu em alíquotas de concentrações conhecidas do alvo molecular objeto do estudo. A amplificação e a detecção da curva padrão foram realizadas paralelamente à amplificação das amostras que se quis quantificar, ou seja, na mesma placa do qPCR que estavam as amostras (BUSTIN, 2000).

Nesse trabalho as curvas-padrão foram obtidas apenas para o vírus da leprose dos citros, em função de maiores informações disponíveis para este vírus. As concentrações iniciais das partículas do CiLV-C da seqüência alvo de DNA (Tabela 2) foram inferidas por meio de quantificação absoluta. Para a obtenção da curva-padrão foram utilizadas diluições seriadas (diluição de 100 vezes) de soluções estoques de 10^9 cópias/ μ L de plasmídeos contendo os insertos dos genes avaliados e de concentração conhecida. Foram obtidas cinco diluições para cada gene e as alíquotas de cada diluição foram

armazenadas à -20 °C. Para saber a concentração inicial das soluções-estoque (moléculas/ μL), a conversão para número de transcrito foi realizada de acordo com BERTOLINI et al. (2007), descrita abaixo:

- Peso em Daltons (g/mol) = (tamanho do plasmídeo + inserto) (330 Da x 2 nucleotídeos/bp).

Ex: 3.929 (tamanho do plasmídeo pCR® 2.1 em pb) + 849 (tamanho do inserto da *Hel* em pb) x 660 = 3.153.480 g/mol

- g/molécula = número de cópias = g/mol/número de Avogrado (6.02214199 x 10²³)

Ex: 3153480/6.02214199 x 10²³ = 5.2383389 x 10⁻¹⁸ g/molécula

- Conhecendo o número de cópias para o plasmídeo e a concentração do DNA plasmidial que é adicionada em cada reação de PCR, o número de moléculas na reação é determinada pela concentração do plasmídeo (g/ μL)/gramas/moléculas.

Ex: 50 x 10⁻⁹ g/ μL */5.2383389 x 10⁻¹⁸ g/molécula = 9.54 x 10⁹

*concentração da solução contendo plasmídeo pCR® 2.1 (Invitrogen) que apresenta o gene da Helicase clonado, inferida em gel de agarose e/ou espectrofotômetro (Tabela 2).

Informações sobre os plasmídeos, tamanhos dos insertos e as concentrações são detalhadas na Tabela 2. As curvas-padrão foram obtidas por meio de quantificação absoluta, utilizando o ABI PRISM 7000 *Sequence Detector System* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas a um volume de 20 μL , contendo 1 μL da soluções de plasmídeos, 1 μL do assay (sonda mais primers), 8 μL de H₂O e 10 μL de Mix Taqman. As condições térmicas da RT-qPCR foram 50 °C

por 2 min, 94 °C por 10 min e 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C, cada ciclo, sendo a duração da reação de 1h e 50 min aproximadamente.

Tabela 2. Vetor (plasmídeo) utilizado, tamanho do inserto e concentração inicial das soluções estoque

Gene	Plasmídeo	Tamanho do plasmídeo	Tamanho do inserto	Concentração inicial
<i>Hel</i>	pCR® 2.1	3929 pb	849pb	9.54 x 10 ⁹ g/mol
<i>MP</i>	pCR® 2.1	3929 pb	891pb	5.87 x 10 ⁹ g/mol
<i>p29</i>	pCR® 2.1	3929 pb	789pb	9.67 x 10 ⁹ g/mol

2.10 RT-qPCR

A análise do título do CiLV-C foi realizada através de quantificação absoluta pelo sistema TaqMan (Applied Biosystems) utilizando o ABI PRISM 7000 *Sequence Detector System* (Applied Biosystems), exceto para o experimento de comparação entre os três VTBs, quando foi utilizada quantificação relativa com o sistema SYBR Green (Applied Biosystems). As condições térmicas da RT-qPCR foram as mesmas para a obtenção das curvas-padrão citadas acima no item 2.9. Para o sistema TaqMan as reações foram realizadas em duplicatas, utilizando sempre controle sem cDNA chamado de branco para detectar possíveis contaminações. Para cada reação foram utilizados 1 µL de cDNA; 10 µL de Mix TaqMan (Applied Biosystems); 8,4 µL de água Mili-Q; 0,6 µL de cada primer mais sonda para um volume final de 20 µL. Em cada placa realizada a curva-padrão foi colocada, sendo referente ao gene proposto.

Para todas as reações de quantificação do CiCSV e CoRSV, tanto em folhas quanto em ácaros, foi utilizado o sistema SYBR Green

utilizando o ABI PRISM 7000 *Sequence Detector System* (Applied Biosystems), em função da disponibilidade no laboratório de primers desses vírus (conforme mencionado em item anterior). Como controle endógeno na quantificação relativa da expressão dos genes de CICSV e CoRSV foi utilizado o gene β -*tubulina* para as amostras de planta, de expressão constitutiva, visando normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNA, e como controle endógeno para amostras de ácaros foi utilizado o gene mitocondrial *COI* (citocromo oxidase subunidade I), encontrado em espécies de *Brevipalpus phoenicis*, *B. obovatus* e *B. californicus* (GROOT & BREEUWER 2006). As sequências destes primers são apresentadas na Tabela 3.

Para as reações com o sistema SYBR Green as mesmas foram realizadas em triplicatas, utilizando também controle sem cDNA para detectar possíveis contaminações. Para cada reação foram utilizados 2 μ L de cDNA; 12,5 μ L de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems); 8,5 μ L de água Mili-Q; 1,0 μ L de cada primer para um volume final de 25 μ L. As condições térmicas da RT-qPCR foram as mesmas citadas no item 2.9. Para todas as reações de quantificação relativa utilizando o sistema SYBR Green foi realizada uma curva de dissociação para verificação de ampliações inespecíficas decorrentes de possíveis contaminações, conforme instruções do fabricante. Para normalização foi usada a seguinte equação: $\Delta Ct = Ct$ (gene alvo) – Ct (controle endógeno). O aumento dos níveis de expressão do gene alvo para cada condição foi calculado através da equação: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (amostra) - ΔCt (calibrador). Como calibrador foi utilizado o valor obtido para uma amostra específica, como por

exemplo, o controle sem a presença de vírus nas respectivas plantas e ácaros. A quantificação relativa foi realizada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 3. Sequência dos primers utilizados como controle endógeno para a quantificação relativa com o sistema SYBR Green

Controle endógeno	Sequência (5'– 3')
<i>β-tubulina</i>	R: TCACCCTCCTGAACATTTCC F: TTTGTGACATCCCTCCGACT
<i>COI</i>	R: TACAGCTCCTATAGATAAAAC F: TGATTTTTTGGTACACCAGAAG

3 RESULTADOS

A Figura 4 mostra a reação (CT x Log de moléculas) para a equação da curva-padrão e coeficiente de regressão para os genes do CiLV-C *p29*, *MP* e *Hel*, calculados no programa Excell (Microsoft Office, 2003) para os genes estudados.

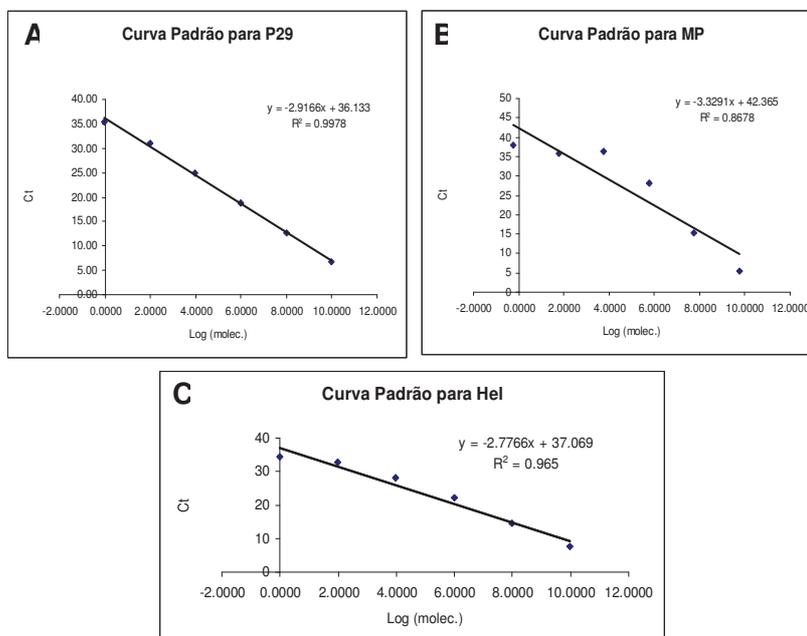


Figura 4. Quantidade inicial de vírus e a eficiência da reação (CT x Log de moléculas), equação da curva-padrão e coeficiente de regressão para todos os genes estudados.

3.1 Quantificação do CiLV-C no ácaro vetor

Analisando a expressão dos genes que codificam para as putativas proteínas da helicase (*Hel*) (Figura 5) e do capsídeo (*P29*) (Figura 6), aparentemente não houve aumento do título do CiLV-C nos ácaros submetidos à alimentação constante em fruto de laranja Pêra sintomático para leprose por um período de 28 dias. Por outro lado, há indícios de que houve uma pequena redução de partículas virais em ácaros mantidos em frutos de limão Cravo, após os mesmos terem sido submetidos à aquisição viral em inóculo por dois dias. O mesmo foi observado para os ácaros virulíferos transferidos para meio

inerte e folhas de clerodendrum (Figura 6 E). Entretanto, esses resultados são apresentados em função dos amplicons observados nas reações de RT-PCR e seus respectivos Cts e são discutidos qualitativamente, uma vez que apesar dessa aparente redução de partículas do vírus, as mesmas não foram estatisticamente significativas (*dados não apresentados*). Isso possivelmente deve-se ao fato de ter sido observada uma grande variação no número de partículas entre repetições biológicas de um mesmo tratamento.

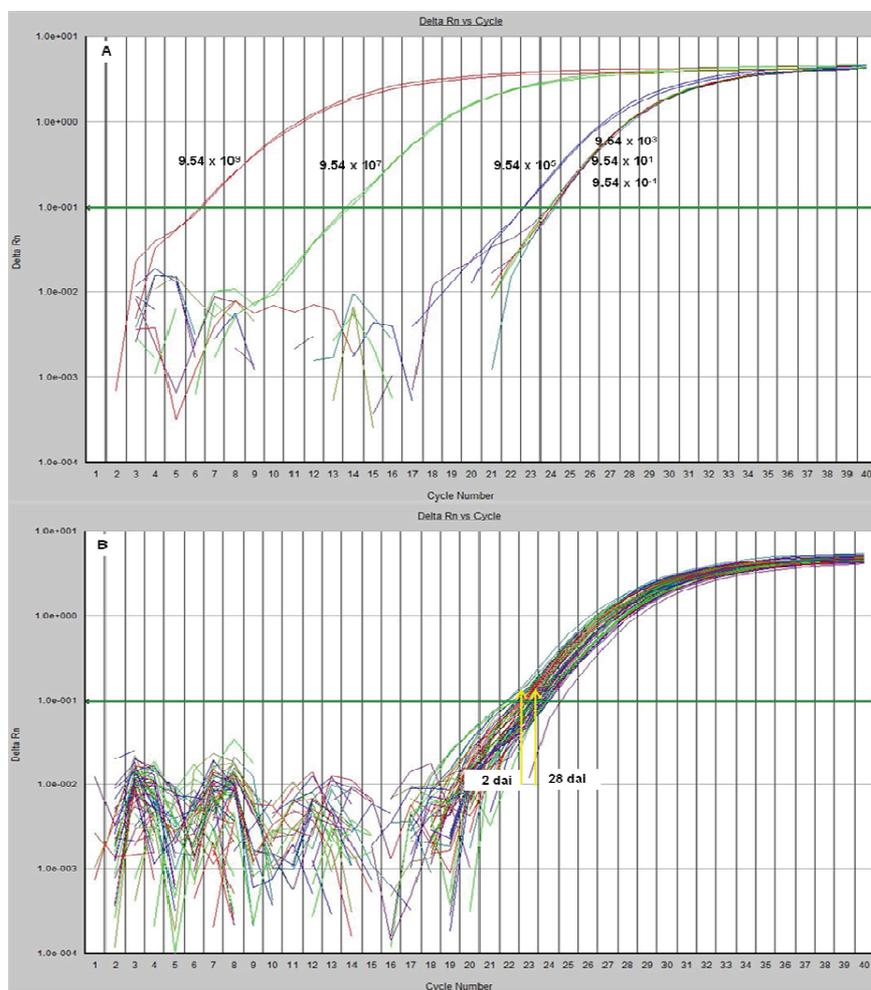


Figura 5. (A) Amplicons gerados pela análise da expressão do gene *Hel*, curva padrão. (B) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene *Hel* em ácaros submetidos à aquisição constante do vírus da leprose dos citros em folhas de laranja com sintomas.

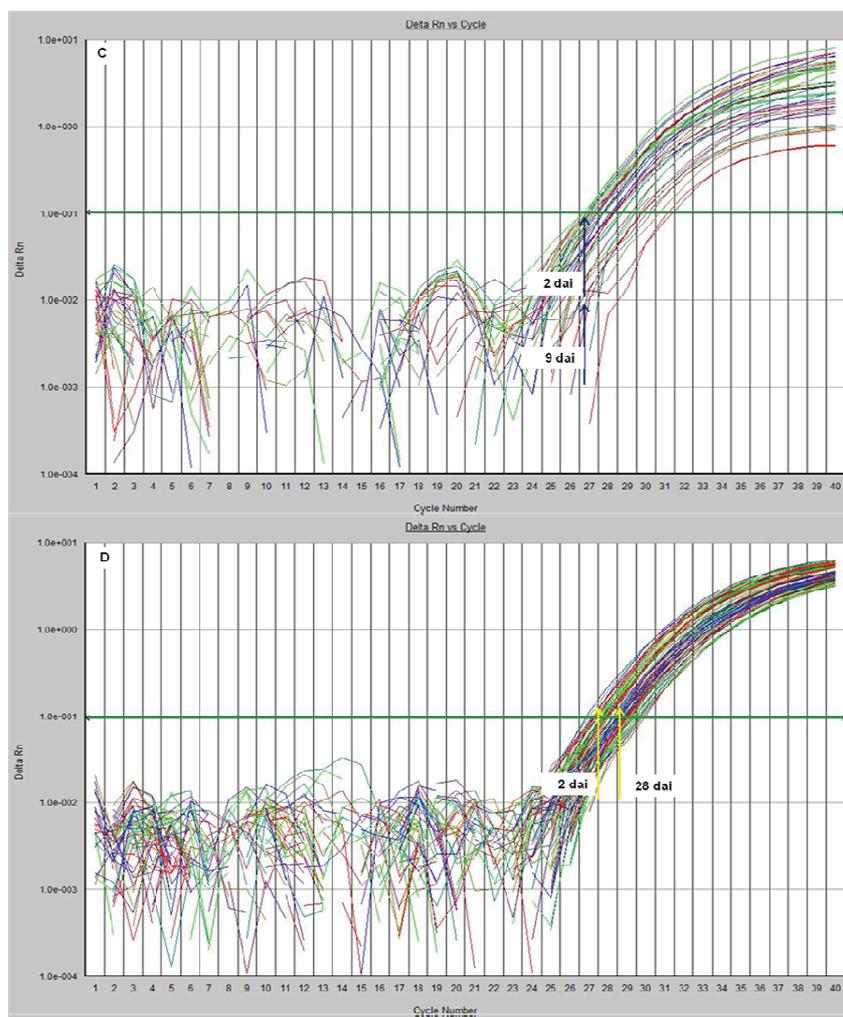


Figura 5. (C) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene *Hel* no tratamento em meio inerte após os ácaros serem submetidos a um período de 2 dias de aquisição do CiLV-C e (D) em fruto de limão Cravo. DAI=dias após inoculação.

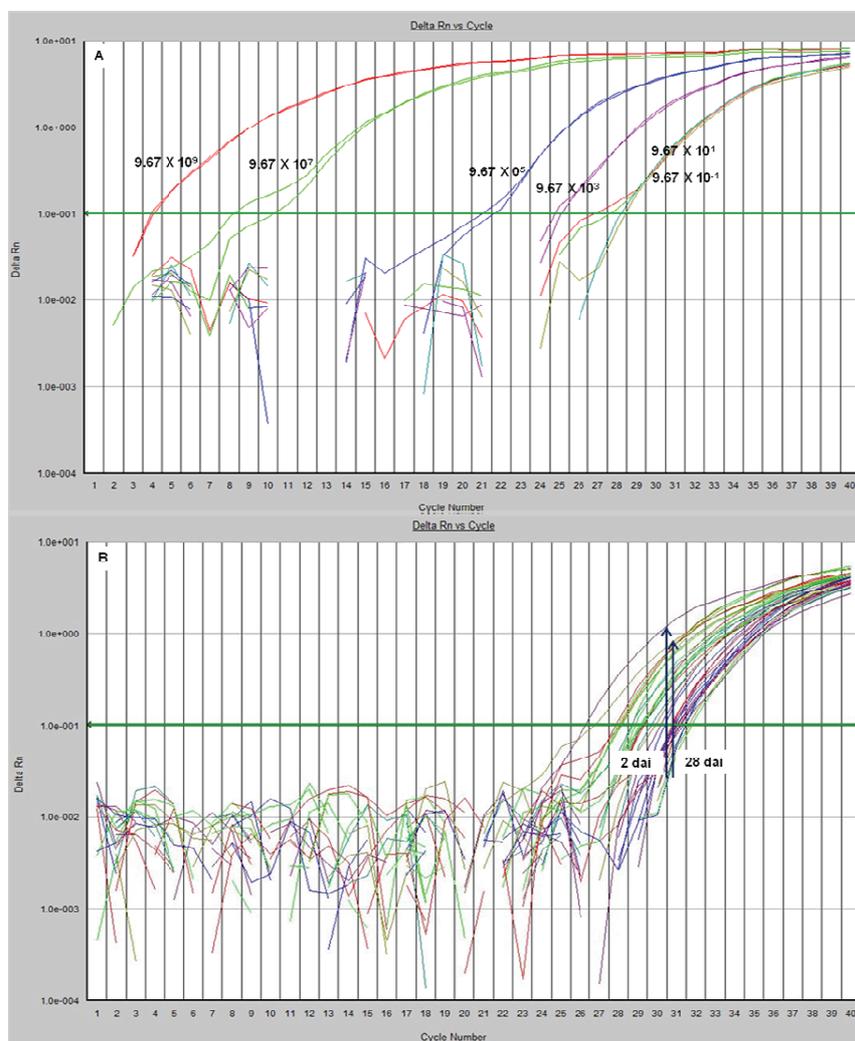


Figura 6. (A) Amplicons gerados pela análise da expressão do gene *p29*, curva padrão. (B) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene *p29* em ácaros submetidos à aquisição constante do vírus da leprose dos citros em folhas de laranja com sintomas.

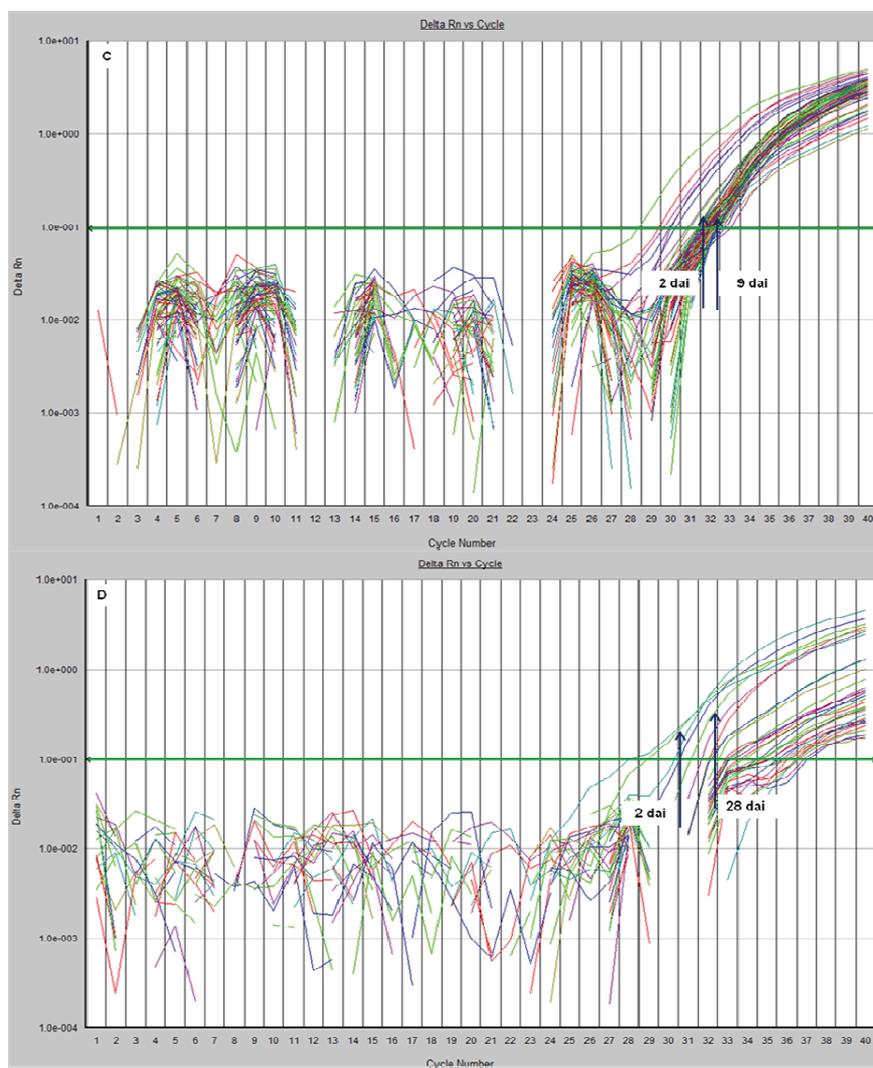


Figura 6. (C) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene *p29* em tratamento de meio inerte após ácaros serem submetidos a um período de 2 dias de aquisição do CiLV-C e (D) em fruto de limão Cravo. **DAI**=dias após inoculação.

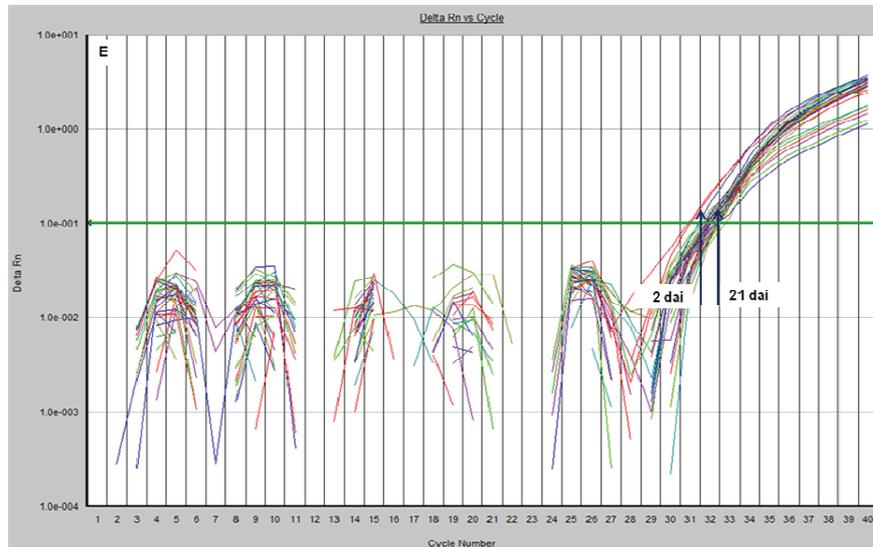


Figura 6. (E) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão do gene *p29* em folhas de clerodendrum após ácaros serem submetidos a um período de 2 dias de aquisição do CiLV-C. **DAI**=dias após inoculação.

3.2 Quantificação do CICSV no ácaro vetor

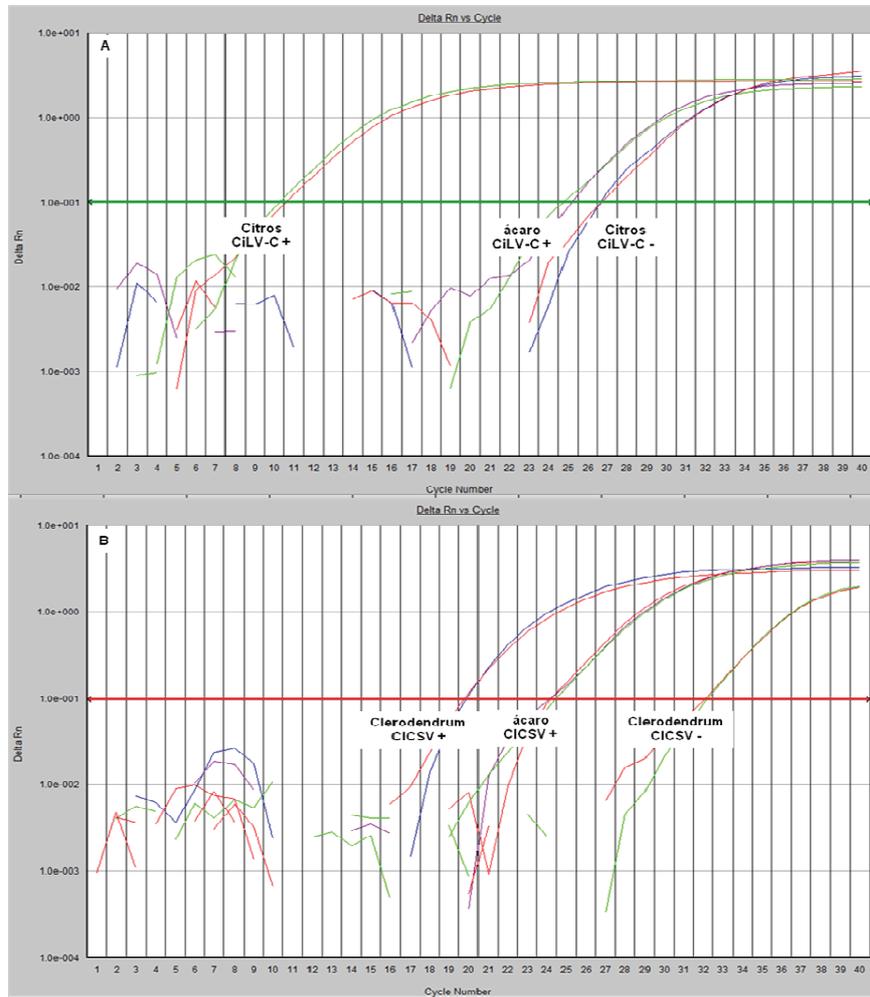
Para o experimento de aquisição e inoculação do CICSV em folhas de clerodendrum os dados não foram consistentes (*dados não mostrados*), provavelmente devido ao tamanho diminuto das lesões foliares de clerodendrum que serviram como fonte de inóculo (Figura 2), dificultando a aquisição do vírus pelos ácaros e também pelo fato das folhas de clerodendrum oxidarem muito rápido quando destacadas da planta, necessitando de troca constante da fonte de inóculo, inviabilizando desta maneira um maior número de coletas.

3.3 Comparação da quantidade de CiLV-C e VTBs nucleares no ácaro vetor

Nas análises de quantificação relativa as curvas de dissociação para cada primer avaliado apresentaram um único pico de amplificação, confirmando a existência de apenas um amplicon e, conseqüentemente demonstrando que o valor da expressão gênica dos genes avaliados foi realmente devido às suas expressões na presença do vírus analisado e não de amplificações inespecíficas ou contaminações.

Os resultados obtidos na comparação entre diferentes VTBs evidenciam, consistentemente, que a diferença em Cts entre os títulos dos VTBs nucleares (CiCSV e CoRSV) obtidos em plantas sintomáticas e no vetor virulífero é significativamente menor que aquela observada no VTB citoplasmático (CiLV-C) (Figura 7). Enquanto na situação A o Ct do controle negativo (planta de citros sadia) foi 26, o de ácaros virulíferos para CiLV-C foi 25 e o de citros sintomáticos, 10, ou seja, a diferença entre ácaros e planta com vírus foi de 15 Cts, enquanto entre ácaros virulíferos e planta sadia foi de apenas 1 Ct. Por outro lado, em clerodendrum a diferença entre ácaros e planta com CiCSV foi de 4 Cts, enquanto entre ácaros virulíferos e planta de clerodendrum sadia (controle negativo) foi de 8 (Figura 7 B). Resultados ainda mais evidentes foram observados para CoRSV, sendo que ácaros e plantas de café com o vírus apresentaram praticamente o mesmo Ct (24 e 23, respectivamente), enquanto plantas sadias de café (controle negativo) apresentaram Ct em torno de 28 (Figura 7 C). Estes resultados podem ser melhor visualizados na Figura 8 pois mostra a expressão dos genes *p29-CiLV*, *CiCSV-Pol* e

CoRSV-*Rep* respectivamente em plantas de citros, clerodendrum e café e ácaros, sendo que a expressão em plantas de citros sintomáticas para o CiLV foi maior quando comparada com os VTBs-N. Em relação aos ácaros, pode-se observar na Figura 8, a expressão de todos os genes foi muito baixa.



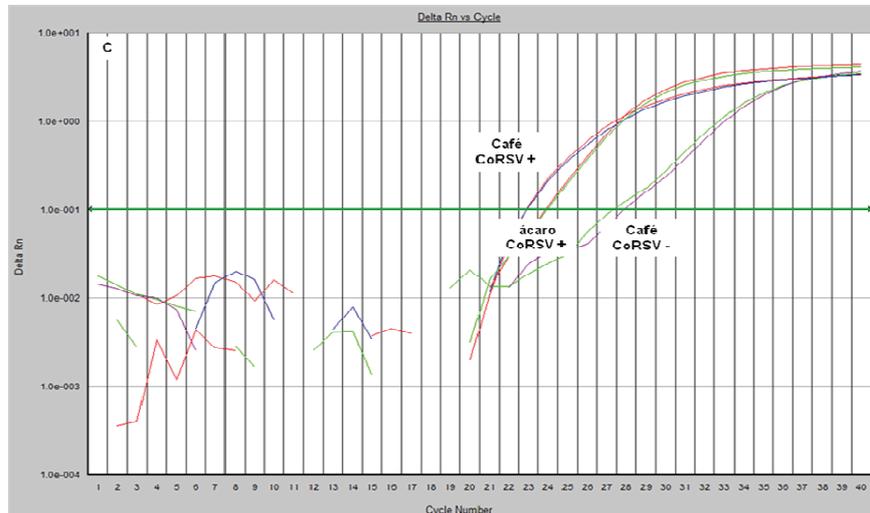


Figura 7. (A) Cinética de amplificação gerada pela análise da expressão dos genes *p29* de CiLV-C em plantas de laranja Pêra com sintomas de leprose e ácaros virulíferos; (B) gene *Pol* do CICSV em plantas de clerodendrum com mancha clorótica e ácaros virulíferos; (C) gene *Rep* de CoRSV em plantas de café com sintomas de mancha anular e ácaros virulíferos. Os controles negativos foram plantas de citros, clerodendrum e café sadia.

Para os dados de quantificação relativa obtidos através do RT-qPCR utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ programa Excel (Microsoft Office, 2003) para os genes virais estudados, encontrou-se o seguinte resultado para planta e ácaro respectivamente, para CiLV-C: 216.799 e 140; para CICSV: 52.245 e 286 e para CoRSV: 10.219 e 29 partículas. Em proporção, os resultados indicam que para cada 200 partículas virais de CICSV encontradas na planta, uma é encontrada no ácaro vetor, já para o CoRSV em cada 400 partículas na planta uma é encontrada no ácaro e para o CiLV esta relação aumenta para 2000

partículas na planta em relação a uma no ácaro, dados que são mostrados na Figura 8.

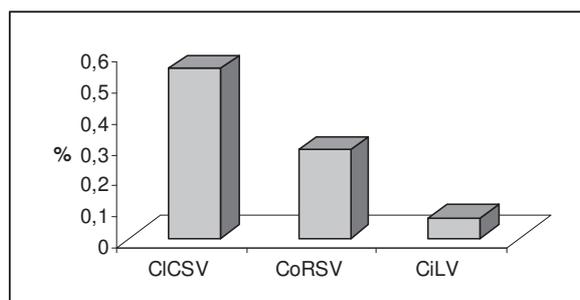


Figura 8. Proporção (%) entre o título viral no ácaro e nas plantas de clerodendrum, café e citros.

4 DISCUSSÃO

As análises das expressões dos três genes do CiLV-C por RT-qPCR estudados sugerem que aparentemente não há aumento do título viral em ácaros após um período de aquisição constante de dois dias, seguido por até 26 dias de vida do vetor, ao contrário do esperado em interações do tipo propagativa. É válido salientar que esses resultados só podem ser discutidos qualitativamente, uma vez que o número de partículas detectadas ficou muito próximo do limite de detecção do teste (ao redor de 100 partículas) e, ainda, foi observada uma grande variação no título viral entre as repetições biológicas de um mesmo tratamento. Uma hipótese que explicaria esta variação é o número elevado de variáveis difíceis de serem eliminadas do experimento, como a movimentação dos ácaros sobre o meio disponível (folhas ou frutos), o período efetivo de alimentação e conseqüente aquisição e inoculação do vírus, a idade e capacidade metabólica dos ácaros e também fatores ambientais, como o estresse sofrido no momento da

transferência dos ácaros e seu confinamento a uma área restrita. O alto nível de estresse foi constatado através do alto índice de ácaros mortos na cola entomológica e no algodão usado para manter a folha do inóculo umedecida (*dados não mostrados*). Esses fatores não podem ser mensurados adequadamente, mas devem desempenhar importante papel na variação apresentada nos resultados.

É sabido que a grande maioria dos vírus que infectam plantas depende quase que exclusivamente de seus vetores para a disseminação. MOURY et al. (2007), estudando a competição na transmissão por afídeos entre duas variantes do vírus Y da batata (*Potato virus Y – PVY*), sendo uma não infecciosa, mas igualmente transmitida pelos afídeos, analisaram esta competição para obter o tamanho estimado da população viral durante a transmissão, levando em consideração dois importantes parâmetros epidemiológicos, o número de partículas virais requeridas para infectar uma planta e o número de picadas de prova feitas pelo afídeo para adquirir e inocular as partículas virais. Os autores constataram que um afídeo transmite em média 0,5 - 3,2 partículas virais por picada, o que é extremamente baixo quando comparado à população viral dentro da planta. No patossistema leprose dos citros, o número de partículas virais transmitidas pelo *B. phoenicis* também parece ter sido baixo, além de vários fatores citados anteriormente como o estresse do ácaro pelo manuseio dos mesmos, período efetivo de alimentação, aquisição e posterior inoculação do vírus, fatores ambientais, etc. As partículas virais são contidas no sítio de infecção e não sistêmica como ocorre com a maioria das doenças causadas por vírus, sendo que desta maneira a aquisição e a transmissão do vírus pelo ácaro podem estar

sendo prejudicadas juntamente com o fato da dificuldade de translocação e replicação viral no interior das células da planta e do ácaro. MICHELOTTO & BUSOLI (2007), observaram que a transmissão do vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro por pulgões depende da quantidade de vírus adquirida e da eficiência de inoculação do mesmo.

Embora esses resultados possam apenas ser discutidos qualitativamente eles reforçam a hipótese de que não há propagação do vírus dentro do vetor, embora até o presente momento a interação vírus-vetor no patossistema leprose dos citros era sugerida como sendo do tipo persistente-propagativa (RODRIGUES, 2000; RODRIGUES et al., 2003), há indícios que questionam esta hipótese.

As evidências de que a interação seria do tipo persistente-propagativa foram baseadas principalmente em estudos biológicos. Sabe-se que as relações persistentes propagativas são caracterizadas por longos períodos de latência, e em alguns casos com aquisição do vírus num estágio de desenvolvimento do vetor e inoculação em outro estágio, como por exemplo, apenas as larvas de tripes são capazes de adquirir tospovirus, enquanto os adultos os transmitem. (HULL, 2002). Já no patossistema leprose, todas as fases ativas do ácaro são capazes de adquirir e transmitir o vírus, a partir de períodos de inoculação curtos como 1 a 2 horas (FARIA et al., 2008, FREITAS et al., 2008). Outra informação importante que reforça essa teoria é que na interação CiLV-C/*B. phoenicis* não ocorre transmissão transovariana do vírus pelo ácaro vetor (BOARETTO et al., 1993; NOVELLI et al., 2005), embora há relatos antigos, não confirmados, da passagem vertical do vírus para a progênie de *B. obovatus* e *B.*

californicus (KNORR, 1968). Esses resultados não excluem totalmente a possibilidade de que a relação vírus-vetor seja do tipo propagativa, mas certamente sugerem que o vírus apenas circule no vetor sem se replicar no interior do mesmo. A Tabela 4 ilustra algumas das principais características associadas aos quatro tipos de interação vírus-vetor.

Tabela 4. Principais características associadas aos quatro tipos de interação vírus-vetor

Tipo de transmissão	Tempo de aquisição	Tempo de retenção	Passagem transtadial	Período de latência	Replicação no vetor	Transmissão transovariana
Não-persistente	Seg. a min.	Min.	Não	Não	Não	Não
Semi-persistente	Min. a horas	Horas	Não	Não	Não	Não
Persistente/circulativa	Horas a dias	Dias a semanas	Sim	Horas a dias	Não	Não
Persistente/propagativa	Horas a dias	Semanas a meses	Sim	Semanas	Sim	Frequente

Adaptado de HULL (2002)

Poucas informações são encontradas na literatura sobre as interações VTBs-vetor, mesmo para o patossistema leprose dos citros, que é uma das principais doenças virais da citricultura e, sem dúvida, a de maior importância econômica dentre as viroses transmitidas por espécies de *Brevipalpus*. Entretanto, para muitas das viroses transmitidas por pulgões, as interações são amplamente estudadas (BALAJI et al, 2003, OLMOS et al., 2005; BERTOLINI et al., 2008;

MICHELOTTO & BUSOLI, 2007; MOURY et al., 2007) e com isso servem de modelo para outros patossistemas.

MICHELOTTO & BUSOLI (2007) demonstraram que a transmissão do vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro diminui após transferências sucessivas de pulgões virulíferos para plantas sadias, indicando tratar-se de uma relação do tipo circulativa, uma vez que o vetor perde sua infectividade após alguns dias longe da fonte de inóculo. Apesar de ter sido sugerido que uma vez adquirido o CiLV-C, o vetor continua virulífero por toda a sua vida (CHIAVEGATO, 1986; BOARETTO et al., 1993; RODRIGUES, 2000), estes resultados foram concluídos apenas com base em estudos biológicos e de transmissão, utilizando como hospedeiros intermediários plantas de citros assintomáticas, sem considerar a possibilidade de constante inoculação e re-aquisição das partículas virais por parte dos ácaros. Essa possibilidade não apenas existe, como já foi demonstrada para um isolado do CiLV-C mantido por anos em plantas de feijoeiro (GROOT et al., 2006).

Por outro lado, cortes ultrafinos de 300 ácaros virulíferos para CiLV-C foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão e evidenciaram a presença de raras partículas virais em poucos indivíduos e a ausência de viroplasmas (E.W. Kitajima, *comunicação pessoal*). O contrário acontece para *B. phoenicis* virulíferos para CoRSV, CICSV e CiLV-N, todos eles VTBs nucleares, onde foi possível observar viroplasmas tanto no núcleo quanto no citoplasma de células das glândulas prossomais dos ácaros, sugerindo que há replicação destes vírus no interior do ácaro (KITAJIMA et al., 2007).

Assim, a quantificação do CICSV em ácaros vetores submetidos a diferentes tempos de alimentação e em diferentes substratos, seria de fundamental importância para complementar as observações de microscopia eletrônica, porém os resultados obtidos nas análises com esse vírus foram bastante inconsistentes. Um fato observado que pode ter influenciado nesses resultados além do tipo de lesão (pequenos pontos necróticos) foi a baixa durabilidade das folhas utilizadas como fonte de inóculo, que pode ter interferido negativamente nos resultados, pois quando destacadas da planta permanecem viáveis apenas por alguns dias, sendo necessário a troca constante da fonte de inóculo. Esse excessivo manuseio dos ácaros colabora para o aumento no nível de estresse dos indivíduos, adicionando mais variáveis ao sistema, que podem resultar em maior inconsistência dos resultados. Desta maneira o experimento com clerodendrum precisa ser repetido em outra oportunidade, sendo sugerido trabalhar com folhas não destacadas na planta.

É interessante notar que quando são comparados os títulos de CoRSV, CICSV e CiLV-C em plantas e ácaros há uma nítida diferença na proporção do título viral dos VTBs nucleares (VTBs-N) e do CiLV-C com relação aos diferentes hospedeiros. Ou seja, a diferença do título dos VTBs-N em planta ou no vetor é significativamente menor que aquela observada para o CiLV-C. Além disso, diferentemente do que ocorre para o CoRSV e o CICSV, o título do CiLV-C em ácaros virulíferos é sempre muito próximo do limite de detecção do método e do Ct observado para o controle negativo. Esses resultados corroboram aqueles obtidos por KITAJIMA et al. (2007),

que indicam que os VTBs-N se replicam no interior do ácaro, enquanto os citoplasmáticos apenas circulam no vetor.

Sabe-se que existem componentes ou receptores envolvidos na interação dos vírus com os seus vetores, por exemplo, para o vírus do mosaico da couve-flor (*Cauliflower mosaic virus* - CaMV), foi demonstrado o primeiro receptor específico para um vírus não-circulativo e o seu afídeo vetor, uma proteína essencial para a transmissão vetorial que está presente na matriz de quitina do estilete do vetor (HOHN 2007). No caso de *B. phoenicis* não há relatos sobre isso, mas algo semelhante pode acontecer e o ácaro apresentar um determinado número de receptores necessários para aquisição e transmissão do vírus.

O RT-qPCR utilizando o sistema TaqMan foi aplicado por exemplo com sucesso para detecção e estimativa do número de partículas virais de *Plum pox virus* (PPV) em uma transmissão viral não-circulativa, não-persistente (OLMOS et al., 2005). A sensibilidade do RT-qPCR foi 100x maior que aquela observada para nested-PCR e permitiu estimar o número de partículas virais no afídeo, em torno de 40 a 2000 partículas. Em outro ensaio, dessa vez com o vírus do nanismo amarelo da cevada (*Barley yellow dwarf virus* – BYDV), que apresenta relação circulativa com seu hospedeiro, o número de partículas virais no afídeo foi de 6.4×10^6 , ou seja, 3000x maior que a estimativa para PPV (BALAJI et al., 2003).

Para OLMOS et al. (2005), a variabilidade no número de partículas detectadas depois do tempo de aquisição do vírus, pode não ser de fato o tempo real de alimentação e/ou o volume ingerido pelos afídeos. A porcentagem de amplificação do PPV por RT-qPCR no

número total de afídeos testados depois de diferentes períodos de aquisição foi de 22% para *Myzus persicae* e 30% para *Aphis nerii*. Somente parte do número total de afídeos submetidos a diferentes períodos de alimentação, de 5 min a 2 horas, adquiriram níveis detectáveis de PPV. Os resultados sugerem que nem todos os afídeos se alimentaram no local da folha infectada que possuía partículas virais na célula, uma vez que é conhecida a distribuição desigual de vírus em tecidos infectados. Algo semelhante pode ocorrer no patossistema leprose, pois se trata de uma doença viral restrita ao sítio de infecção (lesão local), sendo ainda mais desigual a distribuição do vírus nas células da planta infectada quando comparada a uma doença onde a distribuição do vírus é sistêmica e é importante também levar em consideração que não se pode ter um controle, por exemplo, se todos os ácaros se alimentaram e quantas vezes eles se alimentaram.

Em quantificação através do RT-qPCR do vírus da tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus* – CTV) no seu afídeo vetor (*Aphis gossypii*) após períodos de acesso de alimentação (PAA) de 1, 24 e 48 horas em folhas sintomáticas, BERTOLINI et al. (2007) verificaram que ao final do PAA de 1 hora, partículas de CTV foram detectadas em 4 dos 40 afídeos analisados (10%). Após 24 horas de PAA, foi possível detectar CTV em 8 dos 40 afídeos analisados (20%) e depois de 48 horas, em 17 dos 49 afídeos analisados, ou 34,7%. É interessante notar que, mesmo ao se trabalhar com vírus sistêmicos eficientemente transmitidos por seus vetores, como o CTV, esse tipo de estudo apresenta, de maneira inerente, elevada variação entre repetições, o que pode ser observado através das análises estatísticas, uma vez que só foram encontradas diferenças significativas entre 1 e

48 horas, e não entre os PAA intermediários (BERTOLINI et al., 2008). Os autores estimaram também através do RT-qPCR o número de partículas virais adquiridas pelos afídeos sendo 8,379 cópias de CTV no período de 1 hora, 35,922 em 24 horas e 38,280 cópias de CTV em 48 horas. Sendo que as diferenças na detecção de cópias de CTV observadas nos diferentes períodos de acesso podem contribuir para o entendimento do mecanismo de transmissão (BERTOLINI et al., 2008).

Partículas virais do vira-cabeça do tomateiro (*Tomato spotted wilt virus* – TSWV), encontradas nas glândulas salivares e em outros tecidos do seu vetor, o trips *Frankliniella occidentalis*, e observações no tempo de aquisição e período latente, demonstraram que o TSWV se multiplica no vetor. Os autores observaram que larvas de *F. occidentalis* após se alimentarem por um período de dois dias em plantas infectadas tiveram aumento nos níveis das proteínas do nucleocapsídeo (N) e uma proteína não estrutural (NSs), ambas codificadas pelo RNA do vírus confirmadas por ELISA e Western blot. O acúmulo destas proteínas e das partículas virais foi confirmado *in situ* por ‘immunolabelling’ nas glândulas salivares e em outros tecidos do seu vetor, demonstrando que as glândulas salivares são um importante sítio de replicação do TSWV e que por este aumento no nível de proteínas e partículas o mesmo replica-se dentro do seu vetor. (Wijkamp et al., 1993 citados por HULL, 2002) o que não foi o caso no nosso trabalho. No Brasil, o vira cabeça do tomateiro é transmitido pelas espécies de tripses, *Frankliniella occidentalis* e *F. Shultzei*, sendo que o vetor somente pode adquirir o vírus na fase de larva, tornando-se posteriormente apto a transmiti-lo por toda a sua vida. Como o

vírus se multiplica dentro do vetor, a transmissão é considerada do tipo circulativa/propagativa (NAGATA et al., 2007).

SANTOS et al. (2003) estudaram a interação do begomovírus *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV) com o seu vetor, a mosca branca *Bemisia tabaci*, sendo esta interação do tipo circulativa não propagativa (BROWN, 1997; MORIN et al., 1999) e constataram que o vetor foi capaz de adquirir o vírus a partir de um PAA de 15 min com o qual transmitiu o vírus para plantas de tomateiro em um percentual médio de 6%. Este percentual aumentou à medida que o PAA dos insetos foi estendido alcançando os 65% quando esse período foi de 24 horas, resultados estes confirmados por *dot blot*. O vírus foi detectado nos quatro estágios ninfais que se desenvolveram em planta infectada com valores crescentes de 15,4 a 70%, do 1º ao 4º ínstar, os resultados de detecção do begomovírus no vetor foram confirmados por *southern blot*. A constatação de períodos curtos (15 min ou 30 min) para aquisição ou transmissão de begomovírus em tomateiro reforçam a importância de *B. tabaci* na rápida disseminação do vírus no campo, evidenciando a maior eficiência na transmissão com o aumento do PAA e um período de latência de 16 h que estão de acordo com a transmissão do tipo circulativa (ROSSELL et al., 1999).

Como pode ser observado, as interações entre vírus-vetor e vetor-planta são extremamente complexas e trabalhos neste sentido comprovam que cada planta, vetor, vírus e cada condição do meio onde se colocam determinam uma situação particular, sendo, muito difícil, isolar um fator sem considerar os demais (CORNUET, 1992). Para que um vírus seja transmitido de modo satisfatório pelo seu vetor, os processos de aquisição e transmissão devem ser efetuados de

maneira eficiente. É importante lembrar que a concentração do vírus no tecido vegetal também pode influenciar a eficiência da aquisição e transmissão das partículas virais pelo vetor.

Desta maneira, sugere-se que o estudo com o patossistema CiLV - *B. phoenicis* precisa ter continuação para melhor entendimento do mesmo e esclarecer possíveis lacunas que ficaram deste trabalho.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições em que a pesquisa foi desenvolvida, os resultados obtidos permitem sugerir que:

- Para a quantificação do CiLV na planta os primers e sondas desenhados para as quatro ORFs (duas no RNA1 e duas no RNA2) foram capazes de detectar grandes concentrações virais em tecido de citros sintomático proveniente de campo.
- Houve diferença significativa na expressão dos diferentes genes avaliados, sendo que nos genes *p29* e *Hel* a expressão foi maior do que nos genes *MP* e *p61* e de maneira geral, *Hel* apresentou maior expressão.
- Os resultados demonstram a complexidade dos mecanismos genéticos envolvidos no patossistema leprose dos citros, por este motivo devem ser considerados preliminares e ser melhor explorados na continuidade do trabalho para confirmar os resultados e hipóteses discutidas.
- Para a quantificação do CiLV no ácaro vetor pode-se observar que não houve um aumento no número de partículas virais nos ácaros submetidos a alimentação constante por um período de 28 dias, ou seja, não houve diferença significativa na

quantidade de vírus detectadas nos ácaros amostrados após 48 horas de aquisição do vírus e nem para o experimento com hospedeiros apenas do ácaro como frutos de limão Cravo e folhas de clerodendrum.

- O experimento com o ClCSV e plantas de clerodendrum deve ser repetido, mas desta vez com folhas não destacadas da planta para evitar a constante troca da fonte de inóculo, bem como o experimento de comparação de título viral entre VTBs nucleares e citoplasmáticos, sendo de extrema importância o conhecimento para auxiliar em práticas de manejo e controle da doença no campo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIACH-MARTI, M.R.; GUERRI, A.; MENDONZA, H. de.; LAIGRET, F.; BALLESTER-OLMOS, J.F.; MORENO, P. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of Citrus tristeza virus. *Phytopathology*, v.90, p.134-138, 2000.

ALTHAUS, R.A., CANTERI, M.G., GIGLIOTI, E.A. Tecnologia da informação aplicada ao agronegócio e ciências ambientais: sistema para análise e separação de médias pelos métodos de Duncan, Tukey e Scott-Knott. *Anais do X Encontro Anual de Iniciação Científica*, Parte 1, Ponta Grossa, p.280-281, 2001.

ALVES, E.B. Dinâmica da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao acaricida dicofol. 2004. 79p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

APPLIED BIOSYSTEMS Disponível no endereço eletrônico: www.appliedbiosystems.com.br, Acesso em 26 de julho de 2006.

ARAYA GONZÁLES, J. Informe sobre la prospección de la leprosis de los cítricos em la zona fronteriza sur (Costa rica – Panamá). Ministério de Agricultura y Ganadería, 2000, 5p.

ATABEKOV, J.G.; TALIANSKY, M.E. Expression of plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Advances in virus research*, v.38, p.201-248, 1990.

BAKER, E.W.; TUTTLE, D.M. The false spiders mites of Mexico (Tenuipalpidae: Acari). Florida: USDA Agricultural Research Service, 237p. (Technical Bulletin, 1706), 1987.

BALAJI, B.; BUCHOLTZ, D.B.; ANDERSON, J.M. Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf virus quantification by real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. *Phytopathology*, v.93, p.1386-1392, 2003.

BASSANEZI, R.B. Aspectos da leprose dos citros. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, p.246-247, 2001. Suplemento.

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

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; ARRIVABEM, F.; MACHADO, M.A. Resposta do tangor Murcott (*Citrus sinensis* L. Osbeck x *C. reticulata* Blanco) à inoculação do vírus da leprose dos citros a campo e em casa de vegetação. *Laranja*, v.25, n.2, p.337-348, 2004.

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

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A.C. de; CRISTOFANI, M.; GUERREIRO FILHO, O.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; ASTÚA-MONGE, G.; MACHADO, M.A. Inheritance and heritability of resistance to citrus leprosis. *Phytopathology*, v.96, n.10, p.1092-1096, 2006b.

BASTIANEL, M.; NICOLINI, F.; RODRIGUES, V.; MEDINA, C.; SEGATTI, N.; FREITAS-ASTÚA, J.; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. Incidência de leprose em variedades de tangerinas e híbridos. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.293, 2007. Suplemento.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; NICOLINI, F.; SEGATTI, N.; NOVELLI, V.M.; RODRIGUES, V.; MEDINA, C.L.; MACHADO, M.A. Response of mandarin cultivars and hybrids to citrus leprosis virus). *Journal of Plant Pathology*, 90(2), p. 305-310, 2008a.

BASTIANEL, M.; CRISTOFANI-YALI, M.; OLIVEIRA, A.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; GARCIA, A.A.F.; RESENDE, M.D.V.; RODRIGUES, V.; MACHADO, M.A. QTL associated to citrus leprosis resistance, 2008b (*submetido*).

BASTIANEL, M.; NOVELLI, M.N.; BASSANEZI, R.B.; KITAJIMA, E.W.; MULLER, G.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Leprose dos citros: distribuição da doença em mais de um século de sua existência. *Fitopatologia Brasileira*, 2008c (*submetido*).

BERTOLINI, E.; MORENO, A.; CAPOTE N.; OLMOS, A.; LUIS, A. DE; VIDAL, E.; PÉREZ-PANADÉS J.; CAMBRA, M. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120:177-188, 2008.

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*, v.5, p.185-196, 1934.

BITANCOURT, A.A. A doença dos citros no Vale do Paraíba. *O Biológico*, v.6, p.268-269, 1940.

BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a leprose dos citros. I. Distribuição geográfica e sintomatologia. II. Transmissão natural às folhas. III. Transmissão natural às frutas. IV. Experiências de tratamento. *O Biológico*, v.22, p.161-231, 1955.

BENNETT, C.W.; COSTA, A.S. Tristeza disease of citrus. *Journal of Agricultural Research*, v.78, p.207-237, 1949.

BHOHM, J.; HAHN, A.; SCHUBERT, R.; BAHNWEG, G.; ADLER, N.; NECHWATAL, J.; OEHLMANN, R., OBWALD, W. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* their respective host plants. *Journal Phytopathology*, v.147, p.409-416, 1999.

BOARETTO, M.A.C.; CHIAVEGATO L.G.; SILVA, C.A.D. Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. *Científica*, v.21, p.245-253, 1993.

BOARI, A.J.; PENNER, G.; FILGUEIRAS, S.B.Q.; FREITAS-ASTUAS, J.; KITAJIMA, E.W. Confirmação da presença da leprose dos citros tipo citoplasmática no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.S207, 2007a. Suplemento.

BOARI, A.J.; MENDONCA, M.C.; FREITAS-ASTUAS, J.; GONCALVES, L.O.; SILVA-MANN, R. Ocorrência da leprose dos

citros no Estado de Sergipe. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p.S207, 2007b. Suplemento.

BOEVINK, P.; OPARKA, K.J. Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiology*, v.138, p.1815–1821, 2005.

BRIOSO, P.S.T.; CUNHA JUNIOR, J.O.; BONIS, M.; MONTANO, H.G.; PIMENTEL, J.P.; FACCINI, J.L.H. Partial characterization of an isolate of citrus leprosis virus and occurrence of leprosis vector predator, in the State of Rio de Janeiro. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, XIV, 1998, Campinas, Anais: IOCV, p.167, 1998.

BROUWER, M.; LIEVENS, B.; VAN HEMLRIJICK, W.; VAN DEN ACKERVEKEN, G.; CAMMUE, B.P.A.; THOMMA, B.P.H.J. Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR. *FEMS Microbiology Letter*, v.228, p.241-248, 2003.

BROWN, J.K. The biology and molecular epidemiology of the Geminiviridae subgroup III. In: STACEY, G.E; KEEN, N.T. (Eds). *Plant Microbe Interactions*, p.125-195, 1997.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.25, p.169-193, 2000. Review.

CHAGAS, C.M.; ROSSETI, V. Transmissão experimental da leprose dos citros por implante de folha no ramo. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, p.211-214, 1980.

CHAGAS, C.M.; ROSSETI, V. Transmission of leprosis symptoms by grafting infected tissue. Conference of the International Organization of Citrus Virologists, v.9, p.70, 1983 (Abstract).

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*, v.30, p.203-213, 2003.

CHAGAS, C.M., COLARICCIO, A. & HAKAKAVA, R. Novos registros da leprose tipo nuclear (CiLV-N): Andradas (MG) e São Roque (SP). *Fitopatologia Brasileira* v.3, p.139-139. 2006. (Resumos).

CHIAVEGATO, L.G. Biologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.21, p.815-816, 1986.

CHIAVEGATO, L.G. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. *Laranja*, v.17, p.229-235, 1996.

CHIAVEGATO, L.G.; MICHAN, M. Comportamento do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em frutos de diferentes variedades cítricas. *Científica*, v.15, p.17-22, 1987.

CHIAVEGATO, L.G.; KHARFAN, P.R. Comportamento do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (G.) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.22, p.355-359, 1993.

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

CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W.; WELBOURN, W.C.; RIVERA, C.; OCHOA, R. *Brevipalpus* como vectores de la leprosis de los cítricos. *Manejo Integrado de Pragas*, Costa Rica, v.60, p.61-65, 2001.

CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. *Experimental and Applied Acarology*, v.30, p.5-28, 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 virus diseases vectored by these mites. *Experimental and Applied Acarology*, v.30, p.29-105, 2003a.

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 and Applied Acarology*, v.30, p.181-202, 2003d.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALLETTI, S.R.; ROSSETTI, V.; COURNET, P. Elementos de Virologia Vegetal. Edicionaes Mundi-Prensa. INRA. Madrid, 1992.

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

COSTA, A.S.; GRANT, T.J.; MOREIRA, S. Investigações sobre a tristeza dos citros II: conceitos e dados sobre a reação das plantas cítricas à tristeza. *Bragantia*, v.9, p.59-80, 1949.

COSTA, A.S. Present status of the tristeza diseases of citrus in South America. *FAO Plant Protection Bulletin*, n.4, p.97-105, 1956.

CZECHOWSKI, T.; BARI, R.P.; STITT, M.; SCHEIBLE, W.R.; UDVARDI, M.K. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root-and shoot-specific genes. *The Plant Journal*, v. 38, p. 366-379, 2004.

DERRICK, P.M.; BARKER, H.; OPARKA, K.J. Increase in plasmodesmatal permeability during cell-to-cell spread of tobacco rattle virus from individually inoculated cells. *Plant Cell*, v.4, p.1405-1412, 1992.

DOI, Y.; ARAI, K.; YORA, K. Distribution of bacilliform virus particles in Lasaki disease and *Cymbidium* ringspot disease. *Annals of Phytopathological Society of Japan*, v.35, p.388, 1969.

DOI, Y.; CHANG, M.U.; YORA, K. Orchid fleck virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, n.183, 1977.

DOMINGUES, A.D.; RODRIGUES, J.C.V. Ocorrência de leprose dos citros em Paraíso do Tocantins (TO). *Laranja*, v.20, p.35-50, 1999.

DOMINGUES, F.S.; BERNAL, A.; CHILDERS, C.C.; KITAJIMA, E.W. First report of citrus leprosis on Panama. *Plant Disease*, v.85, p.228, 2001.

DUARTE, C.A.B. Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em Tempo Real. 2006. 58p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

ESAU, K.; HOEFERT, L.L. Ultraestrutura of sugar beet leaves infected with *Beet western yellows virus*. *J. Strut. Research*, v.40, p.245-251, 1972.

FADEL, A.L.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Prospecção de fontes de resistência à leprose em diferentes genótipos de citros. *Summa Phytopathologica*, v.32, p.S77-S78, 2006a. Suplemento.

FANNIN, F.F.; SHAW, J.G. Evidence for concurrent spread of tobacco mosaic virus from infected epidermal cells to neighboring epidermal and mesophyll cells. *Plant Science*, v.51, p. 305–310, 1987.

FARIA, A.S.; BASTIANEL, M.; MIRANDA, M.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J. Eficiência de transmissão do vírus da leprose dos citros nas diferentes fases ativas do ácaro vetor. *Summa Phytopathologica*, v.34, p.S58, 2008.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B, SPÓSITO, M.B., BELASQUE JR, J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.) In: KIMATI, H; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia, Volume 2, Doenças das Plantas Cultivadas. Editora Agronômica Ceres Ltda. 4ªed, São Paulo, 2005, 663p.

FERREIRA, P.T.O.; FREITAS-ÁSTUA, J.; RODRIGUES, J.C.; KITAJIMA, E.W. Dados preliminares de transmissão mecânica e por ácaros de alguns dos vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae). *Fitopatologia Brasileira*, v.28, p.S250, 2003.

FERREIRA, P.T.O.; BUSO JUNIOR, A.A.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W. Kenaf (*Hibiscus cannabinus*): Hospedeira experimental para os vírus da mancha verde e mancha clorótica do *Hibiscus*. *Summa Phytopathologica*, v.30, p.1-190. 2004.

FERREIRA, P.T.O.; LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; GOMES, R.T.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Caracterização de um vírus baciliforme isolado de *Solanum violaeifolium* transmitido pelos ácaros *Brevipalpus phoenicis* e *B. obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). *Summa Phytopathologica*, v.33, n.3, p.264-269, 2007.

FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control. *ASM Press*, 2000, 804p.

FRANCKI, R.I.B.; KITAJIMA, E.W.; PETERS, D. Rhabdoviruses. In: KURSTAK, E. (ed.) Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis. Amsterdam: *Elsevier*, 1981.

FREEMAN, W.M.; WALKER, S.J.; VRANA, K.E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques, Natick*, v.26, n.1, p.112-125, 1999.

FREITAS-ASTUA, J.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Incidence of orchid viruses in the state of Sao Paulo, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.24, p.125-130, 1999.

FREITAS-ÁSTUA, J.; FERREIRA, P.T.O.; REZENDE, J.A.M.; KITAJIMA, E.W. Partículas baciliformes associadas a manchas verdes e cloróticas em folhas de dama-da-noite (*Cestrum nocturnum* – *Solanaceae*). *Fitopatologia Brasileira*, v.27, p.689, 2002. Suplemento.

FREITAS-ASTÚA, J.; CAVALCANTE, M.J.B.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI, R.; LARANJEIRA, F.; DOMINGUES, A.D.;

MACHADO, M.A. RT-PCR detection of citrus leprosis virus in samples from the Northern region of Brazil. *Virus Reviews & Research*, v.9, p.246-247, 2004a. Suplemento.

FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; BASTIANEL, M.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI, R.; MACHADO, M.A. Identification of citrus leprosis virus-nuclear type (CiLV-N) in sweet orange in the State of Rio Grande do Sul. *Virus Reviews & Research*, v.9, p.247, 2004b. Suplemento.

FREITAS-ÁSTUA, J.; RODRIGUES, V.; LOCALI, E.C.; ÁSTUA-MONGE, G.; FERREIRA, P.T.O.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Transmissão do vírus da mancha anular da dama-da-noite por ácaros *Brevipalpus* spp. *Summa Phytopathologica*, v.30, p.80, 2004c.

FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Further evidence to support that citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. . In: *Annual Meeting of the American Phytopathological Society - Proceedings Caribbean Division*, p.93-93, 2005.

FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; PINHATI-SILVA, A.C.; PALMIERI-BASÍLIO, A.C.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A. Differentially expressed stress-related genes in the compatible citrus-Citrus leprosis virus interaction. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, n.3, p.980-990, 2007a. Suplemento.

FREITAS-ASTÚA, J.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Diagnose e manejo das principais viroses dos citros. Núcleo de estudos em fitopatologia – Universidade Federal de Lavras, p.215-232, 2007b.

FREITAS-ASTÚA, J.; FADEL, A.L.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; MACHADO, M.A. Comportamento diferencial de espécies e híbridos de citros à leprose, 2008b (*submetido*).

FREITAS-ASTUA, J.; NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; KITAJIMA, E.W.; Interações entre o vírus da leprose dos citros e seu vetor *Brevipalpus phoenicis*. *Summa Phytopathologica*, v. 34, p.128-130, 2008a.

FUKUSHI, T. Multiplication of virus in its insect vector. *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, v.1, p.301-303, 1935.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, v.55, p.1445-1454, 2004.

GACHON, C.; SAINDRENAN, P. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.42, p.367-371, 2004.

GARNSEY, S.M.; GONSALVES, D.; PURCIFULL, D.E. Mechanical transmission of Citrus tristeza virus. *Phytopathology*, v.6, p.965-968, 1977.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome*, v.6, p.995-1001, 1996.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: Na emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, v.30, p.503-512, 2002.

GÓMEZ, E.M.; VARGAS, R.C.; RIVADAMEIRA; LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; ASTÚA-MONGE, G.; RODRIGUES, J.C.V.; MESA COBO, N.C.; KITAJIMA, E.W. First report of citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz. *Plant Disease*, v.89, p.686, 2005.

GRAVENA, S. Manual prático – Manejo Ecológico de Pragas dos Citros. Gravena Ltda, Jaboticabal-SP, 2005, 372p.

GROOT, T.V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus phoenicis* transmits Citrus leprosis virus, cytoplasmatic type (CiLV-C) to common bean (*Phaseolus vulgaris*) under experimental conditions. *Virus Reviews & Research*, v.11, n.1, p.67-

68, 2006. Suplemento.

GROOT, T.V.M.; BREEUWER, J.A.J. Cardinium symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species. *Experimental and Applied Acarology*, v.39, p.257-271, 2006.

GUIDOTTI, A.R., RODRIGUES, V., MACHADO, M.A, FREITAS-ASTÚA, J. Avaliação da influência do CiLV-C na capacidade reprodutiva e na longevidade de *Brevipalpus phoenicis*. *Summa Phytopathologica*, v.33, p.S7, 2007. Suplemento.

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

HASHIMOTO, Y.; VALLES, S.M.; STRONG, C.A. Detection and quantitation of *Solenopsis invicta* virus in fire ants by real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, v.140, p.132–139, 2007.

HOHN T. Plant virus transmission from the insect point of view. *PNAS*, v.104, n.46, p.17905-17906, 2007.

HULL, R. Matthews' Plant Virology. Academic Press, New York, 1001p, 2002.

INOUE-NAGATA, A.K.; NAGATA, T. Pulgões, distribuidores de vírus. *Revista Cultivar Hortaliças e Frutas*, n.16, 2002.

KARASEV, A.V. et al. Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology*, v.208, p.511-520, 1995.

KENNEDY, J.S.; VAN IMPE, G.; DANCE, T.H.; LEBRUN, P.H. Demecology of the false spider mite, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). *Journal of Applied Entomology*, v.120, p.493-499, 1996.

KITAJIMA, E.W.; MÜELLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, V. Short rod-like particles associated with citrus leprosis. *Virology*, v.50, p.254-258, 1972.

KITAJIMA, E.W., BLUMENSCHNEIN, A.; COSTA, A.S. Rodlike particles associated with ringspot symptoms in several orchid species in Brazil. *Phytopathologische Zeitschrift*, v.81, p.280-284, 1974.

KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. *Fitopatologia Brasileira*, v.20, p.208-213, 1995.

KITAJIMA, E.W.; NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M.; MORAES, G.J. Short rhabdovirus-like particles and a caulimovirus in *Hibiscus rosa-sinensis* with green spot. In: SCANDEM, 51, BERGEM, 1999. Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences, 1999, p.63-64.

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

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V. Mancha verde e mancha clorótica de *Hibiscus* são causadas por tipos diferentes de vírus transmitidos por *Brevipalpus*. *Summa Phytopathologica*, v.27, p.105, 2001a.

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*, v.67, p.231-237, 2001b.

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

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*, v.30, p.135-160, 2003b.

KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; GOMES, R.T.; FERREIRA, P.T.O. Manchas cloróticas em solano-violeta, transmissível pelo ácaro *Brevipalpus* associado a um vírus do tipo nuclear. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.65, 2004. Suplemento.

KITAJIMA, E.W.; MORAES, G.J.; CALEGÁRIO, R.F.; SALAROLI, R.B. Dados preliminares sobre detecção electronomicroscópica de vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) nos tecidos do ácaro vetor. In: Simpósio Brasileiro de Acarologia 1. Viçosa. Resumos, p.248, 2006.

KITAJIMA, E.W. Electron microscopic evidence that nuclear type of *Brevipalpus* transmitted viruses multiplies in the mite vector. XXI Cong. Soc. Bras. Microscopia e Microanálise. Búzios - ENO 3. Resumos, CD Rom, 2007.

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*, v.42, p.263-271, 2007.

KNORR, L.C. Studies on the etiology of leprosis in Citrus. In: CONFERENCE OF INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4, 1966, Rome. Proceedings.... Gainesville: University of Florida Press, p.332-341, 1968.

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

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

KUBO, K.S.; KITAJIMA, E.W.; GOMES, R.T.; FERREIRA, P.T.O. Manchas cloróticas em solano-violeta, transmissível pelo ácaro *Brevipalpus* associado a um vírus do tipo nuclear. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.65, 2004. Suplemento.

LEON, G A.; REALPE, C.E.; GARZON, P A.; RODRIGUEZ, J A.; MORENO, M G.; CHILDERS, C C.; ACHOR, D S.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLILUIZON, R.; MESACOBO, N C.; SALAROLI, R B.; KITAJIMA, E.W. Ocorrência da leprose dos citros na Colômbia. *Summa Phytopathologica*, v. 32. p. 10-10, 2006. Suplemento.

LEVY, A.; CZOSNEK, H. Replacing the AC2/AC3 genes of *Abutilon mosaic virus* (ABMV) with those of *Bean dwarf mosaic virus* enhances ABMV accumulation, movement and symptom severity in bean. *Journal of Plant Pathology*, v.88, n.1, p.39-52, 2006.

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 treat to the citrus production in the Americas. *Plant Disease*, v.87, p.1317-1321, 2003.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MULLER, G.W.; NUNES, W.M.C.; NUNES, M.J.C.; THEODORO, G.F.; ANTONIOLI, R.; SOUZA, A.A.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Haplótipos do vírus da leprose dos citros identificados nos Estados do Sul do Brasil através de SSCP do gene da proteína de movimento e replicase. *Fitopatologia Brasileira*, v.29, p.S98-99, 2004. Suplemento.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.N.; KISHI, L.; MACHADO, M.A. Seqüenciamento completo do genoma do vírus da leprose dos citros (CiLV-C). *Fitopatologia Brasileira*, v.30, p.191, 2005.

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

LUCHETTI, M.A.; MATTOS JÚNIOR, D.de; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O. Aspectos gerais e distribuição de cultivo. In:

Lima ácida Tahiti. Editores, Mattos Júnior, D.de; De Negri, J.D.; Figueiredo, J.O. Campinas, p.1-12, 2003.

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: *Seventh Int. Cong. Plant Pathology*, p.113-118, 1998. (Abstract).

MAIA, O.M.de.; ANDRADE; OLIVEIRA, C.A.L.de. Suscetibilidade de cercas-vivas, quebra-ventos e plantas invasoras ao vírus da leprose e sua transmissão para laranjeiras por *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari: Tenuipalpidae). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v 28, n.2, p.209-213, 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: *Seventh Int. Cong. Plant Pathology*, p.113-118, 1998. (Abstract).

MARQUES, J.P.R.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.11, p.1531-1536, 2007.

MARUBAYASHI, J.M. *Cowpea mild mottle virus*: transmissão, círculo de hospedeiras e resposta à infecção de cultivares IAC de feijão e soja. Dissertação (Mestrado). Instituto Agronômico de Campinas, 42p. 2006.

MATINELLI, N.M.; OLIVEIRA, C.A.L. de; PERECIN, D. Conhecimentos básicos para estudos que envolvam levantamentos da população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) na cultura dos citros. *Científica*, v.4, p.242-253, 1976.

MATTHEWS, R.E.F. *Plant Virology*, 2ed. New York: Academic Press, 1991. 835p.

MATTOS JÚNIOR, D. de; DE NEGRI, J.D.; FIGUEIREDO, J.O.; POMPEU JÚNIOR, J. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Boletim Técnico 200 (IAC). 17 de março de 2005.

MAYER, Z., BAGNARA, A.; FARBER, P.; GEISEN, R. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.82, p.143-151, 2003.

MAWASI, M. et al. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Virology*, v.77, p.2359-2364, 1996.

MEDEIROS, R.B.; FERREIRA, M.A.S.V.; DIANESE, J.C. Mecanismos de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. Ed. UnB, 2003. 289p.

MEJIA, L.; PANIAGUA, A.; CRUZ, N.; PORRAS, M.; PALMIERI, M. Leprosis de los cítricos, enfermedad que amenaza plantaciones em Guatemala. 42ª Reunión de la Sociedad. Americana de Fitopatología, v.69, 2002.

MICHELOTTO, M.D.; BUSOLI, A.C. Caracterização da transmissão do vírus do mosaico das nervuras do algodoeiro pelo pulgão *Aphis gossypii* com relação à persistência e ao tempo necessário para inoculação. *Bragantia*, v.66, n.3, p. 441-447, 2007.

MIYAI, T.; FARIAS, P.A.; EIRAS, M.; GALLETI, S.R.; CHAVES, A.L.R.; COLARICCIO, A. Estudo da concentração de partículas do *Cucumber mosaic virus* através de microscopia eletrônica de transmissão em diferentes hospedeiras. *Arquivos Instituto Biológico*, São Paulo, v.69, n.3, p.33-37, 2002.

MUELLER, E.; GILBERT, J.; DAVENPORT, G.; BRIGNETI, G.; BAULCOMBE, D.C. Homology-dependent resistance – transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant Journal*, v.7, p.1001-1013, 1995.

MULLIS, K.; B.; FALLONA, F.; SCHARF, S. J.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v. 51, p. 263-273, 1986.

MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças causadas por vírus e viróides e similares em citros. In: ROSSETTI, V.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. (Ed.). Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. Campinas: *Fundação Cargill*, p.55-84, 1993.

MULLER, G.W.; TARGON, M.L.P.N.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A.; RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: JUNIOR, D.M.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; JUNIOR, J.P. Citros. Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2005, 929p.

MORIN, S. ; GHANIM, M; ZEIDAN, M; CZOSNEK, H; VERBEEK, M. ;VAN DEN HEUVELT, F.J.M. A Groel homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl. *Virology*, v.256, p.75-84, 1999.

MOURY, B.; FABRE, F.; SENOUSSE, R. Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *PNAS*, v.104, n.45, p.17891-17896, 2007.

NAULT, L.R. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, v. 90, p.522-541, 1997.

NEVES, E.M.; RODRIGUES, L.; GASTALDI, H.L.G. Defensivos agrícolas e custos na produção de citros. *Visão agrícola*, v.1, n.2, p.127-131, 2004.

NG, J.C.K.; FALK, B.W. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annual Review Phytopathology*, v.44, p.183-212, 2006.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real – Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* – n.33, julho/dezembro, p.10-13, 2004.

NOVELLI, V.M., FREITAS-ASTÚA, J., ARRIVABEM, F., LOCALI, E.C., HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. O ácaro vetor da leprose dos citros (*Brevipalpus phoenicis*) e a interação com endossimbiontes CLO (*Cytophaga-like-organism*).

Laranja, v.26, p.273-289, 2005a.

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*, v.30, p.183, 2005b.

NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; NAVIA, D.; SILVA, L. G.; MÜLLER, G.W.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; MACHADO, M.A. Prevalência de endossimbiontes *Cardinium* em populações de ácaros *Brevipalpus phoenicis* de diferentes regiões brasileiras. Resumos XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, p.875-1, 2006.

NUNES, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; DE OLIVEIRA, C.A.L. RT-PCR detection of Citrus leprosis virus in shrubs and weed plants infected through *Brevipalpus phoenicis* (Acari:Tenuipalpidae). Anais do XXI Congresso Brasileiro de Entomologia (Resumo ID: 840-1), 2006.

NUNES, M.A. Transmissão do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) para plantas próximas de pomares cítricos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal (Tese), 46p, 2007.

NUTTER, F.W. Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review. *Crop Protection*. Surrey, v.16, p.603-618, 1997.

OOMEN, P.A. Studies on population dynamics of the scarlet mite, *Brevipalpus phoenicis*, a pest of tea in Indonesia. Wageningen: Veenman & Zoon, 88p, 1982.

OLIVEIRA, C.A.L. de. Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros. *Laranja*, n.17, p.1-31, 1986.

OLMOS, A.; BERTOLINI, E., GIL, M.; CAMBRA, M. Real-time RT-PCR for quantitative detection of *Plum pox virus*. *Acta Hort.*

ISHS, v.657, p.149-153, 2004.

OLMOS, A.; BERTOLINI, E., GIL, M.; CAMBRA, M. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128, p.151–155, 2005.

OSMAN, F.; LEUTENEGGER, C.; GOLINO, D.; ROWHANI, A. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses* 1–5 and 9. *Journal of Virological Methods*, 141, p.22–29, 2007.

PAPPU, H.R. et al. Nucleotide Sequence and Organization of eight 3' Open Reading Frames of the Citrus tristeza Closteroviruses genome. *Virology*, v.199, p.35-46, 1994.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASSUMÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.S.; 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 JR., H.; OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P.F.; FERRARI, F.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; FRANCHISCINI, 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 (CiLV-C). *Virus Gene*, v.32, p.289-298, 2006.

PASSOS, O.S.; SOARES FILHO, W.S.; PEIXOTO, L.S. Variedade de copa de citros para mesa. *Documentos 154*, Embrapa Mandioca e Fruticultura, v.1, n.1, p.1-34, 2005.

PICÓ, B.; SIFRES, A.; NUEZ, F. Quantitative detection of Cucumber vein yellowing virus in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, v.128, p.14-20, 2005.

PIJNACKER, L.P.; FERWERDA, M.A.; BOLLAND, H.R.; HELLE, W. Haploid females parthenogenesis in the false spider mite *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). *Genetica*, n.51, p.211-214, 1980.

PRATES, H.S. Leprose dos citros. Casa da Agricultura, v.6, p.9-13, 1984.

PRICE, W.C. *Citrus tristeza virus*. CMI/AAB Description of plant viruses, n.33, 1970.

ROBERTS, A.G.; SANTA CRUZ, S.; ROBERTS, I.M.; PRIOR, D.A.M.; TURGEON, R.; OPARKA, K.J. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell*, v.9, p.1381-1396, 1997.

RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A. Notes on a probable respiratory apparatus in eggs of *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). *Internacional Journal of Acarology*, v.25, p.231-234, 1999.

RODRIGUES, J.C.V. Relações patógeno-vetor-planta no sistema leprose dos citros. Piracicaba. Tese (Doutorado) – CENA/USP. Piracicaba, SP. 168p. 2000a.

RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MÜELLER, G.W. Transmission of Citrus leprosis virus to mandarins by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 14. Proceedings...v.14, p.174-178, 2000b.

RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A. Virus-*Brevipalpus*-plant relationships of the citrus leprosis pathosystem. Proceedings of the International Society of Citriculture, v.1, p.768-770, 2000c.

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*, n.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*, v.30, p.161-179, 2003.

RODRIGUES, J.C.V.; LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Transmissibility of Citrus leprosis virus by *Brevipalpus phoenicis* to *Solanum violaefolium*. *Plant Disease*, v.89, n.8, p.911, 2005.

RODRIGUES, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.; FADEL, A.L.; NICOLINI, F.; NOVELI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. *Laranja*, 2007 (in press).

ROESSING, C.; SALIBE, A.A. Incidência de leprose em variedades cítricas. *Ciência e Cultura*, v.19, p.303, 1967.

ROSILLO, A.M. Investigaciones sobre el vector *Toxoptera citricidus* Kirkaldy em relación a las estirpes de vírus del complejo “tristeza de los citrus”1975. 14p. (Informe final de los trabajos realizados em relación a la beca otorgada al suscrito por ele Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq de Brasil).

ROSSELL, R.C. ; TORRES-JEREZ, I.; BROWN, J.K. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polimerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology*, v. 89, p.239-246, 1999.

ROSSETI, V. Diferenciação entre o cancro cítrico e outras moléstias. *Citrus*, v.1, p.23-26, 1980.

ROSSETI, V. A leprose dos citros no Brasil. In: Oliveira, C.A.L.; Donadio, L.C. (ed.). *Leprose dos citros*. Jaboticabal: FUNEP, p.1-12, 1995.

ROSSI-ZALAF, L.S. Controle microbiano de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) com *Hirsutella thompsonii* Fisher. 2007. 124p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

RUBIO, L. et al. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infection and recombination. *Journal Virology*, v.75, p.8054-8062, 2001.

SANTOS, C.D.G.; DE ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.de O. Estudo da interação de um begomovírus isolado de tomateiro com a mosca branca. *Fitopatologia Brasileira*, v.28, n.6, p.664-673, 2003.

SCHENK, P.M.; KAZAN, K.; MANNERS, J.M.; ANDERSON, J.P.; SIMPSON, R.S.; WILSON, I.W.; SOMERVILLE, S.C.; MACLEAN, D.J. Systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, v.132, p.999-1010, 2003.

SCHNEIDER, W.L.; SCHERMAN, D.J.; STONE, A.L.; DAMSTEEGT, V.D.; FREDERICK, R.D. Specific detection and quantification of Plum pox virus by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, v.120, p.97-105, 2004.

SECEX/MEDIC. Disponível no endereço eletrônico: www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex/depPlaDesComExterior/in dEstatisticas. Acesso em 07 de novembro de 2007.

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G.H.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; OLIVEIRA, R.C.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Molecular Plant Microbe Interaction*, v.16, p.867-875, 2003.

SOUZA, A.A.; MULLER, G.W. A premunização no controle da tristeza dos citros. *Laranja*, v.27, n.1, p.57-70, 2006.

SMITH, H.G.; BARKER, H. The luteoviridae. 1 Edition, CAB I Publishing, New York. 1999.

TARGON, M.L.P.N.; MACHADO, M.A.; MULLER, G.W.; LOCALI, E.; CRISTOFANI, M. Genome sequencing of the citrus tristeza virus protective isolate and comparison with other isolates. In: International Congress of Citriculture. Abstracts of the International Congress of Citriculture, p. 93, 2000.

TRINDADE, M.L.B.; CHIAVEGATO, L.G. Colonização por *Brevipalpus obovatus* (Donnadieu, 1875), *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1935) (Acari: Tenuipalpidae) em variedades cítricas. *Laranja*, v.11, p.227-240, 1990.

VAUCHERET, H.; BECLIN, C.; FAGARD, M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science*, v.114, p.3083-3091, 2001.

VERGANI, A.R. Transmisión y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo, Min. Agr. Nacion. Buenos Aires. Instituto de Sanidad Vegetal. Serie A, Año V, n.3, 11p. 1945.

VIVES, M.C.; RUBIO, L.; LOPEZ, C.; NAVAS-CASTILLO, J.; ALBIACH-MARTI, M.R.; DAWSON, W.O.; GUERRI, J.; FLORES, R.; MORENO, P. The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *Journal General Virology*, v.80, p.811-816, 1999.

WATSON, M.A.; ROBERTS, F.M. A comparative study of the transmission of *Hyoscyamus virus 3*, *Potato virus Y* and *Cucumber virus 1* by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflex* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proc. R. Soc. London*, v.127, p.543-576, 1939.

WEEKS, A; MAREK, F; BREEUWE, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. *Science*, v.292, p.2479-2482, 2001.

WINDELS, P.; BERTRAND, S.; DEPICKER, A.; MOENS, W.; VAN BOCKSTAELE, E.; LOOSE, M. Qualitative and events-specific PCR real-time detection methods for StarLink maize. *European Food Research and Technology*, v.216, p.259-263, 2003.

YANG, Z. et al. Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes*, v.19, p.131-142, 1999.

ZHANG, X.S.; HOLT, J.; COLVIN, J. A general model of plant virus disease infection incorporating vector aggregation. *Plant Pathology*, v.49, p.435-444, 2000.

ZERBINI, F.M.; ALFENAS, P.F.; ANDRADE, E.C. O silenciamento de RNA como um mecanismo de defesa de plantas a vírus. *Revisão Anual de Patologia de Plantas - RAPP*, v.13, p.191-244, 2005.