

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

O vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus - PFGSV),  
isolado de ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus*

**Mariana Shizue Gouveia Saito**

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

Piracicaba  
2020

Mariana Shizue Gouveia Saito  
Engenheira Florestal

O vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus - PFGSV), isolado de  
ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus*  
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:  
Prof. Dr. **ELLIOT WATANABE KITAJIMA**

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

Piracicaba  
2020

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

Saito, Mariana Shizue Gouveia

O vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus - PFGSV), isolado de ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus* / Mariana Shizue Gouveia Saito - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

49 p.

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

1. Passion fruit green spot vírus - PFGSV 2. VTBs 3. Ácaros *Brevipalpus*  
I. Título

## DEDICO

Aos meus pais Marcia e Marcio, minha família e amigos, que sempre me apoiaram e que entenderam quando não pude estar presente.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Elliot W. Kitajima pela orientação e sobre tudo pela oportunidade de crescimento acadêmico.

À Dra. Aline D. Tassi, pela amizade, confiança e orientação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), ao Departamento de Fitopatologia pelo suporte técnico e logístico.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Marques e ao laboratório de virologia pelo auxílio com materiais e técnicas de genética molecular.

Ao Prof. Dr. Gilberto José de Moraes pelo empréstimo de materiais.

Aos meus amigos do programa Felipe, Isis e Tiarla, por todo o apoio e auxílio.

À Vanessa Bassinelo e a Paula Vanessa pelo apoio durante suas iniciações científicas.

A prezada Fabiana secretaria do Departamento de Fitopatologia, obrigada pela ajuda.

Aos meus demais colegas e professores do Departamento de Fitopatologia da ESALQ por compartilharem conhecimentos da área.

Ao Renato B. Salaroli, técnico do laboratório de microscopia eletrônica, e a Lúcia, faxineira do laboratório por sempre manterem o bom funcionamento do laboratório.

À todos os funcionários da ESALQ, principalmente Dona Lúcia, Dona Iria, e Dona Erlete.

Aos meus amigos e companheiros da Associação de Pós Graduandos pelo apoio e inspiração.

A professora Sílvia Molina, pela atenção e carinho em nossas seções de terapia.

Aos meus pais Marcio e Marcia, pelo apoio, carinho e amor, sem os quais eu não seria nada.

As minhas amigas Mariana, Ana Carolina e Alessandra e ao meu amigo Thiago, que sempre me ouviram e apoiaram, nos momentos bons e nos ruins.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| RESUMO .....  | 6  |
| ABSTRACT .....  | 7  |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 9  |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 11 |
| 2.1. Vírus transmitidos por ácaros <i>Brevipalpus</i> (VTB).....                                    | 11 |
| 2.2. O isolado de <i>Ligustrum</i> do PfGSV .....   | 14 |
| 2.3. Ácaros <i>Brevipalpus</i> como vetores de vírus .....  | 15 |
| 3. METODOLOGIA.....   | 17 |
| 3.1. Criação dos ácaros <i>Brevipalpus</i> .....  | 17 |
| 3.2. Fonte de inóculo e origem dos ácaros .....   | 17 |
| 3.3. Identificação dos ácaros <i>Brevipalpus</i> .....  | 18 |
| 3.4. Confirmação das espécies de <i>Brevipalpus</i> vetoras de PfGSV-Lig.....                       | 18 |
| 3.5. Uso de diferentes variedades de feijão para planta indicadora.....                             | 19 |
| 3.6. Avaliação da gama de hospedeiras .....   | 19 |
| 3.7. Identificação de plantas naturalmente infetadas pelo PfGSV-Lig.....                            | 19 |
| 3.8. Determinação de parâmetros de transmissão.....   | 19 |
| 3.9. Detecção molecular do vírus em plantas sintomáticas .....                                      | 21 |
| 3.10. Microscopia eletrônica de transmissão.....  | 22 |
| 3.11. Transmissão mecânica do vírus.....  | 23 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 25 |
| 4.1. Identificação dos ácaros.....  | 25 |
| 4.2. Tentativas de formação de colônias isolinhas .....   | 25 |
| 4.3. Avaliação de diferentes cultivares de feijoeiro como indicadora da infecção por PfGSV-Lig..... | 26 |
| 4.4. Gama de hospedeiras do PfGSV-Lig.....  | 27 |
| 4.5. Ensaio de transmissão mecânica .....   | 32 |
| 4.6. Determinação dos parâmetros de transmissão por ácaros .....                                    | 32 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....   | 35 |
| REFERÊNCIAS .....   | 37 |

## RESUMO

**O vírus da pinta verde do maracujazeiro (passion fruit green spot virus - PfGSV), isolado de ligustro: suas relações com o ácaro vetor *Brevipalpus***

O vírus da pinta verde do maracujá (passion fruit green spot virus- PfGSV), transmitido por ácaros do gênero *Brevipalpus*, e membro tentativo do gênero *Cilevirus*, teve sua primeira descrição em 1997 no estado de São Paulo, com potencial para causar perdas econômicas à cultura do maracujazeiro. Outro possível cilevirus, a leprose do ligustro, foi encontrado infectando *Ligustrum* spp., e possuía similaridade sintomatológica a um vírus descrito na Argentina em 1942, em Bella Vista, também presente em *Ligustrum* spp., e descrito como “lepra explosiva de la ligustrina”. Porém, através da comparação de genomas o vírus encontrado no Brasil assemelhou-se com PfGSV, sendo possivelmente distinto do vírus encontrado na Argentina, sendo provável isolado de PfGSV, e assim designado como PfGSV-Lig. PfGSV-Lig foi encontrado infectando naturalmente várias espécies distintas de plantas, algumas das quais se infectaram experimentalmente, além de várias outras ensaiadas. A infecção foi comprovada através de ensaios de RT-PCR e exame de secções das lesões por microscopia eletrônica de transmissão. Ácaros tenuipalpídeos *B. yothersi* e *B. papayensis* haviam sido recentemente identificados como vetoras de PfGSV-Lig. Foram feitas tentativas de se obter colônias isolinhas destas espécies em folhas destacadas de algumas espécies de *Ligustrum*. Experimentos foram também realizados trabalhos para se determinar alguns parâmetros como período de acesso para aquisição e inoculação, e de latência do PfGSV-Lig, pelas espécies vetoras. Resultados preliminares de determinação do período de aquisição para inoculação indica ser ele menor que 24h. Estudos adicionais deverão definir estes parâmetros.

Palavras-chave: PfGSV-Lig, VTBs, Ácaros *Brevipalpus*, Relações vírus vetor

## ABSTRACT

**Passion fruit green spot virus (PfGSV), isolated from *Ligustrum*: its relationships with the *Brevipalpus* vector mite**

The passion fruit green spot virus (passion fruit green spot virus - PfGSV), transmitted by *Brevipalpus* mites, and tentative member of the genus *Cilevirus*, had its first description in 1997 in the state of São Paulo, with the potential to affect statistics to the passion fruit culture. Another possible virus, *Ligustrum* leprosy, has been found infecting *Ligustrum* spp. and it had symptomatic similarity to a virus described in Argentina in 1942, in Bella Vista, also present in the *Ligustrum* spp. It is described as “lepra explosiva de la ligustrina”. However, through the comparison of genomes or viruses found in Brazil, associated with PfGSV, being possibly distinct from the virus found in Argentina, being probably isolated from PfGSV, and also as (PfGSV-Lig). PfGSV-Lig has been found to infect several different species of plants, some of which are infected experimentally, in addition to several others tested. The infection was proven through RT-PCR tests and examination of sections of lesions by transmission electron microscopy. *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) mites present in PfGSV-Lig infected *Ligustrum* spp. plants were assayed to identify the vector species. *B. yothersi* transmitted PfGSV, but not *B. obovatus* and *B. californicus*. Experiments were also carried out to determine some parameters such as access period for acquisition and inoculation, and latency of PfGSV-Lig, by the vector species. Preliminary results for determining the acquisition period for inoculation indicate that it is less than 24 hours. Additional studies should define these parameters.

Keywords: PfGSV-Lig, VTBs, *Brevipalpus* mite, Virus vector relationship





## 1. INTRODUÇÃO

Vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTB) são conhecidos desde o início do século XX, mas somente foram estudados mais detalhadamente nos últimos 25 anos (KITAJIMA, NOVELLI & ALBERTI, 2014; DIETZGEN et al., 2018; FREITAS-ASTÚA et al., 2018). Dentre eles o vírus da pinta verde do maracujá (passion fruit green spot virus- PfGSV) é de recente descrição, tendo sido observado pela primeira vez na região de Vera Cruz, SP, causando consideráveis perdas (KITAJIMA et al., 1997), sendo inicialmente o ácaro *B. phoenicis* considerado como vetor. Dada a sua relação com ácaros *Brevipalpus* e sua caracterização molecular parcial (ANTONIOLI-LUIZON, 2009) foi considerado possível integrante do gênero *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2011). Seu genoma completo foi obtido recentemente, havendo uma proposta de sua inclusão entre os cilevirus (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2020).

Um outro VTB, de descrição mais antiga, é o da leprose do *Ligustrum* (*Ligustrum leprosis virus- LigLV*), relatado originalmente em Bella Vista, Argentina (VERGANI, 1942) em alfineiro (*Ligustrum sinense*) e mencionado como “lepra explosiva de la ligustrina” (LEL). O possível vetor deste vírus argentino foi identificado como *Tenuipalpus pseudocuneatus*, que seria a mesma espécie descrita associada à leprose do citros (FREZZI, 1940). Enfermidade similar à LEL foi posteriormente descrita no Brasil (LIMA et al., 1991; RODRIGUES, NOGUEIRA & FREITAS, 1995; KITAJIMA, RODRIGUES & FREITAS-ASTÚA, 2010) em várias localidades dos estados do Paraná e São Paulo, e no Distrito Federal. Seu genoma acha-se caracterizado havendo “primers” para sua detecção molecular, tendo sido verificado que seu genoma seria muito próximo ao do PfGSV, e assim LigLV presente no Brasil deveria ser considerado um isolado do PfGSV (J. FREITAS-ASTÚA, comunicação pessoal), e assim será referido como PfGSV-Lig neste trabalho. Seu possível vetor foi identificado inicialmente como *B. phoenicis* (RODRIGUES, NOGUEIRA & FREITAS, 1995), mas na recente reavaliação desta espécie, com novos parâmetros morfológicos (BEARD et al., 2015) e moleculares (NAVIA et al., 2013), *B. yothersi* e *B. papayensis* foram identificadas como transmissores do PfGSV-Lig (TASSI, 2018). PfGSV-Lig teria uma ampla gama de hospedeiras, tanto natural como experimental (E.W. KITAJIMA, comunicação pessoal) mas há carência de informações sobre as relações vírus-vetor. Neste trabalho procurou-se detalhar as espécies vegetais suscetíveis ao PfGSV-Lig, tendo sido também feitas tentativas de se estabelecer alguns

parâmetros das relações vírus-vetor, precedido de formação de colônias isolinhas das espécies vetoras, cujos resultados são aqui relatados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Vírus transmitidos por ácaros *Brevipalpus* (VTB)

A leprose dos citros (LC) foi a primeira enfermidade reportada na literatura, do que chamamos hoje de VTB. Foi relatada em pomares de laranjeiras, no estado da Flórida, EUA, causando perdas, e caracterizava-se por lesões em folhas, frutos e ramos, e devido a aparência do sintoma foi referida como “scaly bark” ou “nail head rust” (FAWCETT, 1911). Sua etiologia foi controversa inicialmente, tendo sido sugerido envolvimento de fungos, mas sua natureza viral foi confirmada em 1995 (COLARICCIO et al., 1995). Doenças similares foram posteriormente encontradas na América do Sul (Paraguai, Argentina e Brasil) (SPEGAZZINI, 1920; MARCHIONATTO, 1935; BITANCOURT, 1937). O envolvimento de ácaros *Brevipalpus* com LC foi evidenciado pela primeira vez por Frezzi em 1940, na Estação Experimental do INTA, em Bella Vista, Argentina, quando ácaros *Tenuipalpus pseudocuneatus* coletados de plantas sintomáticas, e transferidos para plantas saudias, reproduziram a LC. No Brasil, o vetor da LC foi identificado como *B. phoenicis* (MUSUMECCI & ROSSETTI, 1963). Na Flórida *B. obovatus* e *B. californicus* foram relatados como vetores de LC (KNORR, 1968). A natureza viral da LC foi gradativamente se consolidando após experimentos de Knorr (1968) que demonstraram a expansão da lesão em ramos enxertados em plantas saudias, para tecidos da planta receptora; da observação de efeitos citopáticos e possíveis vírions em secções das lesões observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (KITAJIMA et al., 1972; 1974) e finalmente consolidada com a transmissão mecânica do agente para laranjeiras e algumas plantas indicadoras (COLARICCIO et al., 1995). Estudos mais recentes revelaram que a leprose do citros seria uma síndrome, podendo ser causada por vários VTB. O principal, prevalente, agressivo e que causa maiores preocupações devido ao potencial de sua perda, é a LC causada pelo vírus da leprose dos citros C (citrus leprosis virus C- CiLV-C), e também o mais estudado dentre todos os VTB. Seu genoma foi parcialmente obtido em 2003, permitindo gerar pela primeira vez, uma ferramenta molecular para detecção deste vírus (LOCALI et al., 2003), e completamente sequenciado em 2006 (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006).

Devido a distinção do CiLV-C dos demais vírus conhecidos, foi proposto e aceito pelo ICTV a criação de um gênero para acomodá-lo, o gênero *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2011). Outros vírus foram identificados como fazendo parte da síndrome da LC: um vírus similar ao CiLV-C, mas com diferença na sequência de seu genoma suficiente para ser

considerado espécie distinta de cilevirus, constatado na Colômbia e designado de CiLV-C2 (ROY et al., 2013); um isolado de citros do vírus da mancha da orquídea (orchid fleck virus- OFV-citrus) na Colômbia e México (ROY et al., 2019; ROY et al., 2015) e mais recentemente na África do Sul (COOK et al., 2019). No Brasil, uma forma de LC que ocorre esporadicamente em laranjeiras mantidas em regiões mais altas e de clima mais ameno, foi caracterizado e designado de leprose nuclear (citrus leprosis virus N- CiLV-N) (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). A leprose dos citros, descrita originalmente na Flórida desapareceu depois dos anos 1960 (CHILDERS et al., 2003). Baseado em imagens de publicações de seus sintomas que eram similares aos causados pelo CiLV-N, sugeriu-se que seu agente causal fosse relacionado (KITAJIMA et al., 2011). Sequenciamentos feitos em material herbarizado permitiram obter boa parte de seu genoma, que revelou ter similaridades com o de OFV, tendo sido provisoriamente designado de CiLV-N0 (HARTUNG et al., 2015). No Brasil também foram encontrados mais dois vírus distintos integrando a síndrome do CL, respectivamente o vírus da mancha clorótica do citros (citrus chlorotic spot virus- CiCSV) no Piauí (CHABI-JESUS et al., 2018a), e o da mancha brilhante do citros (citrus bright spot virus- CiBSV) nos estado do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CHABI-JESUS et al., 2018b).

Até 2000, além do que hoje sabemos ser CiLV-C, eram conhecidos como VTB o vírus da “lepra explosiva de la ligustrina” na Argentina (VERGANI, 1942) tentativamente considerada similar ao encontrado no Brasil (RODRIGUES, NOGUEIRA & FREITAS, 1995), mas estudos preliminares recentes sugerem que o vírus encontrado no Brasil e o vírus encontrado na Argentina seriam distintos, sendo o do Brasil um isolado do PfGSV (J. FREITAS-ASTÚA, com.pess.) descrito em 1997 (KITAJIMA et al., 1997). No Brasil relatou-se o vírus da mancha anelar do café (coffee ringspot virus- CoRSV) (BITANCOURT, 1938; KITAJIMA & COSTA, 1972; CHAGAS, 1978). No Japão descreveu-se o OFV (DOI et al., 1969) causando lesões foliares em orquídeas, e que se revelou ocorrer globalmente tendo como vetor *B. californicus* (KONDO et al., 2003).

Uma das características comuns a estas viroses transmitidas por ácaros *Brevipalpus* é a infecção consistentemente localizada, não se tornando sistêmica. Os sintomas se notabilizam pelo fato de serem lesões localizadas em folhas (manchas cloróticas, anelares, necróticas, e em folhas senescentes, manchas verdes), ramos, frutos e raramente em flores (KITAJIMA, CHAGAS & RODRIGUES, 2003). Estudos histológicos indicam que nas lesões, células da epiderme, parênquima, bainha vascular e ocasionalmente parênquima do xilema são invadidas pelos VTB, mas não há indicações da presença de vírus nos tecidos do floema (KITAJIMA, CHAGAS & RODRIGUES, 2003; MARQUES et al., 2010). Haveria algum processo que

impede a infecção do floema e por conseguinte, não ocorreria transporte a longas distâncias, dentro da planta infetada.

O reconhecimento de lesões foliares associadas à presença de ácaros *Brevipalpus*, permitiram a detecção de numerosos casos de infecção de plantas por VTB, em especial ornamentais (KITAJIMA, RODRIGUES & FREITAS, 2010), e em muitos destes casos os vírus detectados não estão devidamente identificados.

Investigações ultraestruturais nas lesões causadas por diferentes VTB revelaram que estes vírus seriam de pelo menos dois tipos distintos. O citoplasmático, em que presumíveis partículas virais, baciliformes e curtas, providas de membrana, ocorrem no lúmen do retículo endoplasmático, e uma inclusão eletrônica densa e vacuolada, referida como viroplasma, geralmente elíptica, presente no citoplasma de células infectadas. Presume-se que o viroplasma represente o sítio de acúmulo de proteínas codificadas pelo vírus. Vírus como CiLV-C e PfGSV são deste tipo. O outro é o nuclear, em que nas células da lesão, partículas virais em forma de bastonetes curtos ocorrem tanto no núcleo como no citoplasma, comumente associadas perpendicularmente às membranas do núcleo ou do retículo endoplasmático. No núcleo surge também uma massa eletrônica-lucente, o viroplasma. OFV apresenta este tipo de padrão citoplasmático (KITAJIMA, CHAGAS & RODRIGUES, 2003).

Esta dicotomia foi confirmada nas caracterizações moleculares dos VTB. Sequenciamento do OFV (KONDO et al., 2006) e do CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006) mostraram que se tratavam de vírus com organização genômica completamente distinta. Ao CiLV-C se atribuiu um novo gênero, *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2011), enquanto OFV revelou organização genômica similar aos membros da família *Rhabdoviridae* (KONDO et al., 2006), mas diferindo dos demais membros por ter genoma bipartido, criou-se um novo gênero nesta família, *Dichorhavirus*, para acomodá-lo (DIETZGEN ET AL., 2014). Vários outros VTB tiveram recentemente seus genomas conhecidos, e no momento são os seguintes cilevirus reconhecidos: CiLV-C e CiLV-C2, e possíveis membros: PfGSV e o vírus da mancha clorótica de *Solanum violifolium* (*solanum violifolium* ringspot virus- SvRSV) (FERREIRA et al., 2007). Os dichorhavirus atualmente reconhecidos são: OFV, CiLV-N, CiCSV, clerodendrum chlorotic spot virus (CICSV, RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2018) e citrus chlorotic spot virus (CiCSV, CHABI-JESUS et al., 2018) (AMARASINGHE et al., 2019).

## 2.2. O isolado de *Ligustrum* do PfGSV

O gênero *Ligustrum* compreende mais de 150 espécies, arbustivas ou arbóreas. As mais comumente utilizadas no Brasil, em cercas-viva ou arborização de vias são *L. sinense*, *L. lucidum*, *L. japonicum*, *L. vulgare* e *L. ovalifolium* (LOMBARDI, 2015). Há vários vírus registrados em *Ligustrum* spp. como os nepovírus arabis mosaic virus, tomato blackring virus, raspberry ringspot virus, cherry leaf roll virus, o tobrovírus tobacco rattle virus, o alfanecrovírus tobacco necrosis virus, o tombusvírus tomato bushy stunt virus, o tobamovirus, tobacco mosaic virus, e o cucumovírus cucumber mosaic virus (ALBUOUY & DEVERGNE, 2000), nenhum deles ainda registrado no Brasil. Um VTB, causando manchas localizadas em folhas, e considerada similar à leprose do citros, foi relatado em Bella Vista, Argentina associada à infestação por *B. obovatus* (VERGANI, 1942). Posteriormente, sintomas similares foram relatados nos estados do Paraná e São Paulo (LIMA et al., 1991; RODRIGUES, NOGUEIRA & FREITAS, 1995). Este VTB de *Ligustrum* sp. foi referido no Brasil como vírus da mancha anular do *Ligustrum* (LigRSV), mas aceitando como premissa de que seria relacionado ao vírus descrito na Argentina, optou-se por mencioná-lo como leprose do *Ligustrum* (LigLV) tendo em vista a prioridade. Em experimentos de transmissão por ácaros, este vírus causou lesões localizadas em folhas de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), *P. morifolia*, manacá (*Brunfelsia uniflora*), vinca (*Catharanthus roseus*), fumo (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Solanum lycopersicon*), trombeteira (*Datura stramonium*), orquídeas (*Dendrobium* sp. e *Epidendrum* sp.) e solano-violeta (*Solanum violifolium*) (KITAJIMA et al., 2017). Manchas anulares em manacá associadas a VTB do tipo citoplasmático haviam sido relatadas no estado de São Paulo (NOGUEIRA, RODRIGUES & ROSSI, 2001), e também em orquídeas (FREITAS-ASTÚA, REZENDE & KITAJIMA, 1999; KUBO et al., 2006) e considerou-se que nestes casos poderiam ser atribuídas a LigLV. Duas espécies de *Brevipalpus*, *B. yothersi* e *B. papayensis* foram descritas transmitindo LigLV em condições experimentais (TASSI & KITAJIMA, 2016). Ensaio moleculares revelaram que os genomas do LigLV encontrado no Brasil e o do PfGSV são similares, sendo possivelmente o LigLV brasileiro distinto do argentino (J. FREITAS-ASTUA, com. pess.). Assim, doravante será ele referido como PfGSV isolado *Ligustrum* (PfGSV-Lig) uma vez que a descrição do PfGSV é anterior.

### 2.3. Ácaros *Brevipalpus* como vetores de vírus

Ácaros *Brevipalpus* são referidos como “false spider mites” ou “flat mites”, tendo coloração marrom-avermelhada e corpo achatado. Os adultos medem ca. 0,3 mm. Pertencem à família *Tenuipalpidae* havendo mais de 280 espécies descritas e têm distribuição global, ocorrendo em regiões temperadas, tropicais e equatoriais (MESA et al., 2009). São fitófagos, e em alguns casos podem causar injúrias por alimentação com consequências econômicas (CHILDERS, FRENCH & RODRIGUES, 2003). Até recentemente três espécies de *Brevipalpus* haviam sido reconhecidas como vetoras de vírus, respectivamente *B. californicus*, *B. obovatus* e *B. phoenicis* as quais foram descritas infestando cerca de 1.000 distintas espécies de plantas (CHILDERS, RODRIGUES & WELBOURN, 2003). Estudos feitos com *B. phoenicis* e *B. obovatus* mostram que seu genoma constitui-se de dois cromossomos, sua reprodução seria partenogenética do tipo telítoca (fêmeas gerando fêmeas), mas nas populações naturais podem estar presentes uma pequena porcentagem (menos de 1%) de machos (HELLE, HOLLAND & HEITMANS, 1980; CHILDERS, FRENCH & RODRIGUES, 2003; NAVIA et al., 2019). Estudos citogenéticos mostraram que adultos destas espécies eram haploides, devendo ser machos, mas eram feminilizados pela infecção por uma bactéria endossimbionte do tipo *Cardinium* (WEEKS, MAREC & BREEUWER, 2001) e que infeta todos órgãos (KITAJIMA et al., 2007). Contudo, outras espécies do gênero como *B. chilensis*, ácaro registrado apenas no Chile, infestando numerosas plantas frutíferas, e considerado praga quarentenária em outros países, tem em suas populações naturais numerosos machos (GONZÁLEZ, 1958), e não se acha infetado por *Cardinium*, havendo evidências de fertilização após cópula (ALBERTI, TASSI & KITAJIMA, 2014). Ácaros *Brevipalpus* alimentam-se utilizando quelicera modificada em estilete com ca. 50 µm, utilizado para perfurar a epiderme e o parênquima subjacente. O delgado canal estiletar é usado para injetar a secreção da glândula prosomal anterior, equivalente à salivar, que presumivelmente iniciaria uma pré-digestão do conteúdo celular. Crê-se que a seguir o ácaro recolhe o estilete, e o conteúdo celular extravasa pelo orifício deixado pelo estilete pelo turgor celular. Ao mesmo tempo, o ácaro apõe firmemente os lábios neste orifício e com a potente bomba faríngea suga o conteúdo celular (ALBERTI & KITAJIMA, 2014).

A identificação de espécies de *Brevipalpus* tem sido feita baseada em poucas características morfológicas externas como número de setas dorso-laterais e solenídios no tarso da perna 2 (WELBOURN et al., 2003). Contudo, o uso de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais (RODRIGUES et al., 2004; NAVIA et al., 2013) sugeriram a existência de



espécies crípticas dentro de *B. phoenicis*, que havia sido tido como vetora do CiLV-C. Uma reavaliação desta espécie, feita após a introdução de novos critérios morfológicos para identificação das espécies, como padrão da reticulação da cutícula dorsal do propodossoma e do opistosoma, padrão da reticulação da cutícula ventral, microplacas e espermateca resultou no seu desmembramento em 8 espécies (BEARD et al., 2015). Isto levou à necessidade de uma revisão de quais espécies que atuariam como vetoras. Assim, até o momento, dentre as espécies listadas, o vetor de CiLV-C seria *B. yothersi* (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2016); experimentalmente *B. papayensis* transmitiu este vírus (NUNES et al., 2017). CoRSV é transmitido por *B. papayensis* (NUNES et al., 2017). *B. yothersi* transmite também CiLV-C2 (ROY et al., 2015), além do PfGSV, CICSV e CoRSV. *B. phoenicis* sensu stricto seria o vetor de CiLV-N (RAMOS-GONZÁLEZ et al., 2017). CiCSV descrito no Piauí seria transmitido por um morfotipo de *B. yothersi* (CHABI-JESUS et al., 2018). *B. californicus* transmite OFV incluindo os isolados que infetam plantas cítricas (GARCIA-ESCAMILLA et al., 2018). *B. obovatus* é o vetor de SvRSV (FERREIRA, 2007; TASSI et al., 2019).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Criação dos ácaros *Brevipalpus*

A criação dos ácaros *Brevipalpus* ocorreu em condição de laboratório, em folhas destacadas, inicialmente de ligustro (*Ligustrum lucidum*). As arenas de criação foram organizadas em pratos plásticos com espuma, sob as quais as folhas eram acondicionadas com suas margens cercadas por algodão para impedir a perda de umidade, com fotoperíodo de 12 horas e temperatura controladas, sendo a temperatura sempre próxima dos 25°C. As folhas de ligustro utilizadas para a criação, foram coletadas de plantas assintomáticas presentes no campus da ESALQ. Todas as folhas foram previamente lavadas e desinfestadas com álcool 70%, para eliminar possíveis organismos presentes como ácaros predadores, fungos, etc. A fim de oferecer uma superfície irregular, que pudesse servir como proteção aos ácaros e seus ovos para uma melhor colonização, pincelou-se nas folhas uma suspensão de uma mistura de areia, farinha e gesso.

Folhas e ramos de alfeneiro (*L. sinense* ou *L. lucidum*) do parque da ESALQ, parques e jardins residenciais da cidade de Piracicaba, foram inspecionadas para coleta de *Brevipalpus* com auxílio de uma agulha de ponta fina ou pincel de fio único, sob lupa estereoscópica.

Colônias iniciais foram feitas coletando-se todos os ácaros adultos presentes. Numa segunda etapa da criação, aproveitando o fato de muitas espécies de *Brevipalpus* reproduzirem-se por partenogênese telítoca (CHILDERS et al., 2003), procurou-se formar isolinhas, ou seja, colônias formadas a partir de um único ácaro. Pela partenogênese telítoca, em que fêmeas geram fêmeas, sem necessidade de fertilização, uma fêmea pode gerar uma colônia, em termos práticos, clonal, após oviposições sucessivas, o que permite organizar experimentos biológicos com indivíduos geneticamente semelhantes.

Tendo havido problemas de contaminação das colônias isolinhas com ácaros fungívoros (do gênero *Tyrophagus*) e predadores principalmente fitoseídeos, foram também utilizados em alguns experimentos *Brevipalpus* diretamente retirados das plantas.

#### 3.2. Fonte de inóculo e origem dos ácaros

A principal fonte de inóculo da pinta verde foram de folhas sintomáticas de *L. sinense* encontradas em Piracicaba-SP, na Rua Campos Salles, 22°43'22.6"S 47°37'57.6"W. Tal fonte

de inóculo foi selecionada devido a facilidade de acesso e grande presença de folhas sintomáticas e ácaros *Brevipalpus*, na qual já foram encontrados *B. obovatus*, *B. yothersi*, *B. californicus* e *B. papayensis* (TASSI, 2018).

### **3.3. Identificação dos ácaros *Brevipalpus***

Como acima mencionado, diferentes espécies de *Brevipalpus* foram encontradas co-infestando plantas de *Ligustrum* (TASSI, 2018). A fim de confirmar a identidade dos ácaros utilizados neste trabalho, em especial para formação de colônias isolinhas e nos ensaios de transmissão, os indivíduos foram fixados em etanol, montados em lâminas para microscopia de luz com uso de meio de Hoyer, mantidos em estufa à 50°C por cerca de uma semana para secagem da lâmina e, por fim, eram seladas com esmalte incolor. Após a montagem da lâmina, estas eram examinadas em um fotomicroscópio Zeiss Axioimager 2, dotado de sistema de contraste de interferência diferencial (DIC).

Também foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) para a identificação. Para tal, os ácaros eram coletados e fixados em etanol absoluto, secos ao ponto crítico em um aparelho Leica CPD 300, montados em suportes (“stubs”) sobre fita adesiva com carbono de dupla face, cobertas com fina camada de ouro em um “sputter coater” Baltec SCD 050 e examinadas em um MEV JEOL JSM IT300, e as imagens registradas digitalmente. Detalhes como padrão da reticulação da cutícula dorsal e ventral, número de setas latero-dorsais e solenídio no tarso do solenídio 2, microplacas e espermateca foram observadas para a identificação das espécies conforme Beard et al. (2015). Para ambas as técnicas a Dra. Aline D. Tassi foi a responsável pela correta identificação dos espécimes.

### **3.4. Confirmação das espécies de *Brevipalpus* vetoras de PfGSV-Lig**

Tassi (2018) havia verificado que PfGSV-Lig teria *B. phoenicis* como vetor nas descrições iniciais, seria transmitido pelas espécies *B. yothersi* e, em menor eficiência, por *B. papayensis*, seguindo as novas normas de identificação do grupo *B. phoenicis*. Foram realizados experimentos preliminares de transmissão usando isolinhas, em que ácaros de colônias isolinhas sadias eram postos para se alimentar em folhas sintomáticas com PfGSV-Lig e transferidos para folhas sadias de diferentes espécies de *Ligustrum*.

### 3.5. Uso de diferentes variedades de feijão para planta indicadora

Na maioria das hospedeiras, os sintomas de infecção (lesões localizadas cloróticas ou anelares) pelo PFGSV-Lig levam cerca de quatro semanas para se manifestar. Visando reduzir este tempo, foi utilizada como indicadora da infecção o feijoeiro cv. UNA (*Phaseolus vulgaris*), que já vem sendo usada para detecção do CiLV-C e também reconhecida como suscetível ao PFGSV (GARITA et al., 2013). Contudo, em vários experimentos sua atuação como indicadora não foi eficiente. Assim foram testadas outras cultivares de feijão, da coleção da Seção Centro de Grãos e Fibras do Instituto Agronômico de Campinas (cortesia do Dr. Sergio A.M. Carbonell) como cv. “Carioca”, “IPA6”, “Branco”, “H96A5P51-1”, “G 5733”, “Joaçaba”, “A-328”, além de caupi (*Vigna unguiculata*).

### 3.6. Avaliação da gama de hospedeiras

A fim de se avaliar as espécies de plantas suscetíveis à infecção pelo PFGSV-Lig foram feitas duas séries de experimentos. No primeiro, plantas sadias envasadas, sadias, eram expostas aos ácaros *B. yothersi* coletados de *L. sinense* sintomáticos. Em outro experimento, plantas eram encostadas com plantas de *L. sinense* sintomáticas e infestadas por *B. yothersi*, e mantidas em condições de casa-de-vegetação, a fim de que os ácaros virulíferos se movessem do alfeneiro para as ensaiadas e causassem infecção, se suscetíveis.

### 3.7. Identificação de plantas naturalmente infetadas pelo PFGSV-Lig

Levantamentos de VTB eram feitos frequentemente em parques e jardins nas zonas urbanas de várias cidades de diferentes unidades da federação. Plantas exibindo manchas cloróticas/anelares em folhas verdes ou manchas verdes em folhas senescentes, em geral associadas à infestação com ácaros *Brevipalpus*, quando encontradas, suas folhas eram amostradas. Tecidos das lesões eram processados para exame de secções ao microscópio eletrônico de transmissão, e quando viável, submetidos a extração de RNA total seguido de reação de RT-PCR, utilizando-se primers para diferentes VTB, sendo eles SvRSV, LigLV, PFGSV e CiLV-C.

### 3.8. Determinação de parâmetros de transmissão

Dados importantes para avaliar as relações vírus-vetor, como período de acesso de aquisição (PAA), de inoculação (PAI) e retenção (período em que o ácaro prossegue transmitindo o vírus após alimentação) foram avaliados com ácaros coletados da fonte de inóculo e de colônias avirulíferas mantidas em laboratório. A presença ou ausência do PfGSV-Lig na fonte de inóculo e nas lesões que surgiram após a inoculação foi confirmada por métodos moleculares e morfológicos.

### **3.8.1. Período de acesso de aquisição (PAA)**

Para determinar o período de acesso de aquisição foram realizados três experimentos, sendo dois em folhas destacadas e um em vasos de feijões. Foram utilizados dez ácaros de colônias avirulíferas para cada repetição, transferidos para folhas de *L. sinense* sintomáticas, e deixadas a se alimentarem por tempos variados: 2, 4, 8, 12, 24 h. Após estes períodos os ácaros foram transferidos para folhas da planta indicadora (feijoeiro). Estas ficaram sob observação até o aparecimento de sintomas de infecção (lesões localizadas). Cada tratamento teve três repetições. O tempo mínimo de duas horas tem por referência os experimentos realizados com CiLV-C (TASSI et al., 2017).

### **3.8.2. Período de acesso de inoculação (PAI)**

Para determinar o período de acesso de inoculação (PAI) foram coletados ácaros da fonte de inóculo de Piracicaba com PfGSV-Lig. Foram realizados quatro experimentos, sendo os três primeiros, dois em folhas destacadas e um em vaso de feijão, com dez ácaros transferidos para folha da planta indicadora, permitindo a alimentação por 2, 4, 8, 12 e 24 h, enquanto o quarto experimento foi realizado em folha destacada, com dez ácaros transferidos para folha indicadora e permitindo alimentação por 4, 8, 12, 24 e 48h. Após esses períodos os ácaros eram removidos da folha de feijão e transferidos para uma nova folha, que serviu de controle.

O quarto experimento, que contou com horários distintos de alimentação em relação aos outros três, contou também com uma seleção prévia, em lupa, dos ácaros da fonte de inóculo, priorizando os ácaros de menor tamanho, de modo a evitar espécies como *B. obovatus* e *B. californicus* que não possuem indícios de transmissão do vírus. Períodos inferiores há duas horas não foram testados visto que há um período de adaptação dos ácaros após a transferência

da folha, no qual ele possivelmente não se alimenta. As plantas indicadoras ficaram sob observação até o aparecimento dos sintomas. Cada tratamento foi realizado com três repetições.

### **3.8.3. Período de retenção**

Para determinar o período de retenção, foram realizados dois experimentos, o primeiro com folhas destacadas e o segundo em vasos de feijões usados como indicadores. Foram utilizados cinquenta ácaros coletados da fonte do inóculo, para cada repetição, no início de cada experimento. Os ácaros foram transferidos para plantas ou folhas sadias de feijoeiro, e a folha sadia trocada a cada dois dias, sendo que cada tratamento possuía duas repetições. A duração do experimento foi equivalente ao período com a presença de ácaros nas plantas.

## **3.9. Detecção molecular do vírus em plantas sintomáticas**

A fim de comprovar que as lesões presentes nas folhas inoculadas foram causadas pela inoculação de PfGSV-Lig, foram analisadas molecularmente através de ensaios de RT-PCR. Foram testadas folhas não infectadas como controle negativo, e lesões lepróticas em ligustro, como controle positivo.

A detecção molecular do PfGSV-Lig tanto no material usado como inóculo, como nas lesões que surgiram em plantas suscetíveis, após inoculação, foi feita pelo processo de RT-PCR, usando primers já desenvolvidos para detecção do LigLV, PfGSV e SvRSV (ANTONIOLI-LUIZON, 2010; FERREIRA et al., 2007). O protocolo de extração de RNA total utilizou o reagente Trizol (Invitrogen®) e seguiu as recomendações do fabricante com modificações, assim como foi utilizado um protocolo de extração do Kit Pure Link Viral RNA/DNA (Invitrogen®).

Os iniciadores utilizados para a identificação dos vírus estão listados na tabela 1.

Tabela 1 – Informações e referências dos iniciadores utilizados para a identificação dos vírus via diagnóstico molecular

| Vírus  | Iniciadores (5' - 3') |                             | Referência                     | Temp. de anelamento | Tamanho (pb) |
|--------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------|
| CilV-C | MP                    | F: GCGTATTGGCGTTGGATTTCTGAC | (Locali et al. 2003)           | 56°C                | 339          |
|        |                       | R: TGTATACCAAGCCGCCTGTGAACT |                                |                     |              |
| LigLV  | RdRp                  | F: AATCTAGCTCAAAACCCACA     | (Ramos-González et al. 2020)   | 54°C                | 443          |
|        |                       | R: ATCTCCTGATCTACGCTGAA     |                                |                     |              |
| PfGSV  | MP                    | C6F: CACCTTAAAATTTCGAGGGTT  | (Antonioli-Luizon et al. 2010) | 56°C                | 245          |
|        |                       | C6R: CGATATTTGATCAATCCGTT   |                                |                     |              |
| SvRSV  | RdRp                  | 1F: TGTCGAACTTTGGTATGAGTCG  | (Ferreira et al. 2007)         | 56°C                | 596          |
|        |                       | 2R: CCGGTTTCGTCAAATAACTCC   |                                |                     |              |

Após a extração de RNA total dos ácaros, foi feita a síntese de cDNAs, utilizando kit Promega®, usando o programa de 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos, 70° por 15 minutos e 4°C por tempo indeterminado. Após esta etapa foi realizada RT-PCR usando 0,2 µL dos iniciadores específicos, 1 µL de cDNA, 5 µL de master mix e 3,6 µL de H<sub>2</sub>O.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese e, após, visualizados em gel de agarose 1% (TBE 0,5X).

### 3.10. Microscopia eletrônica de transmissão

Outro critério utilizado para confirmar a transmissão natural ou experimental do PfGSV-Lig, além do ensaio molecular, foi o exame de secções das lesões encontradas nas plantas, presumivelmente infetadas. Para tal, pequenos fragmentos dos tecidos das lesões foram fixados em uma mescla de paraformaldeído (2%) e glutaraldeído (2,5%), em tampão cacodilato 0,05 M pH 7,2 por pelo menos uma hora, seguida de pós-fixação em solução 1% de OsO<sub>4</sub>, desidratação em acetona, infiltração e emblocamento em resina epóxica Spurr. Os blocos foram seccionados em ultramicrotomo Leica UT6 equipado com navalha de diamante Diatome e as secções (70-100 nm de espessura), montadas em “telinhas” de cobre de 300 mesh, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1011, e as imagens registradas digitalmente.

### 3.11. Transmissão mecânica do vírus

CiLV-C foi o primeiro cilevirus a ter confirmada a transmissão mecânica de citros para citros e para algumas plantas indicadoras, embora com dificuldade (COLARICCIO et al., 1995). SvRSV, um presumível cilevirus pode também ser transmitido mecanicamente para *Chenopodium quinoa* (FERREIRA et al., 2007). A fim de verificar a possibilidade de transmissão mecânica do PfGSV-Lig, foram testados três tampões para o preparo do extrato a ser utilizado nos ensaios: Tampão fosfato convencional K 0,01M pH 7,2, nicotina 2%, sulfito de Na 0,1%, carvão ativado 0,03%; tampão para inoculação de CiLV-C (A) com ácido ascórbico 0,1%, cisteína 0,01%, 0,5% mercaptoetanol, Tris 0,1% pH 8; e tampão para inocular CiLV-C (B), com tampão fosfato pH 7, 0,05M, 0,005M Na-Dieca, 0,001M EDTA, 0,005 M Na tioglicolata. As plantas-teste utilizadas foram *C. quinoa* e *Gomphrena globosa*.





## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Identificação dos ácaros

No presente trabalho foram detectados na população de *Brevipalpus*, presente no material amostrado, todas as espécies anteriormente relatadas por TASSI & KITAJIMA (2016), ou seja, *B. yothersi*, *B. obovatus*, *B. papayensis* e *B. californicus* (Fig.1), com exceção de *B. salasi*, sendo as quatro espécies listadas utilizadas nos experimentos desenvolvidos. Vale ressaltar que a quantidade de *B. californicus* mostrou-se superior às demais espécies encontradas na fonte inóculo.

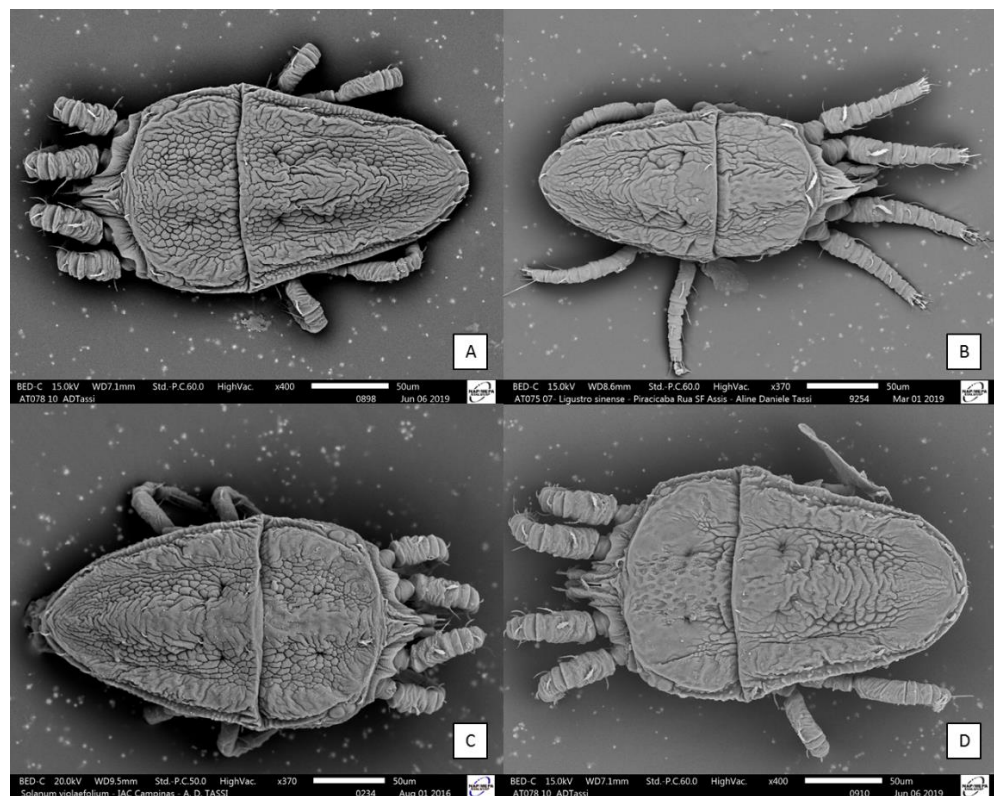


Figura 1: Espécies de *Brevipalpus* identificadas: A- *B. californicus*; B- *B. yothersi*; C- *B. obovatus*; D- *B. papayensis*

### 4.2. Tentativas de formação de colônias isolinhas

As tentativas iniciais de se obter colônias isolinhas, a partir de indivíduos coletados das populações de *Brevipalpus* presentes em alfeneiros sintomáticos da fonte utilizada foram

feitas em folhas de *L. lucidum*, mantidas em condições de laboratório. Ácaros adultos foram colocados individualmente sobre as folhas, como descrito na metodologia e acompanhados diariamente durante um mês. Os resultados não foram satisfatórios. Assim, nas 10 isolinhas que tiveram melhor taxa de reprodução, o número de adultos presentes após um mês variou de 2 a 11, muito abaixo do esperado e necessário para os experimentos de transmissão. Parte dos problemas do fraco desenvolvimento das colônias foi a contaminação destas por ácaros predadores.

A seguir foram testadas folhas de outras plantas como *Ligustrum ovalifolium*, madressilva (*Lonicera japonica*), maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) e manacá (*Brunfelsia uniflora*). O uso de folhas de *L. ovalifolium* resultou em uma melhor colonização do que em *L. lucidum*, mas mesmo assim, a taxa de colonização não foi suficiente.

#### **4.3. Avaliação de diferentes cultivares de feijoeiro como indicadora da infecção por PfGSV-Lig**

O feijoeiro cv. 'UNA' é a planta teste utilizada com sucesso, como indicadora da infecção pelo CiLV-C (GARITA et al., 2013). Quando testado para PfGSV-Lig, nos ensaios preliminares houve uma inconsistência nos resultados e assim foram avaliadas outras cultivares de feijoeiro, pertencentes ao banco de germoplasma do Instituto Agrônomo de Campinas. Das 9 cultivares de feijoeiro testados, sete apresentaram lesões necróticas quando infestadas com ácaros coletados de alfineiro sintomático (Tabela 1). Nesta série de experimentos apenas a cv. 'UNA' e feijão branco, não apresentaram lesões. Uma amostra de caupi, incluída no experimento, também não reagiu com lesões. Os títulos dos vírus nas lesões possivelmente eram muito baixos, ou teria ocorrido degradação dos vírions nas lesões necróticas, pois os ensaios de RT-PCR destas lesões, para primers específicos de PfGSV-Lig, tiveram resultados negativos.

Tabela 2 – Resultados para infecção por PfGSV-Lig após infestação por *B. yothersi*

| Cultivar                           | PfGSV-Lig |
|------------------------------------|-----------|
| Carioca                            | +         |
| IPA6                               | +         |
| Branco                             | -         |
| H96A5P1-1                          | +         |
| G 5733                             | +         |
| Joaçaba                            | +         |
| A-328                              | +         |
| Vigna ( <i>Vigna unguiculata</i> ) | -         |
| UNA                                | -         |

#### 4.4. Gama de hospedeiras do PfGSV-Lig

##### 4.4.1. Plantas encontradas naturalmente infectadas pelo PfGSV-Lig

Historicamente, no Brasil o que hoje identificamos como PfGSV-Lig, foi encontrado infetando naturalmente várias espécies de *Ligustrum*. A primeira constatação foi em Curitiba, em cerca viva de *L. lucidum*, no campus da UFPr (LIMA NETO, LIMA & SOUZA, 1994). Logo a seguir, condição similar foi constatada em *L. lucidum* e *L. sinense* em Águas de São Pedro, SP, associada à infestação por *B. phoenicis* (RODRIGUES, NOGUEIRA & FREITAS, 1996; NOGUEIRA, RODRIGUES & ROSSI, 2004).

Infecção natural de *Ligustrum* spp. tem sido verificado em várias localidades do país, além das acima mencionadas: estado de São Paulo- Piracicaba, São Carlos, Monte Alegre do Sul, Santa Barbara d'Oeste, Americana, Jundiaí (em *L. sinense*, *L. lucidum*), estado do Paraná (*L. japonicum*), e Distrito Federal- Brasília (*L. sinense*). Em todos estes casos, confirmou-se por RT-PCR e microscopia eletrônica a presença de PfGSV-Lig.

Manchas verdes em folhas senescentes da árvore guarda-chuva (*Schefflera actinophylla*) e hera (*Hedera canariensis*) descritas em 1999 (KITAJIMA et al., 1999) foram verificadas como sendo causada pelo PfGSV-Lig (KITAJIMA et al., 2017) e também confirmadas no presente trabalho, por RT-PCR (Figura 2).

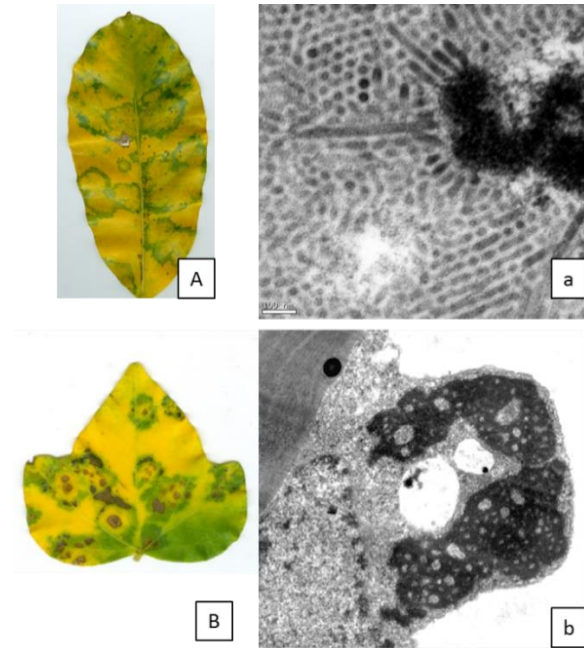


Figura 2 – Sintomas causados por PfGSV-Lig em *Schefflera actinophylla* (A) e em *Hedera canariensis* (B), e seus respectivos cortes em MET com ênfase no vírus (a e b)

Mancha anelar em folhas de manacá (*Brunfelsia uniflora*) foi relatada por NOGUEIRA et al. (2001) associada a presença de citopatologia similar à da leprose dos citros. Mais recentemente casos similares foram constatados em Piracicaba e São José do Rio Preto/SP, confirmando a presença de partículas do tipo cilevirus, e a associação com infestação por *B. yothersi*, sendo confirmada a presença de PfGSV-Lig nos ensaios de RT-PCR e por microscopia (Figura 3).

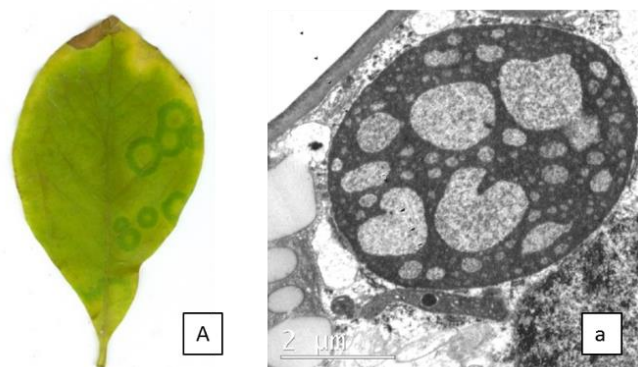


Figura 3 - Sintomas causados por PfGSV-Lig em *Brunfelsia uniflora* (A) e o corte em MET (a)

Manchas anelares em folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora*) associadas a efeitos citopáticos do tipo causados por cilevirus foi descrita em Águas de São Pedro/SP (NOGUEIRA & ROSSI, 2004) e recentemente encontrada em Piracicaba/SP. Os sintomas típicos (Figura 4) e os ensaios de RT-PCR detectaram a presença de PfGSV-Lig.

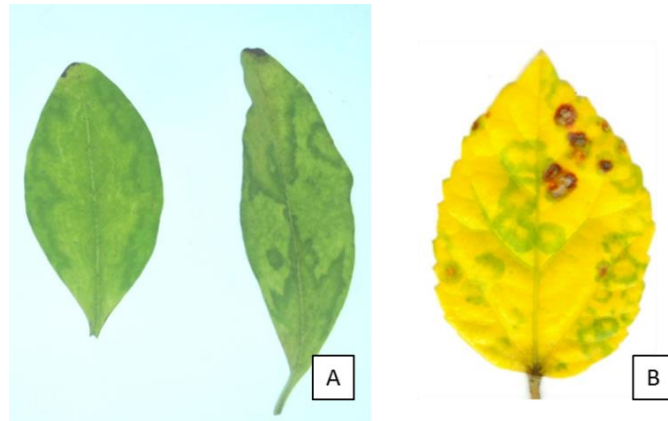


Figura 4 - Sintomas causados por PfGSV-Lig em *Eugenia uniflora* (A) e *Hibiscus rosa-sinensis* (B)

Uma planta de madressilva (*Lonicera japonica*) foi encontrada nos jardins da SQN 212 em Brasília/DF, com sintomas de mancha verde em folha senescente, associada a efeitos citopáticos do tipo causado por cilevirus. Posteriormente casos similares foram notados em Piracicaba, Jundiaí e Nova Odessa/SP. Ensaio de RT-PCR e microscopia indicaram a presença de PfGSV-Lig (A.D. TASSI & E.W. KITAJIMA, com.pess.) (Figura 5).

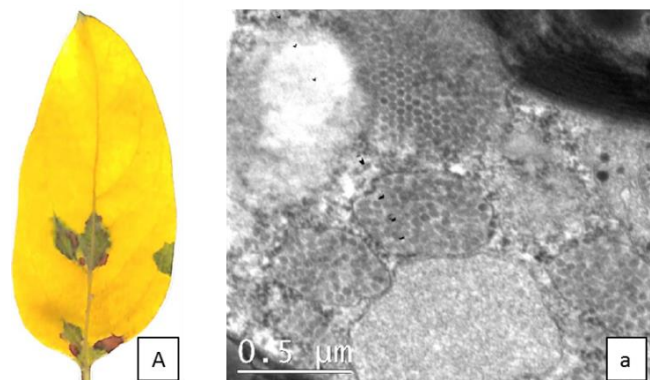


Figura 5 - Sintoma causador por PfGSV-Lig em *Lonicera japonica*(A) e seu corte em MET (a)

No decorrer do trabalho, houveram também tentativas de transmissão experimental, por transferência de ácaros coletados diretamente de alfeneiros sintomáticos, e infectados por *B. yothersi* e *B. obovatus*, para as potenciais hospedeiras. Outra tentativa foi colocando as plantas a serem avaliadas, junto ao alfeneiro infectado e infestado por ácaros, em condições de casa de vegetação. As plantas foram acompanhadas por várias semanas e diversas delas exibiram sintomas localizados (manchas necróticas, cloróticas, anelares em folhas verdes, ou manchas verdes, em folhas senescentes), e invariavelmente apresentaram-se infestadas por ácaros *B. obovatus* e *B. yothersi*. Quando constatadas as lesões, estas foram coletadas e avaliadas por RT-PCR para a presença de PfGSV-Lig e também preparadas para exames de secções ao microscópio eletrônico de transmissão. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Hospedeiras de PfGSV-Lig identificadas após infestação por *B. yothersi*

| Hospedeira                         | Família        | Sintomas | RT-PCR   | MET      |
|------------------------------------|----------------|----------|----------|----------|
| <i>Annona muricata</i>             | Annonaceae     | lln      | nt       | positivo |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>        | Brassicaceae   | llc      | nt       | positivo |
| <i>Beta vulgaris sp. vulgaris</i>  | Amaranthaceae  | llc      | positivo | positivo |
| <i>Brunfelsia uniflora</i>         | Solanaceae     | mv       | nt       | positivo |
| <i>Capsicum annuum</i>             | Solanaceae     | llc      | positivo | positivo |
| <i>Catharanthus roseus</i>         | Apocynaceae    | ma       | nt       | positivo |
| <i>Chenopodium quinoa</i>          | Amaranthaceae  | lln      | nt       | positivo |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i>   | Amaranthaceae  | llc      | positivo | positivo |
| <i>Clerodendrum speciosissimum</i> | Lamiaceae      | lln      | positivo | positivo |
| <i>Cordyline sp.</i>               | Asparagaceae   | mc       |          | positivo |
| <i>Datura stramonium</i>           | Solanaceae     | llc      | positivo | positivo |
| <i>Dendrobium sp.</i>              | Orchidaceae    | llc      | positivo | positivo |
| <i>Epidendrum sp.</i>              | Orchidaceae    | llc      | nt       | positivo |
| <i>Galinsoga parviflora</i>        | Asteraceae     | mv       | negativo | positivo |
| <i>Hedera canariensis</i>          | Araliaceae     | ma       | nt       | positivo |
| <i>Hibiscus cannabinus</i>         | Malvaceae      | llc      | nt       | positivo |
| <i>Hibiscus rosa sinensis</i>      | Malvaceae      | mv, llc  | positivo | positivo |
| <i>Hibiscus schizopetala</i>       | Malvaceae      | mv       | positivo | positivo |
| <i>Hibiscus syriacus</i>           | Malvaceae      | mv       | positivo | positivo |
| <i>Ligustrum japonicum</i>         | Oleaceae       | llc      | positivo | positivo |
| <i>Ligustrum lucidum</i>           | Oleaceae       | llc      | positivo | positivo |
| <i>Ligustrum ovalifolium</i>       | Oleaceae       | llc      | positivo | positivo |
| <i>Ligustrum sinense</i>           | Oleaceae       | llc, mv  | positivo | positivo |
| <i>Lonicera japonica</i>           | Caprifoliaceae | mv       | positivo | positivo |
| <i>Malva viscosa</i>               | Malvaceae      | mv       | nt       | positivo |
| <i>Nicotiana tabacum</i>           | Solanaceae     | llc      | negativo | positivo |
| <i>Passiflora edulis</i>           | Passifloraceae | llc      | nt       | positivo |
| <i>Passiflora morifolia</i>        | Passifloraceae | mv       | positivo | positivo |
| <i>Petunia hybrida</i>             | Solanaceae     | llc      | positivo | positivo |
| <i>Phaseolus vulgaris</i>          | Fabaceae       | llc      | nt       | positivo |
| <i>Philodendron selloum</i>        | Araceae        | llc      | positivo | positivo |
| <i>Salvia leucantha</i>            | Lamiaceae      | llc      | positivo | positivo |
| <i>Solanum aculeatissimum</i>      | Solanaceae     | lln      | nt       | positivo |
| <i>Solanum lycopersicon</i>        | Solanaceae     | llc      | nt       | positivo |
| <i>Solanum melongena</i>           | Solanaceae     |          | nt       | positivo |
| <i>Solanum nigrum</i>              | Solanaceae     | llc      | nt       | positivo |
| <i>Solanum tuberosum</i>           | Solanaceae     | llc      | positivo | positivo |
| <i>Solanum violifolium</i>         | Solanaceae     | lln      | positivo | positivo |
| <i>Spinacia oleracea</i>           | Amaranthaceae  |          | nt       | positivo |
| <i>Thunbergia erecta</i>           | Acanthaceae    |          | positivo | positivo |

llc – Lesão localizada clorótica; lln – lesão localizada necrótica; ma – mancha anelar; mv- mancha verde; nt – não testado.



Verificou-se que experimentalmente PfGSV-Lig transmitido por ácaros *Brevipalpus* (no caso, *B. yothersi*) reproduziu as lesões constatadas na natureza em manacá (*B. uniflora*), *Cordyline* sp. (FERREIRA et al., 2004), hera (*Hedera canariensis*) (KITAJIMA et al., 1999), salvia branca (*Salvia leucanta*) (KITAJIMA & FERREIRA, 2003), orquídeas (*Dendrobium* sp., *Epidendrum* sp.) (FREITAS-ASTÚA, REZENDE & KITAJIMA, 1999; KUBO et al., 2006), manta-do-rei (*Thunbergia erecta*) (NOGUEIRA, RODRIGUES & ROSSI, 2002). Em todos estes casos, não houve, na ocasião da descrição, a identificação do vírus, mas é possível que PfGSV-Lig estivesse implicado, já que em condições experimentais, lesões similares foram produzidas por este vírus.

Embora exames de secções das lesões ao microscópio eletrônico de transmissão houvessem confirmado a presença de cilevirus nos tecidos, nem sempre foi possível fazer os ensaios de RT-PCR pela pequena quantidade de amostras. Em alguns casos, os resultados foram negativos possivelmente pela limitada quantidade do material viral ou inibidores presentes no material coletado.

Nas secções das lesões decorrentes da infecção pelo PfGSV-Lig, como ocorre na infecção por outros cilevirus (KITAJIMA, CHAGAS & RODRIGUES, 2003) destaca-se a presença de inclusões citoplasmáticas eletrôn-densas e vacuoladas, em geral de perfil elipsoide, de dimensões variadas em torno de 5-10 µm de diâmetro e/ou de partículas baciliformes e curtas (70-80 nm x 110-120 nm) providas de membranas e contidas nas cisternas do retículo endoplasmático.

#### **4.5. Ensaios de transmissão mecânica**

Utilizando plantas de *Chenopodium quinoa* e *Gomphrena globosa* como indicadoras, e avaliando diferentes tampões de extração a partir de *L. sinense*, não houve a transmissão mecânica do PfGSV-Lig, embora em alguns casos tenha ocorrido transmissão de outros cilevírus, como CiLV-C e SvRSV. Esta modalidade de ensaio, contudo, deve ser reavaliada, usando um espectro maior de plantas-teste e outros tampões de extração.

#### **4.6. Determinação dos parâmetros de transmissão por ácaros**

Pelos motivos anteriormente expostos (dificuldades em obter e manter colônias isolinhas), os experimentos de determinação de PAA e PL não tiveram resultados satisfatórios,

quando realizados com ácaros diretamente coletados de *L. sinense* sintomáticos (PL) ou com os ácaros presentes em colônias mistas do laboratório (PAA).

Dos quatro experimentos de PAI o quarto obteve resultados visuais positivos tanto para 24h quanto para 48h, e apesar de ser necessários outros experimentos comprobatórios, isto sugere PfGSV-Lig possua um PAI maior do que o encontrado para CiLV-C, além de que *B. obovatus* e *B. californicus*, provavelmente não sejam capazes de transmitir o vírus.

Outra questão que provavelmente influenciou a dificuldade em obter resultados positivos nos experimentos foi a grande presença de *B. californicus*, que compunha metade da população, sendo que esta não é tida como espécie vetora, e do restante, metade eram *B. yothersi* e a outra, *B. obovatus*, que também não é uma espécie tida como vetora.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar das dificuldades observadas durante o trabalho, tanto de se obter colônias isolinhas de *Brevipalpus* coletados de *Ligustrum* spp. sintomáticos, quanto problemas com ácaros predadores e a grande presença de ácaros possivelmente não vetores, foi possível obter dados preliminares em relação ao PAI, sendo provavelmente menor que 24h, e de que os ácaros *B. obovatus* e *B. californicus* não transmitiriam PfGSV-Lig.

Foi possível verificar a presença de várias espécies de plantas naturalmente infectadas pelo PfGSV-Lig, e os experimentos de transmissão em condições de casa-de-vegetação mostraram grande número de plantas suscetíveis a este vírus, confirmadas por exames citopatológicos e ensaios moleculares. Em vários casos, houve indicação de que relatos anteriores de infecção por possíveis cilevirus poderiam ser atribuídos ao PfGSV-Lig.



## REFERÊNCIAS

- ALBERTI, G.; KITAJIMA, E.W. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae) – Economically important plant-virus vectors. Part 2: Gnathosoma. **Zoologica** 160: 11-66. 2014.
- ALBERTI, G.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae) – Economically important plant-virus vectors. Part 6. Female reproductive system. **Zoologica** 160: 144-172.
- ALBOUY, J.; DEVERGNE, J.C. Enfermedades producidas por virus de plantas ornamentales. **INRA**, Paris. 2000.

AMARASINGHE, G.K., AYLÓN, M.A., BAO, Y.M., BASLER, C.F., BAVARI, S., BLASDELL, K.R., BRIESE, T., BROWN, P.A., BUKREYEV, A., BALKEMABUSCHMANN, A., BUCHHOLZ, U.J., CHABI-JESUS, C., CHANDRAN, K., CHIAPPONI, C., CROZIER, I., DE SWART, R.L., DIETZGEN, R.G., DOLNIK, O., DREXLER, J.F., DÜRRWALD, R., DUNDAN, W.G., DUPREX, W.P., DYE, J.M., EASTON, A.J., FOOKS, A.R., FORMENTY, P.B.H., FOUCHIER, R.A.M., FREITAS-ASTÚA, J., GRIFFITHS, A., HEWSON, R., HOLMES, E., HORIE, M., HURWITZ, J.L., HYNDMAN, T.H., JIĀNG, D., KITAJIMA, E.W., KOBINGER, G.P., KONDŌ, H., KURATH, G., KUZMIN, I.V., LAMB, R.A., LAVAZZA, A., LEE, B., LELLI, D., LEROY, E.M., LĚ, J., MAES, P., MARZANO, MORENO, A., S-Y.L., MÜHLBERGER, E., NETESOV, S.V., NOWOTNY, N., NYLUND, A., OKLAND, A.L., PALACIOS, G., PÁLYI, B., PAWĘSKA, J.T., PAYNE, S.L., PROSPERI, A., RAMOS-GONZÁLEZ, P.L., RIMA, B.K., ROTA, P., RUBBENSTROTH, D., SHI, M., SIMMONDS, P., SMITHER, S.J., SOZZI, E., SPAN, K., STENGLEIN, M.D., STONE, D.M., TAKADA, A., TESH, R.B., TOMONAGA, K., TORDO, N., TOWNER, J.S., VAN DER HOOGEN, B., VASILAKIS, N., WAHL, V., WALKER, P.J., WANG, D., WANG, L.F., WHITFIELD, A.E., WILLIAMS, J.V., ZERBINI, F.M., ZHANG, T., ZHĀNG, Y.Z. AND KUHN, J.H. Taxonomy of the Order Mononegavirales: update 2019. **Archives of Virology** 164 (7): 1967-1980. 2019.

ANTONIOLI-LUIZON, R. Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PfGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética. **Diss.MS, PG Microbiologia Agrícola, ESALQ/USP.70p.** 2009

BEARD, J.J.; OCHOA, R.; BRAWELL, W.E.; BAUCHAN, G. *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) species complex (Acari: Tenuipalpidae)- a closer look. **Zootaxa** 3944. 67p. 2015.

- BITANCOURT, A.A. Leprose e a próxima colheita da laranja. **O Biológico** 3(2): 37-40. 1937.
- BITANCOURT, A.A. A mancha anular, uma nova doença do cafeeiro. **O Biológico** 4: 404-405. 1938.
- CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; TASSI, A.D.; GUERRA-PERAZA, J.E.A.; KITAJIMA, E.W.; HAKAKAVA, R.; BESERRA J.R.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTUA, J. Identification and characterization of citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis-like symptoms. **Plant Disease** 102: 1588-1589. 2018a.
- CHABI-JESUS, C.; RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; BARRO, M.P.; BANGUELA-CASTILLO, A.; BASTIANEL M.; CANALE, M.C.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Genome characterization of a tentative new species of citrus leprosis-causing dichorhavirus: citrus bright spot virus. In: **Congresso Brasileiro de Virologia**, 2018b.
- CHABI-JESUS, C., RAMOS-GONZÁLEZ, P.L., GUERRA-PERAZA, O., KITAJIMA, E.W., TASSI, A.D., HAKAKAVA, R., BESERRA JR., E.A., FREITAS-ASTÚA, J. Molecular characterization of Citrus chlorotic spot virus, a new dichorhavirus associated with citrus leprosis symptoms. **Plant Disease** 102(8): 1588-1598. 2018.
- CHAGAS, C.M. Mancha anular do cafeeiro: transmissibilidade, identificação do vector e aspectos anátomo-patológicos da espécie *Coffea arabica* L. afetada pela moléstia. **Tese Doutorado**, USP. 132 p. 1978.
- 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. **Exp.Appl.Acarology** 30: 5-28. 2003.



- CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V. & WELBOURN, W.C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus* and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of viral diseases vectored by these mites. **Exp.Appl.Acarology** 30: 29-105. 2003.
- 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. **Exp.Appl.Acarology** 30: 181-202. 2003c.
- COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALLETTI, S.R.; ROSSETTI, V. & KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. **Fitopatol. bras.** 20: 208-213. 1995.
- COOK, G.; CLASE, R.; STEYN, C.; KIRKMAN, W. The first case of Citrus Leprosis-N in **South Africa. Abst. 21st Conf. IOCV** (Riverside , CA). 03-01. 2019
- DIETZGEN, R.G.; KUHN, J.H.; CLAWSON, A.N.; FREITAS-ASTÚA, J.; GOODIN, M.M.; KITAJIMA, E.W.; KONDO, H.; WETZEL, T. & WHITFIELD, A.E. Dichorhavirus: a proposed new genus for Brevipalpus mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. **Archives of virology**, 159 (3), pp.607-619, 2014.
- DOI, Y., ARAI, K. & YORA, K. Ultrastructure of bacilliform virus found in *Euonymus japonicum* with mosaic and *Cymbidium* with ringspot. **Ann. Phytopath. Soc. Japan** 35: 388. 1969.
- FAWCETT, H.S. Scaly bark or nail head rust of citrus. **Florida Agric. Exp. Sta. Bull.** 106. 41p. 1911.
- FERREIRA, P.T.O.; KUBO, K.S. & KITAJIMA, E.W. Ringspots in *Anthurium sp.* and *Cordyline terminalis* associated with cytoplasmic type of Brevipalpus-borne viruses. **Virus Rev. & Res.** 9 (supl.1): 249. 2004.

- FERREIRA, P.T.O.; LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZONI, R.; GOMES, R.T.; MACHADO, M.A. & KITAJIMA, E.W. Caracterização de um vírus baciliforme isolado de *Solanum violaefolium* transmitido pelos ácaros *Brevipalpus phoenicis* e *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). **Summa Phytopathol.** 33: 264-269. 2007.
- FREITAS-ASTUA, J., REZENDE, J.A.M. & KITAJIMA, E.W. Incidence of orchid viruses in the state of São Paulo, Brazil. **Fitopatol. bras.** 24: 125-130. 1999.
- FREITAS-ASTÚA, J., RAMOS-GONZÁLEZ, P.L., ARENA, G.D., TASSI, A.D., KITAJIMA, E.W. Brevipalpus-transmitted viruses: parallelism beyond a common vector or convergent evolution of distantly related pathogens? **Current Opinion in Virology** /doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.010. 2018.
- FREZZI, M.S. La lepra explosiva del naranjo- Investigaciones realizadas por el laboratorio de patologia de Bella Vista (Corrientes). **Bol.Frutas y Hortalizas. Min.Agr.la Nacion** (Buenos Aires) 5. 16p. 1940.
- GARCIA-ESCAMILLA, P.; DURAN-TRUJILLO, Y.; OTERO-COLINA, G.; VALDOVINO-PONCE, G.; SANTILLÁN-GALICIA, M.T.; ORTIZ-GARCIA, C.F.; VELÁSQUEZ-MONREAL, J.J.; SÁNCHEZ-SOTO, S. Transmission of viruses associated with cytoplasmic and nuclear leprosis symptoms by *Brevipalpus yothersi* and *B. californicus*. **Trop. Plant Pathol.** 43: 69-77. 2018.
- GARITA, L.C.; TASSI, A.D.; CALEGARIO R.F.; CARBONELL, S.A.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): experimental local lesion host for Citrus leprosis virus C (CiLV-C) and some other cytoplasmic-type Brevipalpus-transmitted viruses. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 10, p. 1346-1351, 2013.

- HARTUNG, J.S.; ROY, A.; FU, S.; SHAO, J.; SCHNEIDER, W.L.; BRLANSKY, R.H. History and diversity of citrus leprosis virus recorded in herbarium specimens. **Phytopathology** 105: 1277-1284. 2015.
- HELLE, W.; HOLLAND, H.R. & HEITMANS, W.R.B. Chromosome and types of parthenogenesis in the false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica** 54: 445-50. 1980.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, J.C.V; CHILDERS, C.C. Citrus leprosis in Florida, USA, appear to have been caused by the nuclear type of Citrus leprosis virus (CiLV-N). **Virus Review and Research** 16: on line. 2011.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M. & RODRIGUES, J.C.V. Brevipalpus-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Exp. Appl. Acarology** 30: 135-160. 2003.
- KITAJIMA, E.W. & COSTA, A.S. Partículas baciliformes associadas à mancha anular do cafeeiro. **Cien. Cult.** 24: 542-545. 1972.
- KITAJIMA, E.W. & FERREIRA, P.T.O. Mancha verde em folha senescente de *Salvia branca* (*Salvia leucantha*), mais um caso de infecção por vírus similar ao da leprose dos citros. **Summa Phytopathol.** 29: 53. 2003.
- KITAJIMA E.W.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. & YUKI, V.A. Short rodlike particles associated with citrus leprosis. **Virology** 50: 254-258. 1972.
- KITAJIMA, E.W.; NOVAES, Q.S.; REZENDE, J.A.M. & MORAIS, G.J. Short rhabdo- virus-like particles and a caulimovirus in *Hibiscus rosa-sinensis* with green spot. Abst. **Scandem** 99 (Bergen, June 2- 6/99): p.63-64, 1999 (abst.)

- KITAJIMA, E.W.; NOVELLI, V.M. & ALBERTI, G. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae) – Economically important plant-virus vectors. Part 1: An update on the biology and economical importance of *Brevipalpus* mites. **Zoologica** 160: 1-10, 2014.
- KITAJIMA, E.W., PEDRAZZOLI, D.S., NOVAES, Q.S., GIORIA, R., REZENDE, J.A.M., MORAES, G.J. & RODRIGUES, J.C.V. Ivy green spot and Schefflera ringspot: two additional cases of plant diseases caused by citrus leprosis type virus. **Virus Rev.& Res.** 4(supl.1): 148-149, 1999.
- KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M.; RODRIGUES, J.C.V.; CHIAVEGATO, L.G.; PIZA J.R., C.T. & MOROZINI, W. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. **Fitopatol. bras.** 22: 555-559, 1997.
- KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTUA, J. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus*-mite transmitted viruses. **Scientia Agrícola** 67: 348-371, 2010.
- KITAJIMA, E.W., ROSILLO, M.A., PORTILLO, M.M., MULLER, G.W. & COSTA, A.S. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. **Fitopatologia** (Lima) 9: 55-56. 1974.
- KITAJIMA, E.W.; TASSI, A.D.; SAITO, M.S.G.; SALAROLI, R.B.; CHABI-JESUS, C.; FREITAS-ASTÚA, J. Novas espécies hospedeiras do vírus da leprose do ligustro (*Ligustrum leprosis virus- LigLV*). **Summa Phytopathol.** 43 (supl.) C DRom, 2017.
- KONDO, H., MAEDA, T., SHIRAKO, Y. & TAMADA, T. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. **J.gen.Virol.** 87: 2413-2421. 2006.
- KONDO, H.; MAEDA, T. & TAMADA, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. **Exp. Appl. Acarology** 30: 215-223. 2003.

- KNORR, L.C. Studies on the etiology of leprosis in Citrus. Proc. **4th Conf.Int.Org.Citrus Virol.** 332-341. 1968.
- KUBO, K.S.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; STUART, R.M.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA E.W. Novas evidencias sugerem que existem dois virus diferentes causando orchid fleck em orquídeas. **Fitopatol. bras.** 31: S377. 2006.
- LIMA, M.L.R.Z.C.; COSTA LIMA N.O.V. & SOUZA, V.B.V. The causal agent of the Ligustrum ringspot disease. **Phytopathology** 81: 1216. 1991 (abst.)
- LIMA NETO, V. C.; LIMA, M. L. R. Z. C. ; SOUZA, V. B. V. . O agente causador do anel do Ligustrum. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, Curitiba-PR, v. 13, n. 1-2, p. 221-224, 1994.
- LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; MACHADO, M. A. Genus Cilevirus. In Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses; KING, A.; ADAMS, M.; CARSTENS, E.; LEFKOWITZ, E., Eds.; **Elsevier/Avademic Press**: London, United Kingdom; pp. 1139–1142, 2011.
- LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTUA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W. & MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to citrus production in the Americas. **Plant Disease** 87: 1317-1321. 2003.
- LOCALI-FABRIS, E., FREITAS-ASTUA, J., SOUZA, A.A., TAKITA, M.A., ASTUA-MONGE, G., ANTONIOLI-LUIZONI, R., RODRIGUES, V., TARGON, M.L.P.N. & MACHADO, M.A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **J.gen.Virol.** 87: 2721-2729, 2006.
- LOMBARDI, J.A. Oleaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB64144>. 2015.

- LUIZON, R.A. Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus-PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)** - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- MARCHIONATTO, J.B. Argentine Republic: New studies on the “lepra explosiva” of the orange. **Int. Bul. Plant Protection** 9: 173-175. 1935.
- MARQUES, J. P. R. ; KITAJIMA, E. W. ; FREITAS-ASTUA, J. ; APPEZATO-DA-GLORIA, B. Comparative morpho-anatomical studies of the lesions caused by citrus leprosis virus on sweet orange. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 82: 501-511, 2010.
- MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; HU, J.S. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosislike symptoms. **Phytopathology** 102:122–127, 2012.
- MELZER, M.J.; SIMBAJON, N.; CARILLO, J.; BORTH, W.B.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W.; NEUPANE, K.R.; HU, J.S. A cilevirus infects ornamental hibiscus in Hawaii. **Arch.Virol.** 158: 242-2424. 2013.
- MESA, N.C.; OCHOA, R.; WLBROUN, W.C.; EVANS, G.A.; MORAES, G.J. A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the world with a key to genera. **Magnolia Press**, 185p. 2009.
- MUSUMECCI, M.R. & ROSSETTI, V. Transmissão de sintomas de leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Cien. Cult.** 15(3): 228. 1963.
- NAVIA, D.; MENDONÇA, R.S.; FERRAGUT, F.; MIRANDA, L.C.; TRINCADO, R.C.; MICHAUX, J.; NAVAJAS, M. Cryptic diversity in *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae). **Zoologica Scripta** 42, 406-426, 2013.

- NAVIA, D.; NOVELLI, V.M.; ROMBAUTS, S.; FREITAS-ASTÚA, J.; MENDONÇA, R.S.; NUNES, M.A.; MACHADO, M.A.; LIN, Y-C, L.E.; PHUONG, ZHANG, Z.; GRBIC, M.; WYBOUW, N.; BREEUWER, J.A.J.; VAN LEEUWEN, T.; GRBIC, M.; VAN DE PEER, Y. Draft genome assembly of the false spider mite *Brevipalpus yothersi*. **Microbiol Resour Announc** 8, 2019.
- NOGUEIRA, N.L., RODRIGUES, J.C.V. & ROSSI, M.L. *Dracaena marginata* Lam and *Ligustrum sinensis* Loureiro, two new host plants for *Brevipalpus* borne vírus. **Fitopatol.bras.** 29: S234. 2004
- NOGUEIRA, N.L., RODRIGUES, J.C.V. & ROSSI, M.L. Partículas semelhantes a rhabdovirus associadas a sintomas de mancha verde em folhas de manaca (*Brunfelsia sp.*). **Fitopatol. bras.** 26: 513. 2001.
- NOGUEIRA, N.L.; RODRIGUES, J.C.V. & ROSSI, M.L. Partículas semelhantes a rhabdovirus em três plantas ornamentais com sintomas de lesões locais e infestação pelo ácaro *Brevipalpus*. **Fitopatol. bras.** 27 (supl): S210. 2002.
- NOGUEIRA, N.L. & ROSSI, M.L. Partículas baciliformes semelhantes a rhabdovirus em folhas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.- Mirtácea) apresentando lesões locais e presença de ácaros. **Summa Phytopathol.** 30: 111. 2004.
- NUNES, M.A.; CARVALHO MINEIRO, J.L.; ROGERO, L.A.; FERREIRA, L.M.; TASSI, A.D.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W. & FREITAS-ASTUA, J. First report of *Brevipalpus papayensis* Baker (Acari: Tenuipalpidae) as vector of Coffee ringspot virus and Citrus leprosis virus C. **Plant Disease**, doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1000-PDN, 2017.

- PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASSUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.S.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLMN, M.A.; FRANCO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO J.R.H.; OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P.F.; FERRARI, F.; AGUILAR-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 vírus, cytoplasmic type (CiLV-C). **Vírus Genes** 32: 289-298. 2006.
- RAMALHO, T.O.; FIGUEIRA, A.R.; SOTERO, A.J.; WANG, R.; GERALDINO-DUARTE, P.S.; FARMAN, M.; GOODIN, M.M. Characterization of Coffee ringspot virus-Lavras,: a model for an emerging threat to coffee production and quality. **Virology** 464/465: 385-396. 2014.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; BRETON, M.C.; AREANA, G.D.; NUNES, M.A.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Phylogentic and molecular variability reveal a new genetic clade of Citrus leprosis virus C. **Viruses** v. 8. 153; doi:10.3390/v8060153. 2016.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; BANGUELA-CASTILLO, A.; TASSI, A.D.; RODRIGUES, M.C.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; FREITAS-ASTUA, J. Unveiling the complete genome sequence of clerodendrum chlorotic spot virus, a putative dichorhavirus infecting ornamental plants. **Archives of Virology**, v. 163, doi.org/10.1007/s00705-018-3857-z, 2018.
- RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; CHABI-JESUS, C.; GUERRA-PERAZA, O.; TASSI, A.D.; KITAJIMA, E.W.; HARAKAVA, R.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus leprosis virus N: A new dichorhavirus causing citrus leprosis disease. **Phytopathology**, v.107: 963-976. 2017.



- RAMOS-GONZÁLEZ, P.L.; SANTOS, G.; CHABI-JESUS, C.; HARAKAVA, R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Passion fruit green spot virus harbors a new orphan ORF and highlights the variable RNA2 5'-end of the cileviruses. **Frontiers in Microbiology**. 2020.
- RODRIGUES, J.C.V.; GALLO-MEAGHER, M.; OCHOA, R.; CHILDERS, C.C. & ADAMS, B.J. Mitochondrial DNA and RAPD polymorphism in the haploid mite *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). **Exp. Appl. Acarol.** 34: 275-290. 2004.
- RODRIGUES, J.C.V.; NOGUEIRA, N.L. & FREITAS, D.S. Ringspot of *Ligustrum lucidum* Aiton, a new disease transmitted by *Brevipalpus phoenicis* G.(Acari:Tenuipalpidae) in Brazil. **Fitopatol. bras.**, v.20: 292. 1995
- ROY, A.; CHOUDHARY, N.; GUILLERMO, L.M.; SHAO, J.; GOVINDARAJULU, A.; ACHOR, D.; WEI, G.; PICTON, D.D.; LEVY, L.; NAKHLA, M.K.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H. A novel virus of the genus *Cilevirus* causing symptoms similar to citrus leprosis. **Phytopathology**, v.103: 488-500. 2013.
- ROY, A.; HARTUNG, J.S.; SCHNEIDER, W.; SHAO, J.; LEON, G.; MELZER, M.J.; BEARD, J.J.; OTRERO-COLINA, G.; BAUCHAN, G.R.; OCHOA, R.; BRLANSKY, R.H. Role bending: complex relationship between viruses, hosts and vectors related to citrus leprosis, an emerging disease. **Phytopathology**, v.105: 1013-1025. 2015.
- ROY, A.; STONE, A.L.; OTRERO-COLINA, G.; WEI, G.; BRLANSKY, R.H.; OCHOA, R.; BAUCHAN, G.; SCHNEIDER, W.L.; NAKLA, M.K. & HARTUNG, J.S. Reassortment of Genome Segments Creates Stable Lineages Among Strains of Orchid Fleck Virus Infecting Citrus in Mexico. *Phytopathology*, v.110,
- SPEGAZZINI, C. Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan plantas de "agrios" en el Paraguay. **Ann.Soc.Cient.Argentina** 90: 155-188. 1920.

- TASSI, A.D. Diversidade morfológica e genética de diferentes espécies de *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) e suas competências como vetores de vírus. **Tese de Doutorado**, PG Fitopatologia, Esalq/USP. Orient. E.W. Kitajima, 2018.
- TASSI, A.; KITAJIMA, E.W. Vetores de um vírus transmitido por *Brevipalpus* causando a leprose do ligustrum (*Ligustrum leprosis* vírus). **Summa Phytopathol.**, v.42 (supl.) CD Rom 2016.
- TASSI, A.D.; SAITO, M.S.G.; NUNES, M.A.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Reavaliação das espécies do ácaro tenuipalpídeo *Brevipalpus*, vetores de vírus de plantas. **Anais s51 Cong.Bras.Fitopatol.** (Recife) p.775. 2019.
- VERGANI, A.R. La transmission de la lepra explosiva de la ligustrina por ácaros. **Rev.Agri. Agron.** 9: 292-294. 1942.
- WEEKS, A.R.; MAREC, F. & BREEUWER, J.A.J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science** 292: 2479-2483. 2001.
- WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KANE, E.C. & ERBE, E.F. Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. **Exp. Appl. Acarol.** 30: 107-133. 2003.