

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

**Relação vírus-vetor-hospedeira no patossistema da leprose dos citros**

**Laura Cristina Garita Salazar**

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

**Piracicaba  
2013**

Laura Cristina Garita Salazar  
Bachillerato en Ingeniería Agronómica con énfasis en Fitotecnia

**Relação vírus-vetor-hospedeira no patossistema da leprose dos citros**

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  
2013**

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

Garita Salazar, Laura Cristina  
Relação vírus-vetor-hospedeira no patossistema da leprose dos citros / Laura  
Cristina Garita Salazar. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de  
2011. - - Piracicaba, 2013.  
95 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Acáros 2. Leprose dos citros 3. Plantas hospedeiras 4. Vetores de doenças  
de plantas 5. Vírus de planta 6. Brevipalpus phoenicis I. Título

CDD 634.3  
G232r

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

## **DEDICO**

A Róger mi compañía y fortaleza  
a mami y papi por su amor incondicional



## AGRADECIMENTOS

A la Universidad de Costa Rica por la beca concedida para relizar mis estudios, agradezco el apoyo e incentivo constante que esta institución siempre me dado para el crecimiento profesional y personal.

Ao Professor Dr. Elliot W. Kitajima, pela confiança, orientação e amizade, sobre todo pela oportunidade de crescimento profissional.

Aos professores Dr. Jorge Rezende e Dr. João Lopes e a Dra. Juliana Freitas-Astúa pela atenção e discussões que contribuíram com a realização deste trabalho.

Ao Dr. Sergio Carbonell do IAC por facilitar as diferentes variedades de feijão.

Ao professor Dr. Celso Omoto por ter cedido colônias de ácaros.

Ao Dr. Gerson Romão pela identificação das plantas hospedeiras.

As Dra. Valdenice Novelli e Dra. Andreia Nunes pela ajuda e amizade.

Ao Dr. Gilberto José de Moraes pela atenção em todas as consultas realizadas.

Ao professor Dr. Francisco pela amizade, carinho, ajuda e confiança.

Ao técnico Renato “Chusmi” pelo carinho, amizade e ajuda.

A nossa prezada Fabiana secretaria da Fito, obrigada pela ajuda.

Aos professores e colegas do departamento de Fitopatologia pela ajuda e oportunidade de compartilhar e aprender com vocês.

A mis hermanitos Adela y Bruno por su apoyo y cariño, son una luz que ilumina mi vida. También a toda mi familia por que a pesar de la distancia fisica siempre me acompañaron y apoyaron.

A mis amigos Lisela y William, por su amistad sincera, por que han creído en mí, son otra familia con la que siempre he podido contar.

A Naty, Sergio, Pedro, Vivi, Diana, Aline y Nivea amigos encontrados en Brasil que iluminaron mis dias.

A Karol, Juli, Andre, Bea, Daguito, Guido, Andy, Mari, Cindy, Elsi, Anita, Lourdes, Grace, Pame, al profe Hugo, Zeidy, don Fede, Toti, todos amigos que siempre han estado presentes apoyandome y entregandome cariño.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
Referências .....	21
3 USO DE FEIJOEIRO ( <i>PHASEOLUS VULGARIS</i> L.) COMO PLANTA INDICADORA PARA EXPERIMENTOS DE VIRUS DA LEPROSE C (CiLV-C) TRANSMITIDO POR <i>BREVIPALPUS</i> SP. ....	27
Resumo .....	27
Abstract.....	27
3.1 Introdução.....	28
3.2 Material e Métodos.....	30
3.3 Resultados e Discussão.....	35
3.4 Conclusões.....	45
Referências .....	45
4. INTERAÇÃO VÍRUS-VETOR NO PATOSSISTEMA DA LEPROSE DOS CITRUS .....	49
Resumo .....	49
Abstract.....	49
4.1 Introdução.....	50
4.2 Material e Métodos.....	51
4.3 Resultados e Discussão.....	55
4.4 Conclusões.....	60
Referências .....	61
5. PLANTAS HOSPEDEIRAS EXPERIMENTAIS DO VÍRUS DA LEPROSE C [ <i>Citrus leprosis virus C-</i> (CiLV-C)] .....	63
Resumo .....	63
Abstract.....	63
5.1 Introdução.....	64
5.2 Material e Métodos.....	65
5.3 Resultados e Discussão.....	69

5.4 Conclusões .....	92
Referências.....	92

## RESUMO

### Relação vírus-vetor-hospedeira no patossistema da leprose dos citros

A leprose dos citros é considerada uma das doenças mais destrutivas da indústria citrícola. O patossistema dessa doença envolve o agente causal o *Citrus leprosis virus C*, o vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) e as plantas hospedeiras. Este vírus com genoma conhecido é membro tipo do gênero *Cilevirus*. Causa sintomas localizados nas folhas, frutos e caules e está restrito ao continente Americano. Apesar de muitos esforços para se conhecer o patossistema, ainda existem muitas questões pendentes sobre as interações. O presente trabalho teve como objetivo obter informações detalhadas sobre as relações vetor-vírus-hospedeiro da leprose citoplasmática, estando dividido em três objetivos: 1. Procurou-se uma planta indicadora padrão que fosse de fácil obtenção, manejo e baixo custo, e que expressasse em curto tempo os sintomas de CiLV-C e outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBr); 2. Determinar parâmetros como o período de acesso para aquisição e inoculação do CiLV-C pelo ácaro vetor, o período de retenção do vírus pelo ácaro, avaliação da capacidade das diferentes fases do ácaro de transmitir o vírus e a % de indivíduos de uma população de ácaros colonizando plantas afetadas pela leprose capazes de transmitir o vírus; 3. Avaliar um grande número de espécies de plantas, de diferentes famílias botânicas, quanto à suscetibilidade experimental à infecção pelo CiLV-C, pelo ácaro vetor. A presença de CiLV-C nestes ensaios foi confirmada por testes de ELISA, RT-PCR, microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência. O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) reage com lesões necróticas locais em apenas cinco dias à inoculação com ácaros virulíferos, podendo-se reduzir para dois dias se as plantas forem incubadas a 28°C. O cv. 'Una' foi selecionado como planta-teste padrão dentre 113 cvs. avaliados. Outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* do tipo citoplasmático (VTBr) como vírus da pinta verde do maracujá (Passion fruit green spot virus PFGSV), vírus da mancha anular de *Ligustrum* (*Ligustrum* ringspot virus LigRSV) e mancha verde do hibisco (Hibiscus green spot vírus HGSV) também causaram lesões locais necróticas em feijoeiro. Usando feijão como planta teste e ácaros virulíferos, se determinou o período de acesso à aquisição do vírus-4 h; período de acesso à inoculação do vírus-4h; período de retenção do vírus no ácaro de 12 dias, porcentagem de ácaros virulíferos, colonizando tecidos infectados, transmitirem CiLV-C em até 45%. Os experimentos também confirmaram que todas as etapas de desenvolvimento do ácaro (larvas, proto-deutônifa e adultos) são capazes de transmitir CiLV-C, inclusive confirmou-se que o macho tem a capacidade de transmissão e que o vírus pode ser adquirido a partir de lesões de folhas, frutos e caules. Não se constatou transmissão transovariana do CiLV-C. Foram testadas 140 espécies, de 45 famílias, dentro das quais 62 espécies de 26 famílias apresentaram lesões localizadas nas folhas. Destas, 46 espécies sintomáticas, o CiLV-C foi detectado em pelo menos um dos testes para sua detecção, confirmando a transmissão. O conhecimento de parâmetros de alimentação, retenção do vírus e porcentagem de ácaros virulíferos na população, além do genoma de hospedeiras suscetíveis ao vírus tem importantes implicações no entendimento da epidemiologia, na quarentena e podem oferecer indícios da origem do CiLV-C.

Palavras-chave: CiLV-C; *Brevipalpus phoenicis*; período de acesso à aquisição; período de acesso à inoculação; hospedeiras



## ABSTRACT

### **Citrus leprosis pathosystem: virus-vector-host relationship**

Citrus leprosis (CL), caused by the *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), is reported only in the American continent. The pathosystem of the CL involves the causal agent, the main vector *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) and the susceptible hosts. For long time only *Citrus* spp. were considered the sole susceptible host. The entire genome of the CiLV-C was sequenced and a new genus, *Cilevirus*, was assigned for this virus. CL is characterized by the induction of localized symptoms on the leaves, fruits and stems. Important advances were made recently for the understanding of CL pathosystem, but despite these efforts little is known about details of the virus/vector/host relationship. The present work aimed to cover such deficiencies. In the first place a search of suitable indicator plant was made and the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was found to respond with localized necrotic lesions after infestation with viruliferous *B. phoenicis* in five days and when infested leaves are incubated at 28°C. Furthermore, bean plants are easy and cheap to produce and handle. The black bean cv. 'IAC Una' was adopted as a standard test variety, among 113 assayed cultivars of various genetic backgrounds. Common bean plants mite-inoculated with other cytoplasmic-type *Brevipalpus*-transmitted viruses (BrTVs) [Passion fruit green spot virus (PFGSV), *Solanum violaeifolium* ringspot virus (SvRSV), *Ligustrum* ringspot virus (LigRSV) and *Hibiscus* green spot virus (HGSV)] also responded with necrotic local lesions and could serve as test plants for these viruses. Detection of these viruses were made by RT-PCR and/or transmission electron microscopy. Using common bean as test plant, some parameters of the vector/virus relationship were determined: virus acquisition feeding period- 4 h; virus inoculation feeding period- 4h; period of retention of the virus by a single viruliferous mite- at least 12 days; percentage of viruliferous mites from a mites colonizing infected tissues- 45%. The experiments also confirmed that all the developmental stages of the mite (larvae, proto- and deutonymph, adult) as well as males are able to transmit CiLV-C. No transovarial passage of the CiLV-C was registered. The virus can be acquired from lesions of leaves, fruits and stems. To assess the experimental host range of CiLV-C, a large number of plant species were inoculated with *B. phoenicis*, viruliferous to CiLV-C, under experimental conditions. Of the 140 species tested, belonging to 45 families, 62 (of 26 families) produced localized lesions on inoculated leaves. Of these 62 plants producing local lesions, 45 had the presence of CiLV-C confirmed by at least one of the assays to detect the virus (RT-PCR, ELISA, transmission electron microscopy and immunofluorescence). These assays were also used to confirm the presence of CiLV-C in transmission experiments. Although only few non *Citrus* species were found naturally infected by CiLV-C, present results show that a large number of plant species are susceptible to the virus with implications on the epidemiology, quarantine and the evolution of the citrus leprosis pathosystem.

Keywords: CiLV-C; *Brevipalpus phoenicis*; acquisition feeding; inoculation feeding; Hosts



## 1 INTRODUÇÃO

A leprose dos citros é considerada uma das principais doenças viróticas da citricultura no Brasil, em especial no Estado de São Paulo, afetando *Citrus* spp., principalmente a laranja-doce [*Citrus sinensis* (L) Osbeck]. A doença é causada pelo vírus da leprose citoplasmático (*Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) que é transmitido por *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). Na atualidade no estado de São Paulo, que é o maior produtor mundial de suco de laranja, gastam-se anualmente cerca de US\$ 80 milhões por ano para o controle químico do ácaro vetor (RODRIGUES et al., 2003; MULLER et al., 2005; BASTIANEL et al., 2010).

A distribuição geográfica deste vírus inclui praticamente todos os países da América do Sul, e a partir de 2000, verificou-se que a doença está se disseminando pela América Central, rumo ao norte, tendo chegado ao México, ameaçando assim a região caribenha e os pomares dos Estados Unidos, de onde a enfermidade teria desaparecido depois dos anos 1960 (CHILDERS et al., 2003; BASTIANEL et al., 2010).

A virose se caracteriza pelo surgimento de lesões locais cloróticas a necróticas nas folhas, lesões nos ramos e sua morte pela confluência destas lesões e lesões deprimidas cloróticas ou marroms nos frutos. Nos casos mais graves acontece a queda prematura de folhas e frutos comprometendo seriamente a produção e a vida útil das plantas (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2010).

Dada a importância da enfermidade, nas últimas duas décadas têm sido investidos muitos esforços para melhor compreender o patossistema vírus-vetor-hospedeira. Um dos feitos importantes foi o sequenciamento completo do genoma do CiLV-C (PASCON et al., 2006, LOCALI et al., 2006) que, sendo distinto dos demais vírus conhecidos, passou ele a ser considerado a espécie tipo do novo gênero *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006). Este fato também levou ao desenvolvimento de ferramenta molecular para o diagnóstico da doença por RT-PCR (LOCALI et al., 2003) e da produção de antissoro para a imunodeteção do CiLV-C (LOCALI-FABRIS et al., 2008). O vírus já foi detectado no vetor, havendo evidências de que o CiLV-C apenas circularia no ácaro, sem nele replicar-se (CALEGARIO 2009; KITAJIMA; ALBERTI, 2010). Sabe-se também que há hospedeiras naturais e experimentais fora do gênero *Citrus* (BASTIANEL et al., 2010). O ácaro vetor, *B. phoenicis* é polífago e encontrada em todo o mundo nas regiões tropicais e subtropicais (CHILDERS et al., 2003).

Características deste patossistema sugerem que tanto o controle da população do ácaro vetor, como a redução da fonte de inóculo, sejam fatores chave no sucesso do controle da doença. Entretanto, será preciso aumentar os conhecimentos sobre as relações vírus/vetor para se ter elementos sólidos para se alterar as atuais estratégias de manejo da leprose e reduzir seus custos (BASTIANEL et al., 2010).

Este trabalho visa obter informações detalhadas sobre as relações vetor-vírus da leprose citoplasmático (CiLV-C) como contribuição para melhor entendimento da epidemiologia do vírus e para o controle do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis*. Para isto procurou-se determinar parâmetros importantes como o período de acesso para aquisição e inoculação do CiLV-C pelo ácaro vetor, retenção do vírus pelo ácaro, avaliação da capacidade de diferentes fases evolutivas do ácaro, além de machos, de transmitirem CiLV-C a possível transmissão transovariana do vírus e a % de eficiência de transmissão. Como laranjeiras inoculadas levam muito tempo, pelo menos quatro semanas, para expressarem os primeiros sintomas, e tendo sido verificado que feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) o fazem em cerca de cinco dias, fez-se a confirmação deste fato avaliando um número grande de cultivares e linhas de feijoeiro, adotando-se a cv. 'IAC Una' como padrão para estes ensaios. Outro estudo foi o de avaliar um grande número de espécies de plantas, de diferentes famílias botânicas, quanto à suscetibilidade experimental à infecção pelo CiLV-C, pelo ácaro vetor. Este tópico destina-se a encontrar possíveis hospedeiras naturais do vírus e obter elementos que possam indicar a possível origem do CiLV-C em *Citrus* spp., já que o vírus tem sido constatado apenas no continente americano, onde estas espécies são exóticas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O vírus da leprose dos citros atinge principalmente laranjeiras doces sendo transmitido por ácaros tenuipalpídeos do gênero *Brevipalpus*. Ocorre em todo continente americano, da Argentina ao México. No Brasil acha-se relatado em quase todos os estados da federação, mas sua importância tem sido especialmente significativa no Estado de São Paulo, maior produtor mundial de suco de laranja. Seus principais sintomas são manchas cloróticas/anelares nas folhas, lesões necróticas nos ramos e manchas deprimidas nos frutos. As perdas se devem à desfolha intensa, queda dos frutos e, a médio prazo, a morte descendente da planta devido às lesões nos ramos, reduzindo significativamente a vida útil da planta. A fim de se evitar tais problemas, os produtores paulistas aplicam intensivamente acaricidas químicos, visando o controle do ácaro vetor, que aumentam o custo de produção em mais de US\$ 80 milhões/ano, além dos óbvios problemas ao meio ambiente. Devido a esta importância, desde 2000 um consórcio de instituições de pesquisa paulista, contando com a colaboração de centros do exterior, vêm desenvolvendo esforços para melhor compreender este patossistema e obter dados científicos que permitam o manejo integrado adequado e redução significativa no uso dos acaricidas específicos contra *Brevipalpus* (BASTIANEL et al., 2010).

Como consequência destes trabalhos iniciados com a leprose dos citros, sabe-se que além dela, há numerosas outras enfermidades de plantas causadas por vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBr). Embora se conheçam mais de 200 espécies de ácaros do gênero *Brevipalpus*, apenas três - *B. phoenicis*, *B. obovatus* Donnadieu e *B. californicus* (Banks)- são conhecidas como vetores de vírus (CHILDERS et al., 2003). Uma característica comum a todos os VTBr é que sua infecção resulta invariavelmente em lesões localizadas em folhas, frutos, ramos e em raros casos, nas flores, não causando infecção sistêmica. Estudos ultraestruturais revelaram que há pelo menos dois tipos de VTBr: (1) Citoplasmático (VTBr-C) de partículas baciliformes e curtas, alojadas nas cisternas do retículo endoplasmático e induzindo uma inclusão densa e vacuolada, referida como viroplasma, no citoplasma, que se acredita ser o sítio de acúmulo e/ou síntese do material viral; (2) Nuclear (VTBr-N), com partículas em forma de bastonetes curtos, presentes no núcleo ou citoplasma, e presença de viroplasma eletro-transparentes no núcleo (KITAJIMA et al., 2003).

VTBr-C é representado pelo CiLV-C, cujo genoma foi inteiramente sequenciado (LOCALI et.al., 2006; PASCON et al., 2006). É constituído de fita simples, senso (+) e bipartido (5 e 9 kb), com organização genômica distinta dos demais vírus

conhecidos Assim foi-lhe atribuído um novo gênero *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006, 2012). Vale ressaltar que o trabalho que resultou no sequenciamento completo do genoma do CiLV-C originou-se da obtenção de dsRNA do vírus a partir de lesões foliares (RODRIGUES, 2000) a partir do qual Locali et al. (2003) obtiveram sequência parcial e “primers” que permitiram pela primeira vez a detecção molecular do vírus. Outros possíveis *Cilevirus* seriam o da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV) (KITAJIMA et al., 1997; ANTONIOLI-LUIZON, 2010) e o vírus da mancha anular de *Solanum violaeifolium* (*Solanum violaeifolium* ringspot virus- SvRSV) (FERREIRA et al., 2007), que têm seus genomas parcialmente sequenciados. Recentemente foi descrito um vírus causando manchas verdes em folhas de *Hibiscus*, capaz também de causar manchas cloróticas em limão volkameriano (*Citrus volkameriana* Tenn. et. Pasq.) no Havaí, com semelhanças ao VTBr-C, mas com genoma tripartido (MELZER et al., 2012).

VTBr-N é representado pelo vírus da mancha das orquídeas (Orchid fleck virus- OFV), o único VTBr de distribuição mundial. Seu genoma foi sequenciado (KONDO et al., 2006) sendo formado por RNA de fita simples, senso (-) e bipartido (duas peças de 6 kb). Sua organização é próxima a membros da família Rhabdoviridae tendo sido sugerido um gênero novo, *Dichorhabdovirus*. Outros dois VTBr-N, respectivamente mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus- CoRSV) (CHAGAS; KITAJIMA; RODRIGUES, 2003) e mancha clorótica do *Clerodendrum* (*Clerodendrum* chlorotic spot virus- ClCSV) (KITAJIMA et al., 2008) tiveram parte de seus genomas sequenciados (KUBO et al., 2008; KITAJIMA et al., 2011). Tendo as sequências conhecidas destes vírus similaridades com a do OFV, provavelmente pertenceriam ao mesmo gênero. Deve-se atentar ao fato de que se constatarem sintomas típicos de leprose em laranjeiras, mas causadas por VTBr-N, referido como leprose do tipo nuclear (CiLV-N) (RODRIGUES et al., 2003), do qual há poucas informações. É de ocorrência restrita, em regiões mais frias e altas. No Brasil, CiLV-N foi encontrado em regiões altas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (BASTIANEL et al., 2010). Acha-se registrada também em regiões altas ao norte do Panamá (DOMINGUES et al., 2001) e recentemente nos Estados de Queretaro e Jalisco, no México (G. OTERO-COLINA<sup>1</sup>, comunicação pessoal). Embora nos ramos e frutos os sintomas causados pelo CiLV-N sejam indistinguíveis daqueles causados pelo CiLV-C, as lesões foliares têm uma sutil diferença. As lesões produzidas pelo CiLV-N tendem a ser menores, com uma pequena

---

<sup>1</sup> OTERO-COLINA, G. Comunicação pessoal em 7 de novembro de 2012.

mancha escura central e um halo amarelo, enquanto as causadas pelo CiLV-C podem atingir dimensões maiores, sendo de coloração verde clara e frequentemente com anéis formados por tecidos com goma. No Brasil e no Panamá CiLV-N foi encontrado apenas em laranjeiras, mas no México ele infeta uma gama maior de *Citrus* spp., além da laranjeira doce [*Citrus sinensis*(L.) Osbeck] afeta também laranja azeda (*C. aurantium* L.), mandarina (*C. reticulata* Blanco), lima (*C. latifolia* Tanaka) , lima ácida [*C. aurantifolia* (Christm.) Swingl.] e pomelo (*C. paradisi* McFarl.) (G. OTERO-COLINA<sup>2</sup>, comunicação pessoal). Análises de material herbarizado no Instituto Biológico de São Paulo e de imagens publicadas sugerem que a leprose dos citros que ocorreu na Florida, EUA, teria sido do tipo nuclear (KITAJIMA et al., 2012).

Outra importante consequência da obtenção da sequência completa do genoma do CiLV-C foi a possibilidade de obter proteínas virais, expressas a partir de ORFs clonados em sistema bacteriano. Calegario et al. (2012) logrou expressar a proteína de movimento (mp), mas infelizmente sua configuração tridimensional provavelmente foi diferente da mp nativa e o antissoro gerado reagiu apenas com o material expresso. Mas a proteína p29, presumível proteína do nucleocapsídeo que se une ao RNA do vírus, expressa em sistema bacteriano, gerou anticorpo altamente específico, e que permitiu a detecção desta proteína em extratos de lesões causadas pelo CiLV-C (CALEGARIO et al., 2012). Este antissoro tem sido usado na imunodeteção do CiLV-C e também em ensaios de imunolocalização *in situ*, demonstrando inequivocamente que as partículas baciliformes visualizadas em seções ultrafinas representam o vírus.

A detecção do CiLV-C através de RT-PCR usando primers desenvolvidos por Locali et al. (2003) hoje é rotina e contribuiu para confirmar que a leprose dos citros detectadas da Argentina ao México é causada por este vírus. Recentemente Roy et al. (2012) detectaram na Colômbia, plantas cítricas com sintomas típicos de leprose, nas quais CiLV-C não era detectável por RT-PCR usando primers específicos, embora a microscopia eletrônica detectasse efeitos citopáticos característicos de VTBr-C. Análises feitas por “deep sequencing” constataram a presença de um vírus com similaridades com CiLV-C mas com cerca de 70% de similaridade. É assim provável que sintomas de leprose possam ser causadas por mais de um tipo de VTBr-C.

---

<sup>2</sup> OTERO-COLINA, G. Comunicação pessoal em 7 de novembro de 2012.

A sequência de trabalhos comparativos de suscetibilidade de diferentes tipos de citros ao CiLV-C, iniciadas por Bitancourt (1955) mostram que as laranjeiras doces são altamente suscetíveis. Mandarinas e pomelos seriam moderadamente suscetíveis, enquanto os limoeiros comportam-se praticamente como imunes. Bases desta resistência genética estão sendo investigadas usando híbridos e os dados iniciais indicam fatores poligênicos envolvidos no processo (BASTIANEL et al., 2010). Além disso, o que acreditasse até esse momento e que a infecção pelo CiLV-C restringir-se-ia ao gênero *Citrus* foi ultrapassado com a constatação da infecção natural de *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr., uma rutácea usada como cerca viva na Colômbia, e de experimentos que verificaram que várias espécies não rutáceas são suscetíveis ao CiLV-C: *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Commelina benghaliensis* L., *Malvaviscus arboreus* Cav., *Grevilea sp.*, *Solanum violaefolium* Schott., *Phaseolus vulgaris* L. e *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (NUNES 2007; BASTIANEL et al., 2010).

Estudos anatômicos das lesões indicam que além da presença de vírus e viroplasmas nas células, em lesões maduras notam-se células hipertrofiadas no parênquima lacunoso e focos de hiperplasia no parênquima paliçádico junto ao feixe vascular. Raramente verifica-se alterações anatômicas no tecido vascular, o que explica porque CiLV-C causa apenas lesões locais sem resultar em infecção sistêmica. Sem infecção do sistema vascular, o vírus não teria como se disseminar a longas distâncias (MARQUES et al., 2007). Estudos ultraestruturais também deram indicações sobre a variação do teor do CiLV-C nos tecidos das lesões. Em lesões recentes, ainda como pequenas manchas cloróticas, vírions e/ou viroplasmas podem ser encontradas em quase todas as células da epiderme e do parênquima lacunoso ou palisádico. Tecidos vasculares raramente contém material viral, confirmando ausência de modificações anatômicas como a causa da ausência de infecção sistêmica (GOMES et al., 2006). Em lesões mais velhas, maiores, o número de células nas quais se detecta vírions e/ou viroplasma é reduzido, ocorrendo em pequenos grupos. Ainda não há informações sobre o que sucede com o material viral durante o processo de maturação das lesões. Estudos utilizando imunofluorescência (CALEGARIO et al., 2011) podem trazer contribuições sobre este tema.

Uma característica das doenças causadas pelos VTBr é a de induzir apenas infecção localizada em folhas, ramos e frutos, sem que ela se torne sistêmica. Ainda não há dados científicos que expliquem esta infecção restrita, embora a especulação mais plausível seja a de que a proteína de movimento (mp) codificado pelos VTBr permita a passagem da infecção de célula-a-célula na epiderme e no parênquima do mesofilo, mas não nas células do floema, impedindo o acesso do vírus aos vasos do floema e, por conseguinte, a sua distribuição a

longas distâncias. A própria expansão ilimitada das lesões seria contida pelos mecanismos de defesa da planta (BASTIANEL et al., 2010).

Os conhecimentos sobre VTBr remontam ao início do século XX quando se constatou a ocorrência de uma enfermidade caracterizada por lesões nas hastes (“barky scale”) e nos frutos (“nail head rust”) na Flórida e que causou certos prejuízos (FAWCETT, 1911; CHILDERS et al., 2003). Doença similar foi verificada no Paraguai, Argentina e Brasil na década dos 1930 tendo-se concluído que seria idêntica à da Florida, e que se convencionou referir como leprose (KNORR; DUCHARME, 1953). Em 1940, descobriu-se na Argentina que o ácaro *Brevipalpus obovatus* Donadieu seria o vetor (FREZZI, 1940; VERGANI, 1945). Anos mais tarde, no Brasil, o ácaro vetor da leprose foi identificado como *B. phoenicis* (MUSUMECI; ROSETTI, 1963). A etiologia da leprose dos citros foi controvertida no início, variando de causa micótica a toxemia induzidas pela alimentação pelos ácaros (RODRIGUES et al., 2003). Gradativamente acumularam-se evidências para a natureza viral. A expansão das lesões do ramo após sua enxertia em ramo sadio (KNORR, 1968), detecção de partículas similares a vírus nos tecidos infectados (KITAJIMA et al., 1972), a transmissão mecânica do CiLV-C (COLARICCIO et al., 1995) e, finalmente complementado pelo sequenciamento de todo seu genoma (LOCALI-FABRIS et al. 2006, PASCON et al., 2006) comprovaram inequivocamente a etiologia viral da leprose dos citros.

Os ácaros do gênero *Brevipalpus* reproduzem-se por partenogênese telítoca (fêmeas gerando fêmeas); têm dois cromossomos e são haplóides. A feminilização é induzida por uma bactéria simbiote do gênero *Cardinium* (WEEKS et al., 2001) que está disseminada em todos os tecidos (KITAJIMA et al., 2007). Todas as fases de desenvolvimento de *B. phoenicis* (larvas, proto- e deutoninfas, adultos) são capazes de transmitir CiLV-C não havendo, contudo, passagem transovariana do vírus (CHIAVEGATTO, 1995; NOVELLI et al., 2007). Apesar de haver muitas informações sobre o ácaro e o patógeno, ainda é preciso obter parâmetros tais como período de alimentação mínimo para aquisição ou inoculação do vírus, retenção do vírus pelo vetor, após sua aquisição, eficiência de transmissão do vírus por distintas populações de *B. phoenicis* para se melhor entender a epidemiologia da leprose.

Outro aspecto importante da relação ácaro-vírus foi mencionado por Rodrigues e colaboradores (1997), que teriam detectado CiLV-C no ácaro por microscopia eletrônica de transmissão, tendo sugerido replicação do mesmo no vetor. Mas estudos recentes, Kitajima e colaboradores (2010) observaram presumíveis vírions do CiLV-C nos tecidos do ácaro

virulífero e sua natureza viral foi demonstrada através de imuno-ensaios. As partículas visualizadas por Rodrigues et al. (1997) possivelmente representariam componentes normais e não de natureza viral (E.W. KITAJIMA<sup>3</sup>, comunicação pessoal).

Os estudos anatômicos realizados até hoje sobre o ácaro vetor indicam que o aparelho bucal no gnatosoma de *Brevipalpus* é de um sugador que insere o estilete retrátil, ca. 30 µm de comprimento, o que seria o suficiente para atravessar a epiderme e atingir as células parenquimatosas (palisádicas ou lacunosas) abaixo, mas não alcançariam os vasos. Acredita-se que após a perfuração da célula, o ácaro injetaria a saliva que poderia iniciar uma pré-digestão do conteúdo celular. A ingestão não seria feita pelo estilete, pois seu calibre seria muito pequeno para comportar volumes maiores do suco celular. É provável que após a fase inicial de perfuração e salivação, o estilete seria recolhido, e o labrum justaposto ao orifício feito, por onde sairia o conteúdo celular auxiliado pelo turgor celular e também succionado pela bomba faríngea do gnatosoma, havendo controle da sucção pela fossa rostral (KENNEDY, 1995; ALBERTI; KITAJIMA, 2010).

Existe a hipótese de que, na fase inicial da ingestão, o suco celular seguiria pelo esôfago que atravessa o singanglio chegando ao ventrículo e em seguida ao caecum, que é a porção anterior do intestino médio, altamente ramificado. Este ocupa espaços vazios da hemocoele, tanto no prosoma como no opistosoma, dispersando quase como um alvéolo pulmonar. Assim praticamente não há espaços vazios na hemocoele, e a hemolinfa percorreria os limitados espaços entre as células, em um fluxo gerado pelo movimento do ácaro (ALBERTI; KITAJIMA, 2010).

Estes trabalhos sobre a anatomia de *Brevipalpus*, servem de suporte para a detecção de CiLV-C no ácaro virulífero e seu possível ciclo no vetor. Foram detectadas presumíveis partículas entre membranas do cecum e glândulas podocéfálicas e tecido adjacente. A demonstração de que estas partículas representam CiLV-C foi possível através de ensaios de imunolocalização (ALBERTI; KITAJIMA, 2010; KITAJIMA et al., 2010). O fato de os vírions ocorrerem sempre em situação extra-celular, entre membranas de células adjacentes e a não detecção de viroplasmas nos tecidos do ácaro indicam que CiLV-C não se replicaria no vetor, apenas circulando do lumen do cecum até o canal estiletar. Como isto ocorre, ainda é desconhecido. Há outras linhas de evidência que apoiam a hipótese da relação apenas

---

<sup>3</sup> KITAJIMA, E.W. Comunicação pessoal em 15 de agosto de 2012.

circulativa entre o vírus e o vetor. Ensaios de RT-qPCR indicam que não há aumento no título do vírus após a ingestão. O fato de as larvas de *B. phoenicis* com acesso ao CiLV-C serem capazes de transmitir ainda no estado larval o vírus parece tornar improvável que o vírus se replique no ácaro (CALEGARIO 2009; BASTIANEL et al., 2010).

Outros aspectos importantes da relação vírus-vetor ainda não completamente esclarecidos são os parâmetros referentes à aquisição e inoculação do vírus pelo ácaro vetor. Atualmente são conhecidos dados preliminares que foram testados usando feijoeiro como planta-teste que se mostrou ser excelente hospedeira experimental, pois reage apresentando lesões locais necróticas em menos de uma semana (contra 4-8 semanas em laranjeiras). Pôde-se assim fazer determinações preliminares de alguns parâmetros da relação vetor/vírus tais como período de acesso para aquisição (PAA) e inoculação (PAI), ambos em 1 a 2 dias. Também se verificou que da população de *B. phoenicis* presente em uma planta infectada, cerca de 40%, foram capazes de transmitir CiLV-C para o feijoeiro (TASSI et al., 2009).

Para conhecer melhor a relação vírus-vetor-planta, pretendeu-se obter informações do sistema CiLV-C-*Brevipalpus* usando como planta indicadora o feijoeiro. Também tentou-se oferecer algumas respostas aos mecanismos de aquisição e inoculação do vírus durante o processo de alimentação, informações básicas para se determinar o relacionamento vírus-vetor na transmissão do vírus para planta pelo ácaro vetor. Por último, o trabalho proposto visou conhecer a possibilidade de que diversas plantas sirvam como hospedeiras experimentais ao CiLV-C como preâmbulo para se detectar infecções naturais de outras espécies por este vírus e contribuir para esclarecer sua origem e evolução.

## Referências

ALBERTI, G.; KITAJIMA, E.W. Anatomy and fine structure of *Brevipalpus* mites (Tenuipalpidae, Prostigmata, Actinotrichida). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ACAROLOGY, 11., 2010, Recife. **Resumos...** Recife: [s.n.], 2010. p. 8.

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

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

CALEGARIO, R.F. **Detecção do vírus da leprose dos citros nos tecidos da planta infectada e do ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae).**

2009.123 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI-FABRIS, E.; NOVELLI, V.M.; SALAROLI, R.B.; FREITAS-ASTÚA, J.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA, R.; MACHADO, M.A. Imunocitoquímica *in situ* de tecido de citros infetado com o vírus da leprose dos citros, tipo citoplasmático (CiLV-C). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. 1 CD-ROM.

CALEGARIO, R.F.; LABATE, M.V.T.; PERONI, L.A.; STACH-MACHADO, D.R.; ANDRADE, M.O.; FREITAS-ASTUA, J.F.; LABATE, C.A.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. In vitro expression and antiserum production against the movement protein of the Citrus leprosis virus C (CiLV-C). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, p. 135-140, 2012.

CHAGAS, C.M.; KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.V.C. Coffee ringspot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in coffee **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v.30, n. 203/213, p. 5-28, 2003.

CHIAVEGATTO, LG. Avaliação da potencialidade de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) na transmissão da leprose em plantas cítricas. In: CONGRESSO BRASILEIRO ENTOMOLOGIA, 15., 1995, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: SEB, 1995. p. 14.

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**, Amsterdam, v. 30, n. 1/3, p. 5-28, 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. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 181-202, 2003.

DOMINGUES, F.S.; BERNAL, A.; CHILDERS, C.; KITAJIMA, E.W. First report of Citrus leprosis virus in Panama. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 228, 2001.

FAWCETT, H.S. Scaly bark or nail head rust of citrus. **Florida Agriculture Experimental Station Bulletin**, Gainesville, v. 106, p. 41, June 1911.

FREZZI, M.S. La lepra explosiva del naranjo. **Boletín Frutas y Hortalizas. Ministerio de Agricultura de la Nación**, Buenos Aires, v. 5, n. 46, p. 16, 1940.

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

KENNEDY, J.S. **Functional ecology of the false spider mite *Brevipalpus phoenicis***

(Geijskes). 1995. 2 v. Thesis (Docteur en Sciences Naturelles Appliquées) - Université Catholique de Louvain, Louvain-La-Neuve, 1995.

KITAJIMA, E.W.; ALBERTI, G. Virus/vector relationship of *Brevipalpus*-transmitted plant viruses. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ACAROLOGY, 13., 2010, Recife.

**Resumos...** Recife: Local Organizing Committee, 2010. p. 123.

KITAJIMA, E.W.; NOME, C. Microscopia eletrônica em virologia vegetal. In: DO CAMPO, D.; LENARDON, S. **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: INTA-IFFYVE/JICA, 1999. p. 57-87.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant vírus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1/3, p. 135-160, 2003.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; HAKAKAVA, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, J.C.V. Citrus leprosis in Florida may have been of the nuclear type. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 20., 2009, Brasília. **Resumos...** Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. p. 90.

\_\_\_\_\_. Citrus leprosis in Florida may have been of the nuclear type. **Virus Review & Research**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 90, 2010.

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

**Resumos...** Recife: Local Organizing Committee, 2010. p. 123.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; BRAGHINI, M.T.; FAUZUOLI, L.C.; LOCALI-FABRIS, E.C.; SALAROLI, R.B. Natural infection of several *Coffea* species and hybrids and *Psilanthus ebracteolatus* by the Coffee ringspot virus (CoRSV). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 503-507, 2011.

KITAJIMA, E.W.; GROOT, T.V.M.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTUA, J.; ALBERTI, G.; MORAES, G.J. In situ observation of the Cardinium symbionts of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) by electron microscopy. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 42, n. 4, p. 263-271, 2007.

KITAJIMA, E.W.; CALEGARIO, R.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; FRANCISCHINI, F.J.B. In situ detection of CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of virus/vector relationship and a model for the virus circulation in the mite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. 1 CD-ROM.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; HAKAKAVA, R.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. Citrus leprosis in Florida, USA, appears

to have been caused by the nuclear type of Citrus leprosis virus (CiLV-N). **Virus Review and Research**, v. 16, n. 1/2, Jan./Dec. 2011. Disponível em:

<[http://www.virusreviewsandresearch.com/ISSUE16\\_1-2.html](http://www.virusreviewsandresearch.com/ISSUE16_1-2.html)>. Acesso em: 08 out. 2012.

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

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

KUBO, K.S.; ANTONIOLI-LUIZONI, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Diagnose molecular do vírus da mancha clorótica de *Clerodendron* (CICSV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, suppl. S12, 2007.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA J.; SOUZA A.A.; TAKITA M.A.; ASTÚA-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**, Saint Paul, v. 87, p. 1317-1321, 2003.

LOCALI-FABRIS, E.C.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA R.; FREITAS-ASTÚA J.; CALEGARIO, R.F.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Machado MA In vitro expression and production of antiserum to the capsid protein (P29) of Citrus leprosis virus C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. 1 CD-ROM.

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

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

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; HU, J.S. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, p. 122-127, 2012.

MOWAT, W.P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts unfractionated antisera. **Journal of Virological Methods**, Berkshire, v. 15, p. 233-247, 1987.

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: MATTOS JUNIOR, D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M.; JUNIOR, J.P (Ed.). **Citros**. Campinas: FUNDAG, 2005. p. 569-596.

NUNES, M.A. **Transmissão do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) para plantas próximas de pomares cítricos.** 2007. 68 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2007.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASUMPCÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.; RANÇO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO J.R.; H., OLIVEIRA, F., GIACHETTO, P.F.; FERRAZ, 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 virus, cytoplasmic type (CiLV). **Virus Genes**, Dordrecht, v. 32, p. 289-298, 2006.

ROSSETTI, V.; FASSA, G.T.; MUSUMECI, M.R. Um novo ácaro dos laranjais paulistas. **O biológico**, São Paulo, v. 25, p. 273-275, 1959.

RODRIGUES, J.C.; NOGUEIRA, N.L.; FREITAS, D.S.; PRATES, H. Vírus-like particles associated with *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae), vector of citrus leprosis virus. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 391-395, 1997.

RODRIGUES, J.C.V. **Relação patógeno-vetor-planta no sistema da leprose do citros.** 2000. 168 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

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

ROY, A.; CHOUDHARY, N.; LEÓN, G.A.; ACHOR, D.; SHAO, J.; WEI, G.; PICTON, D.D.; NAKHLA, M.K.; HARTUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H. Identification of a new citrus cytoplasmic virus associated with citrus leprosis disease in Colombia using deep sequencing. In: APS ANNUAL MEETING, 2012, Providence. **Abstracts...** Disponível em: <[http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012\\_Meeting\\_Abstracts/aps12abO154.htm](http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012_Meeting_Abstracts/aps12abO154.htm)>. Acesso em: 02 nov. 2012.

TASSI, A.D.; FREITAS-ASTUA, J.; JADAO, A.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosis virus (CiLV-C)/vector relationship assessed by bean as test plant. **Virus Review and Research**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 90, 2009. Apresentado no ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 20., 2009, Brasília.

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



### 3 USO DE FEIJOEIRO (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) COMO PLANTA INDICADORA PARA EXPERIMENTOS DO VIRUS DA LEPROSE CITOPLASMÁTICO (CiLV-C) TRANSMITIDO POR *BREVIPALPUS* SP.

#### Resumo

A leprose dos citros, causada pelo *Citrus leprosis virus* C (CiLV-C), do gênero *Cilevirus*, encontra-se distribuída no continente Americano em pomares desde México até Argentina. Esta doença apresenta-se com sintomas localizados na planta, lesões em folhas, frutos e ramos, e o vírus causador é transmitido pelo ácaro tenunipalpideo *Brevipalpus phoenicis*. Até recentemente, apenas *Citrus* spp. eram conhecidas como hospedeiras suscetíveis, nas quais os sintomas podem levar semanas ou meses para aparecerem após a inoculação experimental por ácaros virulíferos. Este fato dificultava o desenvolvimento de estudos detalhados das interações vírus-vetor-hospedeiro no patossistema do CiLV-C. Nas buscas para se encontrar uma planta modelo que respondesse mais rapidamente à infecção, verificou-se que o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) reage com lesões necróticas locais em apenas cinco dias à inoculação com ácaros virulíferos. O feijão preto, cv. "IAC Una" foi adotado como variedade de teste padrão. Os ensaios foram feitos com as duas primeiras folhas da planta de vaso ou destacadas e mantidas numa placa de Petri. Foram testados diversos cultivares de feijão de diferentes origens, da coleção de germoplasma do Centro de Grãos e Fibras do Instituto Agronômico de Campinas, e todos eles se mostraram suscetíveis. Folhas infestadas com ácaros virulíferos e incubadas à 28°C produziram lesões em dois dias. As folhas trifoliadas também responderam com lesões necróticas à infestação com ácaros virulíferos. A confirmação de que as lesões nas folhas de feijoeiro são causadas pelo CiLV-C foram feitas por microscopia eletrônica de transmissão, imunofluorescência, ELISA e RT-PCR. Outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* do tipo citoplasmático (VTBr-C), como os vírus da pinta verde do maracujá (Passion fruit green spot- PFGSV), mancha anular de *Ligustrum* (*Ligustrum* ringspot virus LigRSV) e da mancha verde do hibisco (*Hibiscus* green spot virus HibGSV) também causaram lesões locais necróticas em feijoeiro, em inoculações feitas com ácaros virulíferos. Estes dados indicam que o feijão é uma excelente indicadora do CiLV-C e, possivelmente, de outros VTBr-C.

Palavras-chave: *Brevipalpus phoenicis*; Vírus da pinta verde do maracujá; Vírus da mancha anular de *Ligustrum*; Vírus da mancha verde do hibisco; Vírus da mancha anular de *Solanum violaefolium*

## COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.): EXPERIMENTAL LOCAL LESION HOST FOR CITRUS LEPROSIS VIRUS C (CiLV-C) AND SOME OTHER CYTOPLASMIC-TYPE *BREVIPALPUS*-TRANSMITTED VIRUSES

### Abstract

Citrus leprosis (CL) caused by the *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) is present in the American continent from Mexico to Argentina, where citrus plants are grown. CiLV-C is transmitted by the tenuipalpid mite *Brevipalpus phoenicis*, causing localized lesions on citrus leaves, fruits and stems. Its genomic organization indicated that CiLV-C represents a new genus, named *Cilevirus*. One limitation to study the virus/vector/host relationship in the CiLV-C pathosystem is the lack of a suitable assay plant. With *Citrus* spp. used as susceptible hosts, symptoms may take weeks or months to appear after experimental inoculation by viruliferous mites. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) was found to respond with localized necrotic lesions after infestation with viruliferous *B. phoenicis* in five days. So far all tested bean cultivars of varied genetic background behaved in the similar way. The black bean, cv. 'Una', was adopted as a standard test variety. When infested leaves are incubated at 28° C the period for the lesion appearance is reduced to only two days. Confirmation that the lesions on bean leaves are caused by CiLV-C were made by transmission electron microscopy, immunofluorescence, ELISA and RT-PCR. Bean plants mite-inoculated with some other cytoplasmic type *Brevipalpus*-transmitted viruses like Passion fruit green spot (PFGSV), *Ligustrum* ringspot virus (LigRSV) and *Hibiscus* green spot virus (HGSV) also responded with necrotic local lesions and may serve as test plants for these viruses.

Keywords: Citrus leprosis pathosystem; *Brevipalpus phoenicis*; Passion fruit green spot virus; *Ligustrum* ringspot virus; *Hibiscus* green spot virus; *Solanum violaeifolium* ringspot virus

### 3.1 Introdução

A leprose dos cítricos é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), é transmitida pelo ácaro tenuipalpídeo *Brevipalpus spp.* A doença caracteriza-se por causar lesões localizadas folhas, ramos e frutos. O genoma do CiLV-C foi inteiramente sequenciado (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006) e o vírus proposto como representante de um novo gênero *Cilevirus* (CARTENS 2010), que foi aceito pelo ICTV (LOCALI-FABRIS et al., 2012). O primeiro relato da leprose dos citros foi feito na Flórida por Fawcett (1911), embora já fosse conhecido desde os anos 1860. Baseado em registros fotográficos e relatos documentais suspeita-se que a leprose na Flórida tenha sido causada pelo vírus da leprose tipo nuclear (*Citrus leprosis vírus N- CiLV-N*) (KITAJIMA et al., 2012). A leprose desapareceu dos Estados Unidos após 1960's possivelmente por diversas situações como sucessivas geadas e aplicação de enxofre que foi gradualmente diminuindo a fonte de inóculo (CHILDERS et al., 2003).

Atualmente a doença está presente da Argentina até o México. Na América do Sul, foi descrita inicialmente nos anos de 1920 no Paraguai e subsequentemente na Argentina e Brasil (BITANCOURT, 1955; BASTIANEL et al., 2010). A associação do ácaro vetor com a doença foi inicialmente estabelecida por Frezzi (1940) em Bella Vista (Província de Corrientes) e Vergani (1945) em Concordia (Província de Entre Rios) na Argentina. Nesses trabalhos o ácaro vetor foi identificado como *Tenuipalpus pseudocuneata* Blanchard, sinônimo de *Brevipalpus obovatus* Donnadieu. No Brasil o ácaro associado à transmissão de CiLV-C foi identificado como *B. phoenicis* Geijskes (MUSUMECI; ROSETTI, 1963) e este ácaro tem sido verificado como vetor em praticamente todos os locais onde a leprose dos citros tem sido constatada (BASTIANEL et al., 2010).

O CiLV-C caracteriza-se por causar sintomas localizados em folhas, frutos e ramos de plantas doentes, como sucede com outras viroses transmitidas por *Brevipalpus* (BASTIANEL et al., 2010). As plantas de *Citrus* spp. foram consideradas durante muito tempo como as únicas hospedeiras do vírus da leprose, mas em trabalhos posteriores foi transmitido mecanicamente a outras espécies vegetais causando lesões localizadas (COLARICCIO et al., 1995). Além disso, recentemente o CiLV-C foi encontrado infectando naturalmente a rutácea *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. na Colômbia, lugar onde esta planta é utilizada nos pomares como cerca viva (LEON et al., 2008). No Brasil, constatou-se infecção natural da trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) crescendo sob laranjeiras com leprose (NUNES et al., 2012a). Também se comprovou que um grande número de espécies de plantas pode ser hospedeira quando inoculadas experimentalmente por ácaros virulíferos (GARITA et al., 2012; NUNES, 2012b). Estes dados podem ser de grande importância na epidemiologia da doença evidenciando uma maior complexidade do patossistema do que se considerava.

Embora nos anos recentes tenha havido grandes avanços no conhecimento sobre o patossistema da leprose, há ainda carência de informações básicas sobre as relações vírus/vetor/hospedeira. Uma das principais dificuldades é a falta de uma planta teste que consistentemente responda à infecção em tempo curto. A suscetibilidade das espécies de *Citrus*, as únicas disponíveis até recentemente, ao CiLV-C, varia da laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], altamente sensível, às moderadamente sensíveis como a tangerina (*C. reticulata* Blanco) e o pomelo (*C. paradisi* McFarl.), até os limoeiros verdadeiros (*C. limon* L.), praticamente imunes ao CiLV-C. Embora a laranja doce seja altamente suscetível, as lesões cloróticas iniciais levam de 4 a 6 semanas para começar a ser visíveis, após a inoculação por ácaros virulíferos (CHIAVEGATO, 1995; BASTIANEL et al., 2010). A

inoculação mecânica realizada com extrato de lesões lepróticas de folhas de laranjeira causou lesões locais em algumas hospedeiras herbáceas, mas o processo requer tampão especial e os resultados eram erráticos (COLARICCIO et al., 1995).

Este trabalho relata a introdução da utilização de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) que se mostrou excelente planta indicadora para CiLV-C em ensaios de inoculação com ácaros virulíferos, respondendo à infecção em cinco ou menos dias. Assim identificou-se uma planta indicadora confiável na detecção do CiLV-C, de baixo custo e fácil manejo, que permitirá determinar importantes parâmetros das relações vírus/vetor/hospedeira no complexo da leprose dos citros.

### **3.2 Material e Métodos**

#### **Criação de ácaros *Brevipalpus***

Os ácaros *B. phoenicis* foram mantidos em condições de laboratório em frutas de laranja. As populações de ácaros sem vírus foram mantidas em frutos sadios e populações virulíferas em laranjas com sintomas da leprose. Os frutos com lesões de leprose foram coletados em um pomar orgânico livre de pulverizações. As frutas foram cobertas em sua metade com parafina e na região que delimita a parafina foi colocada a cola entomológica Tanglefoot® para confinar os ácaros em uma arena. Periodicamente a colônia era examinada sob estereomicroscópio para avaliar a concentração populacional.

#### **Fonte de inóculo**

Foram usadas como fonte de inóculo, frutas e folhas de laranjeira doce apresentando lesões causadas por CiLV-C. As amostras provinham de uma área experimental onde a leprose é endêmica. As folhas com lesões foram colocadas em placas de Petri, forrada com papel filtro para manter a umidade. Os ácaros da colônia foram transferidos para se alimentarem do tecido da lesão. As frutas estas foram preparadas da mesma forma que as frutas para manter as colônias dos ácaros, exceto pela mistura de areia, farinha e yeso, já que as lesões oferecem uma superfície irregular preferida pelos ácaros. Os ácaros eram deixados a se alimentar por um período de 4-5 dias para adquirir o vírus.

#### **Plantas de feijão**

Diferentes variedades de feijão provenientes do Banco de germoplasma do Centro de Grãos e Fibras do Instituto Agrônomo de Campinas foram testados (tabela 1). As sementes foram semeadas em vasos plásticos (10 cm de diâmetro e 8 cm de altura) com solo estéril e mantidas em casa de vegetação. Foram testadas três plantas de cada variedade para comprovar a suscetibilidade ao CiLV-C. A inoculação foi realizada uma semana após a germinação, utilizando-se o primeiro par de folhas completamente expandidas.

### **Inoculação com o ácaro**

Os ácaros foram deixados para se alimentar sobre folhas e frutos que apresentavam lesões locais por um período de três dias e, posteriormente, para duas folhas de cada planta foram transferidos cinco ácaros por folha com auxílio de uma agulha entomológica. Na área do pecíolo foi colocada cola entomológica Tanglefoot®. Diariamente foram avaliadas as plantas para observar o momento do aparecimento das lesões, por um período de dez dias. Foi realizado o mesmo teste usando folhas destacadas colocadas em placas Petri com papel filtro.

### **Tratamento com alta temperatura**

Foi avaliado o possível efeito da temperatura na aparição de lesões induzidas pelo CiLV-C em folhas de feijoeiro. Foram realizados testes com temperatura ambiente e com controlada em uma câmara de germinação (Tecnal, mod. TE 402) a 28°C. No experimento foram avaliadas plantas de feijão cv. 'Una' com cinco ácaros virulíferos por folha em duas folhas por planta. Foram realizadas avaliações diariamente até o aparecimento de lesões.

### **Deteção de CiLV-C em plantas de feijão sintomáticas**

Para conferir se as lesões apresentadas nas folhas nas diferentes variedades de feijão foram causadas por CiLV-C, as mesmas lesões foram analisadas morfológicamente, imunologicamente e molecularmente para detectar o vírus. Foram testadas plantas não infectadas como controle negativo, e lesões lepróticas em laranjeiras, como controle positivo.

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

Para a detecção do CiLV-C e os efeitos citopatológicos nos tecidos das plantas, fragmentos das lesões produzidas em folhas de feijoeiro foram fixados imediatamente após a remoção em uma solução Karnovsky modificada (formaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em

tampão cacodilato 0,05M pH 7,2), pós-fixados em OsO<sub>4</sub>, desidratados em acetona e emblocados na resina epóxica Spurr e polimerizados a 60°C por 48 h (KITAJIMA; NOME, 1999). Os blocos foram seccionados em um ultramicrotomo Leica UCT equipado com navalha de diamante. As secções foram montadas em retículos de cobre de 100 mesh coberta com película plástica Formvar, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900. As imagens foram registradas digitalmente.

## **ELISA**

O teste sorológico ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”), com algumas modificações da forma descrita por Mowat e Dawson (1987), foi usado para confirmar a infecção pelo CiLV-C. Em todos os testes foram incluídos controles negativos (plantas sadias) e positivos (lesões de folhas de laranjeiras), na diluição de 1:1000. Para esta análise foi utilizado antissoro específico contra a provável proteína nucleocapsidial do CiLV-C (p29) (LOCALI-FABRIS et al., 2008). Foram colocados 100 µL das amostras, extraídas com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, diluídas 1:50 (p/v) em placas de ELISA de 96 cavidades e, posteriormente incubadas por 40 minutos, a 37°C. Foram utilizadas duas cavidades para cada amostra. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,003 M KCl, pH 7,4 + 0,5 mL Tween 20). Na etapa seguinte, foram colocados em cada cavidade 100 µL do antissoro diluído 1:1000 em tampão PBS TPB (PBS-Tween + 2% polyvinylpyrrolidone MW 44.000+ 0,2% soro albumine bovina). As placas foram incubadas por 2 horas, a 37°C, sendo posteriormente lavadas como descrito anteriormente. Foram colocados 100 uL do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-8025) diluído 1:34.000 em tampão PBS-TPB e incubado novamente por duas horas a 37°C. As placas foram lavadas novamente e, a seguir, colocados em cada cavidade 100 µL do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/mL). As placas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática. A absorbância de cada uma das cavidades foi medida em leitor de ELISA Metertech Σ 960, utilizando-se um filtro de 405 nm. Extratos de plantas sadias e de plantas sabidamente infectadas com o CiLV-C foram usados como controles. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância da amostra foi superior em três vezes o valor médio de absorbância do extrato da planta sadia.

## **Imunofluorescência**

Foi realizada a detecção *in situ* do CiLV-C por imunofluorescência usando anticorpos da cápside proteica p29. Os tecidos foram fixados imediatamente após a remoção da planta em uma solução Karnovsky modificada (formaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2), desidratados em etanol e infiltrados na resina acrílica LR White (LR White Medium Grade Acrylic Resin) e polimerizados a 70°C por 72 h. Os blocos foram seccionados em cortes finos (1,0µm) no ultramicrotomo Leica UCT equipado com navalha de vidro. Os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro e foram incubados em solução de bloqueio (PBS 0,01M, BSA 1%, Glicina 0,05M) por 30 minutos. A seguir, removeu-se a solução de bloqueio com o auxílio de papel filtro e incubou-se com AS-CP (1:1000) diluído em solução (PBS 0,01M, BSA, 0,1%) por 5 horas. Após 3 lavagens em solução de lavagem (PBS 0,01M, BSA 1%) 5 minutos cada um, foi incubado o AS secundário conjugado com Fluorescein Isothiocyanate, Sigma: Antirabbit IgG FITC conjugate-F0382) (diluição 1:80 em PBS 0,01M, BSA 0,1%, 1,5mL de PEG 2000 a 1% 0,5g de gelatina de peixe) por 1 hora no escuro. Os cortes foram lavados novamente 3 vezes com solução de lavagem, posteriormente montou-se a lâmina adicionando 1 gota de Antifade (Invitrogen: SlowFade Antifade Kit-S2828) sobre as secções. A lamínula foi coberta se selada com esmalte. As lâminas foram armazenadas na geladeira protegidas da luz. As análises foram realizadas em um fotomicroscópio Axioskop Zeiss equipado com fonte luminosa UV e sistema de captura de imagem digital.

## **RT-PCR**

A presença do CiLV-C nas lesões de feijoeiros que foram inoculados pelo ácaro com o vírus CiLV-C foram comprovados por RT-PCR. Utilizando o método estabelecido por LOCALI et al. (2003). Foram avaliadas folhas inoculadas que apresentavam lesões e folhas saudáveis foram usadas como controle negativo. Folhas de laranjeira com lesões como controle positivo.

Para a extração do RNA total utilizou-se o protocolo de Locali et al. (2003). Foram utilizados aproximadamente 50mg de material fresco macerados na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, adicionando-se 500 µL do tampão WB (10mM Tris-HCL pH8, 1mM EDTA pH8,0; 2M NaCL; 0,05% BSA). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas através do agitador e centrifugadas a 12000rpm por 5 minutos. Descartou-se

o sobrenadante e adicionou-se 600µL do tampão CTAB (2% de CTAB; 1,4 M NaCl; 0,01M Tris-HCl pH8; 0,5% β-mercaptoetanol) e, o conteúdo, foi homogeneizado no agitador. A amostra foi incubada por 15-30 minutos a 55°C a 65°C, adicionou-se 400 µL de clorofórmio:álcool isoamílico(24:1) e utilizou-se o vortex para homogeneizar a solução. Procedeu-se a centrifugar as amostras a 12000rpm por 10 minutos e posteriormente a fase aquosa foi transportada para um novo microtubo, ao qual se adicionou um décimo do volume de acetato de amônio 7,5M e um volume de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 20°C por 2horas e centrifugadas a 12000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi desidratado no liofilizador. Para ressuspendê-lo adicionou-se 20µL de água tratada como DEPC. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

Para a síntese do DNA, utilizou-se uma alíquota de 3µL do RNA extraído anteriormente, 1µL de DNTP 2,5mM, 0,8µL de primers randômicos 3µL/uL e 7,7µL de água DEPC, que foram submetidos a uma temperatura de 65°C por 5 minutos e colocados imediatamente no gelo. A este conteúdo foi adicionado 0,5µL de RNase Out (Invitrogen), 2,0µL de DDT(0,1M), 1µL de M-MLRT(200U/µL) e 4,0µL de tampão 5x (Invitrogen). Esta solução foi submetida a temperatura de 37°C por 1hora e a 70°C por 10 minutos. Para a PCR utilizou-se uma alíquota de 3µL de cDNA, 2,5µL de tampão 10X, 0,9µL de MgCL<sub>2</sub> 50mM, 0,5µL de dNTP 2,5mM, 0,5µL dos primers MR-F e -R (10µL), 0,2µL de Taq DNA polimerase (5U/µL)(Invitrogen) e 16,9µL de água DEPC para atingir o volume final de 25,0µL. As amplificações foram realizadas em um termociclador programado com: 1 ciclo de 94°C por 3min seguido de 30ciclos de 94°C por 30segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e 72°C por 5minutos e no final 4°C.

Os resultados das amplificações foram avaliados junto com o marcador 1Kb (1Kb Plus Ladder , Invitrogen) um gel de agarose 1%(TAE 1X) com SYBR® Safe (1:10000, Invitrogen) e visualizados sob luz ultravioleta.

### **Teste de suscetibilidade para outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* em feijoeiros**

Para verificar se feijoeiros seriam também suscetíveis a outros vírus transmitidos pelo ácaro *Brevipalpus*, ácaros virulíferos foram coletados de plantas experimentalmente infetadas pelos seguintes virus: Tipo citoplasmático (a) vírus da pinta verde do maracujá (Passion fruit green spot vírus, PFGSV) infectando folhas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) folhas; (b) vírus da mancha anular de ligustro (Ligustrum ringspot virus, LigRSV) infectando folhas de ligustro (*Ligustrum sinensis* Lour); (c) vírus da mancha

clorótica de *Clerodendrum* (*Clerodendrum* chlorotic spot virus, ClCSV) infetando folhas de coração sangrento (*Clerodendrum x speciosum* Tiej. et. Bin. ); Tipo nuclear: (a) vírus da mancha anular do café (*Coffee ringspot virus*, CoRSV) infectando folhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.); (b) vírus da mancha verde de hibisco (Hibiscus green spot virus, HGSV) infetando folhas de hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L). Os ácaros foram deixados a se alimentar nas folhas de plantas doentes por três dias e posteriormente cinco deles foram transferidos para as primeiras folhas verdadeiras de plantas de feijão (cv. ‘Una’), analisando as plantas diariamente por um período de quatro semanas ou até o aparecimento dos sintomas.

### 3.3 Resultados e Discussão

A descoberta de que plantas de feijão são suscetíveis ao CiLV-C foi por acaso, durante o desenvolvimento dos trabalhos de T.V.M. Groot, estudante de doutorado do Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics da Universidade de Amsterdam. Ele desenvolvia pesquisas com endossimbiontes presentes no ácaro, e para tal Groot coletou ácaros *Brevipalpus* em diversas partes do mundo e os mantinha em colônias isolinhas (a partir de um único ácaro). Numa das colônias, originárias de *B. phoenicis* coletado no estado de São Paulo, aparecia consistentemente lesões necróticas nas folhas. Testes posteriores demonstraram que as lesões foram causadas pelo CiLV-C (GROOT, 2006). Provavelmente os ácaros coletados proviam de um pomar de laranja doce infectado pelo CiLV-C.

Em ensaios preliminares, as lesões foram obtidas inoculando-se feijoeiro cv. ‘Mercana’ e alguns outros cv. com ácaros virulíferos para CiLV-C, em nossas condições. Decidiu-se utilizar cv. ‘Una’, como padrão, por ser de fácil aquisição e boa germinação. A seguir, avaliaram-se 113 de cultivares e linhagens de feijoeiro para se conhecer sua suscetibilidade ao CiLV-C (Tabela 1), tendo-se verificado que todos os genótipos testados apresentaram lesões necróticas localizadas após 5-6 dias de infestados com ácaros *B. phoenicis* virulíferos (Figura 1 B-G). Todos os testes foram simultaneamente avaliados junto com o feijão cv. ‘Una’. Para as avaliações foram utilizadas o primeiro par de folhas verdadeiras, já que estas se expandem rapidamente após a germinação. Foram avaliadas as folhas trifoliadas que também se mostraram suscetíveis ao CiLV-C, mostrando lesões necróticas com um halo amarelo ao redor, em geral, 1-2 dias após o primeiro par (Figura 2). Como o aparecimento do primeiro par de folhas ocorre cerca de dez dias após a semeadura, optou-se por usá-las como procedimento padrão.

Tabela 1 - Lista de linhagens e cultivares de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) testados quanto a suscetibilidade a *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C)

---

**Grãos vermelhos (24)**

AB 136, Chiapas 73 rojo obscuro, CORE 564, Diacol calima, Don Timoteo, Dor 476, DRK 18, Frijolica, G1402, G2333, G51307, IAC Boreal, IAC Harmonia, Iran Jiroft 396, MDRK, Mexico 54, Montcalm, Mortiño, PI 174994, Red Kidney, Riz 30, Rojo de Guia, Roxinho Opaco, TIB 3042

**Grãos brancos (15)**

83N393, Branco Argentino, G2301, G7365, G23858, Kaboom, Lunatus, Mercana, Mexico 222, Michelite, PAN 72, Ojo de Venado, Otebo GN, Perry Marrow, Widuza

**Grãos marrons e amarelos (26)**

6N324, Amendoim, Baetão 83, Bat 332, Bat 477, CF 220240, CNFM 10243, HFS 465-63-1, Flor de Mayo, G5686, G2809, G9811, G10474, G19833, G19927, IAC Bico-de-ouro, IAC Centauro, IAC Esperança, IPA 1, IPA 6, Jalo Precoce, Mexico 324, Mulatinho, PI 1796, PI 20262, SEA 2.

**Grãos roxo (1)**

Rosinha G2

**Grãos pretos (17)**

A 211, BRS Esplendor, Cornell 49-242, IAC Diplomata, IAC Tunã, IAC Una, G3174, G3353, IPR Uirapuru, Frijol Negro, Jamapa, Preto 129, Preto Uberabinha, RAZ 56, Rim de porco preto, TO, TU

**Grãos bege (30)**

Branquinho, BRS Cometa, BRS Estilo, BRS Pontal, Carioca comum, Carioca MG, Emp 407, ESAL-767, FB/GP 258-2, G2858, Gen C2-1-6-1, IAC Alvorada, IAC Carioca Akytã, IAC Carioca Aruã, IAC Carioca Eté, IAC Carioca Tybatã, IAC Carioca Taurino, IAC Formoso, IAC Ybaté, IAPAR 31, IAPAR 81, IPR Eldorado, LR 9115302, Pérola, Pinto 114, Pinto 1564, Pinto nacional, SCS 202 Guarã, D1\*, D2\*

---

\* Linhas transgênicas resistentes ao Vírus do mosaico dourado, do feijoeiro *Bean golden mosaic virus* (BGMV).

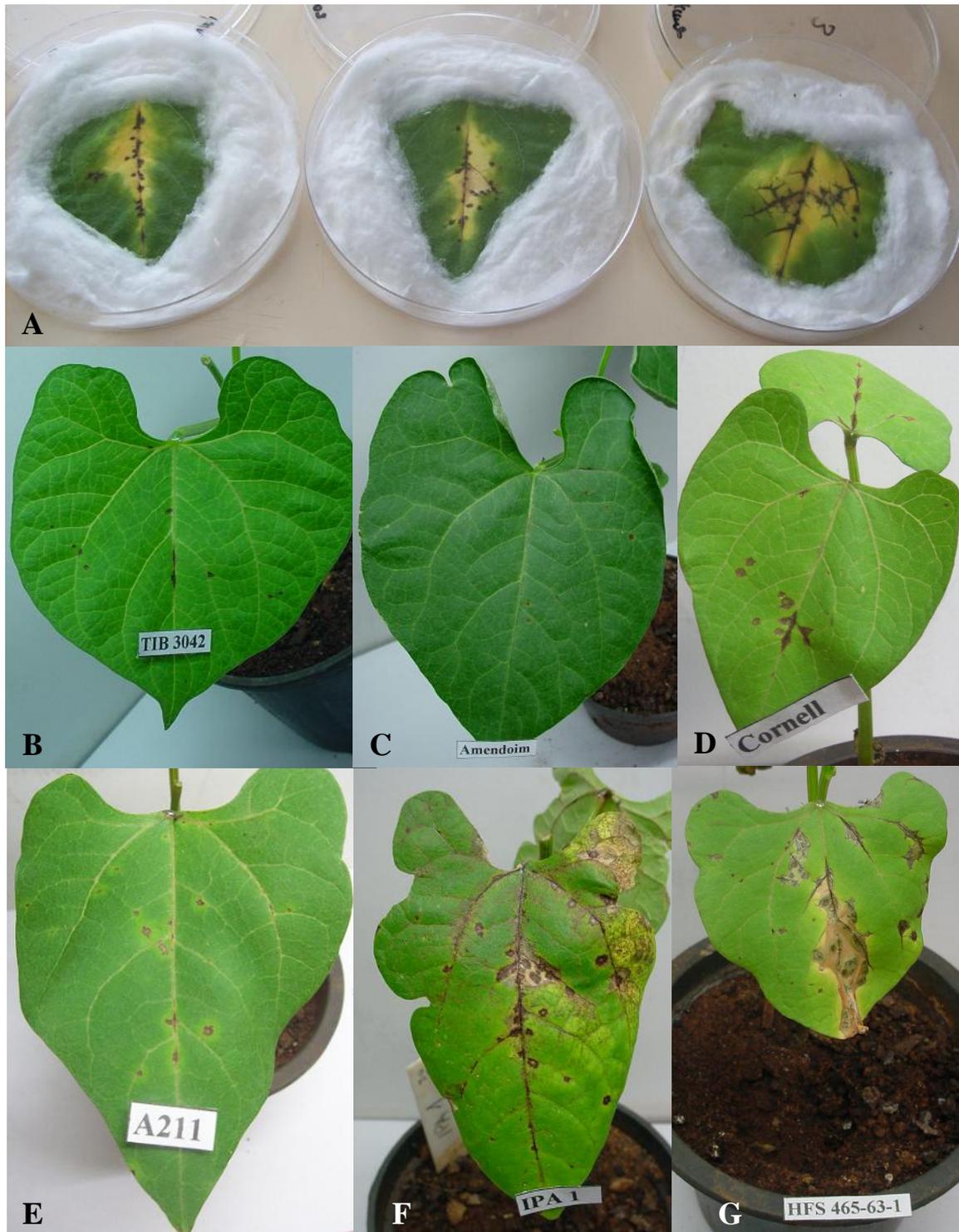


Figura 1 - A) Folhas de feijão cv. 'Una' destacadas e colocadas em placas de Petri, onde foram infestadas com ácaros *Brevipalpus phoenicis* virulíferos para CiLV-C, mostrando lesões necróticas a partir do 5º dia após a infestação; B-G) Folhas de diferentes cultivares B- TIB 42; C- Amendoim ; D- Cornell; E- A 211; F- IPA 1; G- HFS 465-63-1) de feijoeiro, mantidas no vaso e infestadas com *B. phoenicis* virulíferos para CiLV-C, exibindo lesões locais necróticas a partir do 5º dia após a infestação. Nota-se que algumas folhas, quando as lesões estão junto às nervuras, estas se tornam também necrosadas

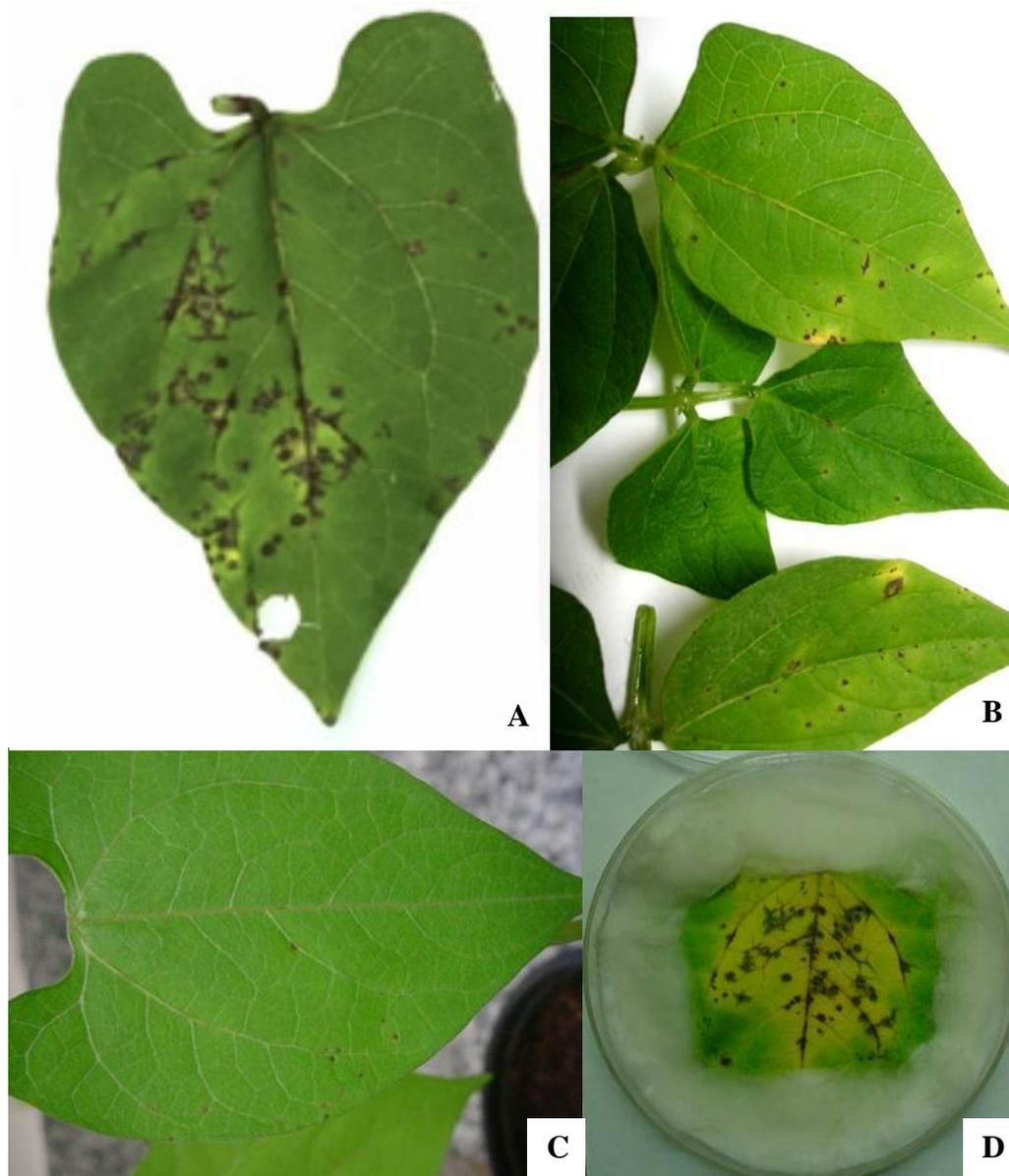


Figura 2 - A) Feijão cv. 'Una' com uma grande quantidade de lesões necróticas localizadas após inoculação experimental com ácaros *B. phoenicis* provenientes de colônia de ácaros criados sobre frutos de laranja doce infectado com leprose, B) folhas trifoliadas de feijão 'Una' seis dias após de ser infestado com ácaros virulíferos, C) pequenas lesões locais necróticas em folhas de feijão 'Una' dos dias após a infestação com ácaros virulíferos e que a planta foi mantida em câmara BOD a uma temperatura de 28°C

As lesões que se apresentam nas folhas são comumente pequenos anéis necróticos (figura 1E; 2B,C). Secções ultrafinas do tecido doente com células necróticas apresentando virions e viroplamas (Figura 5). Com o tempo, as pequenas lesões podem coalescer (Figura 2F,G; 3A). As lesões comumente localizam-se perto das nervuras, o que indica o hábito alimentar desses ácaros. Algumas vezes porções das nervuras se tornam escuras e necrosadas ao longo da veia (Figura 2D,F-G; 3A), esse sintoma possivelmente é devido à necrose da

células da epidermes e células do parênquima o que pode provocar o colapso dos vasos, embora CiLV-C não parece invadir tecidos do floema.

Para confirmar que as lesões foram causadas pelo CiLV-C foram utilizadas imunofluorescência, que indicou a presença da proteína putativa de capsídio p29 nos tecidos com lesões (Figura 3). Também foram avaliadas secções ultrafinas de tecidos com lesões por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) que evidenciou a presença de virions dentro da membrana do retículo citoplasmático e viroplasmas, indicativos da infecção pelo CiLV-C (COLARICCIO et al., 1995; KITAJIMA et al., 2003). Além disso, RT-PCR dos extratos dos tecidos das lesões que amplificou fragmentos de tamanho esperado, correspondente ao CiLV-C (Figura 4 B) usando primers específicos (LOCALI et al., 2003). Finalmente, ELISA detectou o vírus em extratos de tecidos de lesões, com o antissoro contra a p29. Em todos os experimentos realizados foram incluídas amostras de feijão não infectadas como controle negativo e folhas de laranja doce com lesões como controle positivo da doença. Os resultados, em conjunto, demonstraram claramente que as lesões nas folhas de feijoeiro, formadas após sua infestação com ácaros virulíferos, resultaram da infecção pelo CiLV-C.

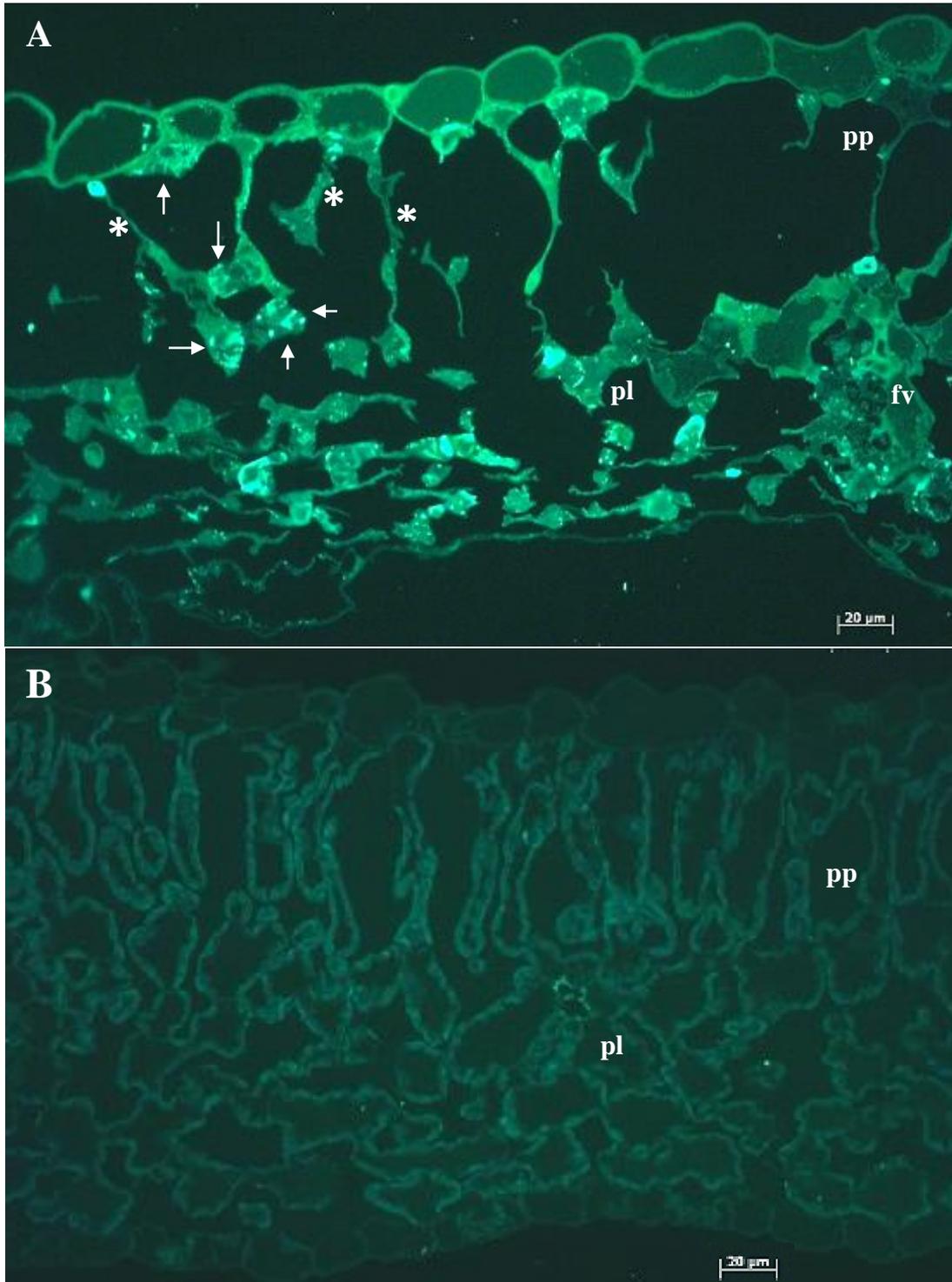


Figura 3 - Imunofluorescência *in situ* pela detecção da proteína p29, núcleo capsídeo de CiLV-C. **A)** Tecido de folha de feijoeiro apresentando lesões locais necróticas após a inoculação de CiLV-C com o ácaro. As estruturas arredondadas marcadas com florescência (setas) são viroplasmas formados no citoplasma após a infecção com CiLV-C. (\*) As células do parênquima paliçádico estão necrosadas, **B)** tecido de folhas de feijoeiro sadio usado como controle; paliçádico (pp), p.lacunoso (pl), feixe vascular (fv)

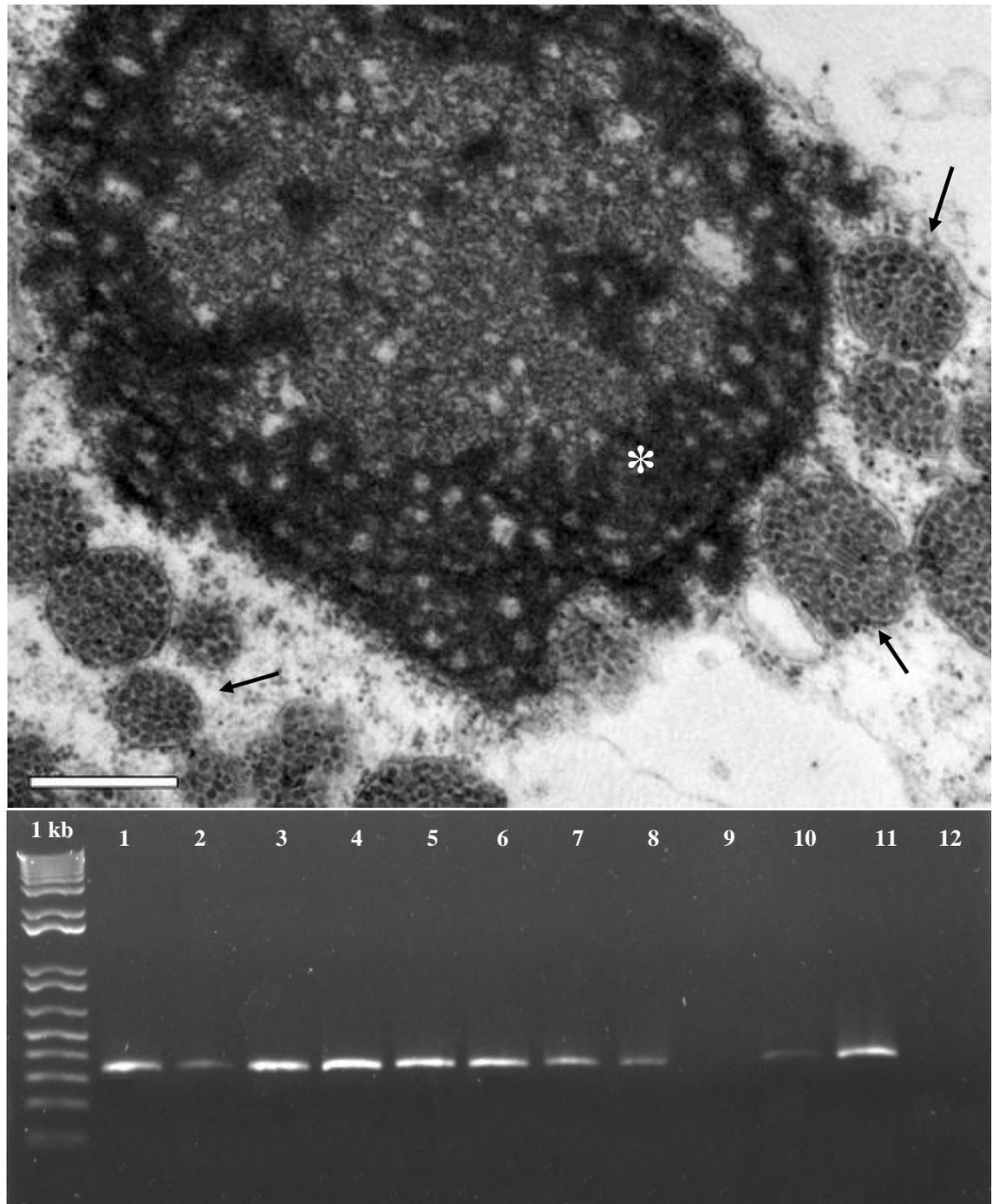


Figura 4 - **A)** Micrografia ao microscópio eletrônico de transmissão de secções ultrafinas das lesões necróticas em folhas de feijoeiro causadas pelo CiLV-C. Note-se agregados de partículas de CiLV-C dentro do retículo citoplasmático (setas) e um grande viroplasma (\*), c cloroplasto, barra 0,5 $\mu$ m. **B)** Electroforese de gel de agarose 1% de produtos de RT-PCR utilizando primers específicos da região do gene que codifica a proteína de movimento de CiLV, de extratos de lesões locais de variedades de feijão, extensão 1-kb Ladder (Invitrogen) 1Cometa, 2Guará, 3ESALQ, 4Ibaté, 5Esplendor, 6 G 3353, 7 Mexico 324, 8 Baetão, 9 planta sadia Baetão, 10 UNA, 11 Una, 12 planta sadia feijão Una

Kitajima et al. (2003) descrevem diferentes tipos de partículas virais transmitidas por ácaros *Brevipalpus* (VTBr) baseados na citopatologia induzida nas células do tecido infectado: (a) Tipo citoplasmático VTBr-C, são partículas pequenas, baciliformes de 60-70nm

x 110-120nm, partículas com membrana dentro do retículo endoplasmático, comumente associadas com inclusões eletrodensas (viroplasmas) presentes no citoplasma. Os tipo VTBr-C do CiLV-C encontram-se possivelmente agrupados dentro do gênero *Cilevirus*, estes apresentam um genoma bipartito (~5 e 9 kb) e ssRNA sentido positivo. Existe a possibilidade de que outros VTBr-C pertençam ao mesmo gênero, como o Passion fruit green spot virus (PFGSV) (ANTONIOLI-LUIZON, 2009) e vírus da mancha anular [*Solanum violaefolium* ringspot virus (SvRSV)] (FERREIRA et al., 2007), dos quais partes do genoma que foram sequenciadas, com similaridades com o do CiLV-C. No caso do *Ligustrum* ringspot virus (LigRSV) (KITAJIMA et al., 2010), do qual não há dados moleculares ainda, é um VTBr-C pela análise morfológica. Acredita-se que um isolado do HGSV do Havaí foi completamente sequenciado e embora tenha semelhanças na organização do genoma este tem um genoma tripartito de ssRNA, característica que permitiria que fosse proposto como nenhum outro tipo do gênero Higrevirus (MELZER et al., 2012). (b) o tipo nuclear (VTBr-N), no qual o vírus tipo é o da mancha das orquídeas (Orchid fleck virus, OFV), que se caracteriza por partículas em forma de bastonete (40 nm x 100-110 nm) sem membrana e dispersas no citoplasma; este vírus induz um viroplasma electro transparente nuclear. Kondo et al. (2006) obtiveram a sequência completa do OFV, composta por duas partes de ssRNA (6kb cada uma) de cadeia simples, senso (-), e concluem que a organização genômica é similar a dos rhabdovirus e propuseram um gênero novo Dichorhabdovirus.

Há outros possíveis VTBr-N cujos genomas foram parcialmente sequenciados e que apresentam sequências similares as do OFV: CoRSV (KITAJIMA et al., 2011) e o CICSV (KUBO et al., 2007).

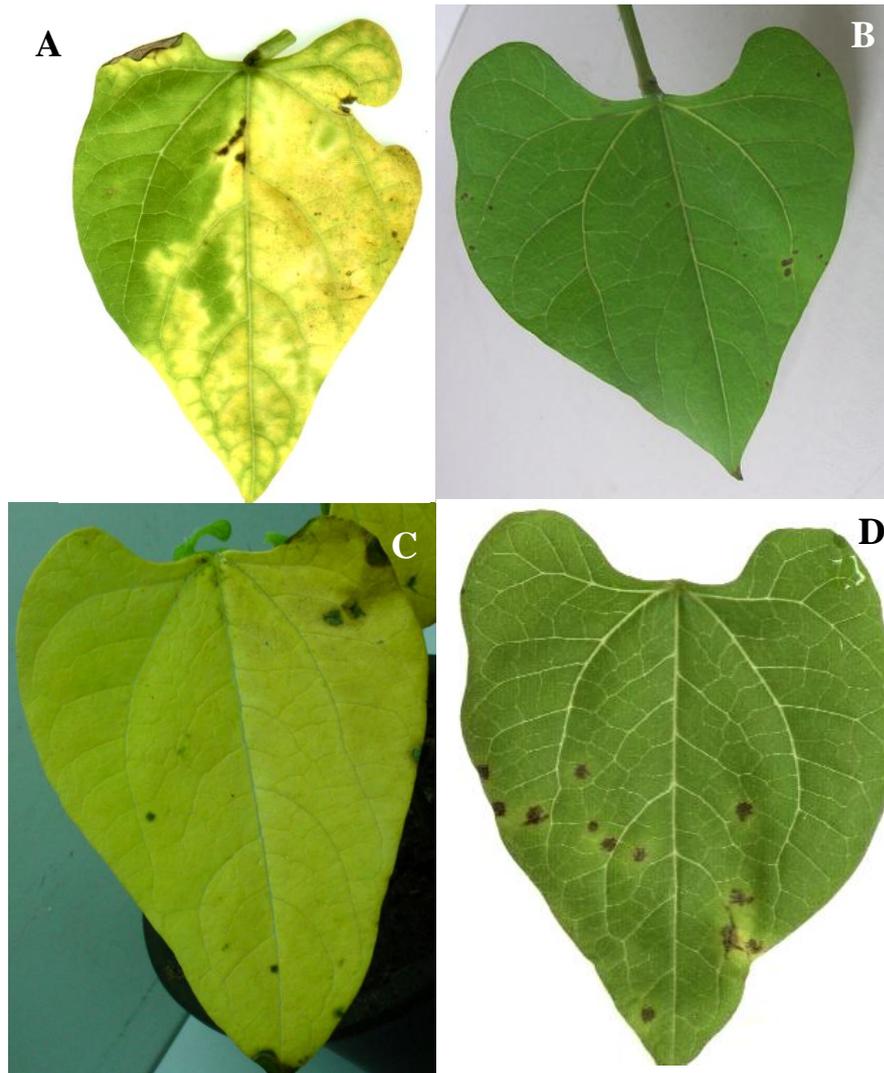


Figura 5 - Lesões cloróticas induzidas em folhas de feijoeiro cv. 'Una' por ácaros de *B. phoenicis* depois de alimentar-se de plantas com vírus de tipo citoplasmático: A- Passion fruit green spot virus (PFGSV); B- *Ligustrum* ringspot virus (LigRSV); C- *Hibiscus* green spot virus (HGSV)

A inoculação mecânica de OFV, CoRSV e CICSV induzem lesões locais cloróticas em *Chenopodium quinoa* Willd. e *C. amaranticolor* Coste & Reyn. Essas plantas quando mantidas em temperaturas de 28-30°C (KONDO, 2003; BOARI et al., 2004; KITAJIMA et al., 2008) resulta em infecção sistêmica. Há indicativos que a alta temperatura interrompe o mecanismo que mantém estes vírus localizados em lesões. Para verificar que isso possa acontecer com o CiLV-C, folhas em placas de Petri e plantas em vasos foram colocadas numa câmara de crescimento a 28°C. Embora nenhuma infecção sistêmica tenha ocorrido, uma redução significativa no período de aparecimento de lesões foi notada. Em vez dos regulares 5-6 dias, as lesões apareceram nas folhas infestadas com ácaros virulíferos em apenas dois

dias (Figura 2 C). Assim, havendo premência de tempo, poder-se-ia recorrer a este expediente para se ter resultados em menos tempo.

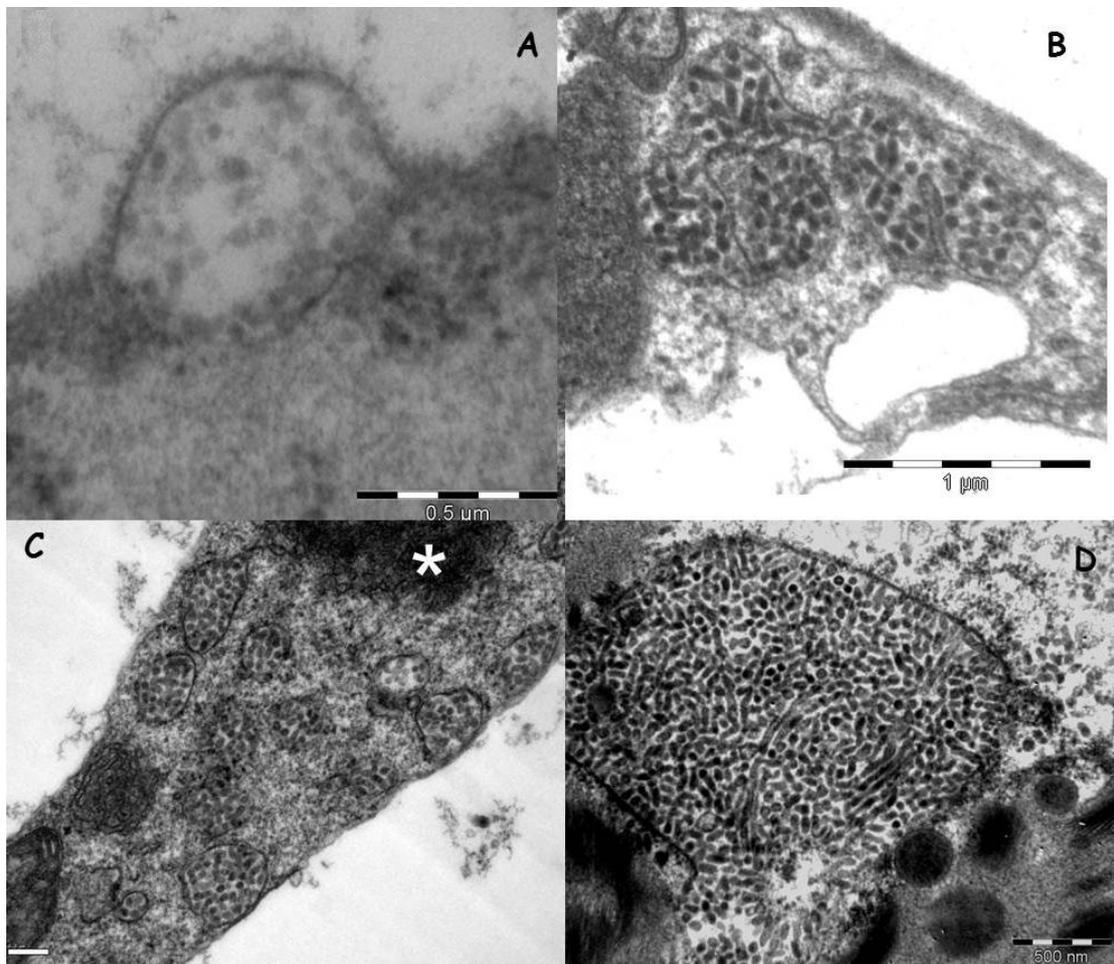


Figura 6 – Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão das secções de lesões em tecido foliar de feijoeiros resultantes da infecção por diferentes vírus transmitidos por *Brevipalpus* do tipo citoplasmático: A. pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV); B. mancha anular do ligustro (*Ligustrum* ringspot virus- LigRSV); C. mancha verde do hibisco (*Hibiscus* green spot vírus- HGSV); D. mancha anular do solano (*Solanum violaeifolium* ringspot virus- SvRSV). Presumíveis virions presentes no retículo citoplasmático. Viroplasma (\*)

Todos os VTBr-C avaliados (PFGSV, LigRSV, HGSV) causaram lesões necróticas locais em folhas de feijão IAC ‘Una’ após inoculação com ácaros virulíferos. Os VTBr-N avaliados (CoRSV e CICSV) não causaram lesões, mas este dado deve ser reavaliado. A demonstração de que as lesões foram causadas pela infecção por estes VTBr-C foi confirmada pelos efeitos citopáticos característicos deste grupo de vírus (Figura 6, AD). Embora a

amostragem tenha sido ainda pequena, o feijão pode ser uma planta de teste útil para os VTBr-C.

### 3.4 Conclusão

A planta de feijão pode ser usada como indicadora em várias linhas de pesquisa com CiLV-C. Permite um diagnóstico preliminar, rápido e de baixo custo, assim como pode ser útil para ensaios de relação vírus-vetor-hospedeiro. Adicionalmente, a possibilidade de uso de folhas destacadas da planta facilita em muito as manipulações e resulta em economia de tempo e espaço.

### Referências

- ANTONIOLI-LUIZON, R. **Sequenciamento parcial do vírus da pinta verde do maracujazeiro (Passion fruit green spot virus- PFGSV), desenvolvimento de métodos para sua detecção e estudos sobre sua variabilidade genética.** 2009. 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.; KUBO, K.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 284-292, 2010.
- BOARI, A.J.; FREITAS-ASTÚA, J.; FERREIRA, P.T.O.; NEDER, D.G.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; KITAJIMA, E.W. Purification and serology of the coffee ringspot virus. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 30, n. 4, p. 453-458, 2004.
- CARTENS, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses **Archives of Virology**, Vienna, v. 155, n. 1, p. 133–146, Jan. 2010.
- CHIAVEGATO, LG. Transmissão da leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. In: OLIVEIRA, C.A.L. (Ed.). **Leprose dos citros.** Jaboticabal: FUNEP, 1995. p. 49-56.
- 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**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 208-213, jun. 1995.
- FAWCETT, H.S Scaly bark or nail head rust of citrus. **Florida Agriculture Experimental Station Bulletin**, Gainesville, v. 106, p. 41, June 1911.

FREZZI, M.S. La lepra explosiva del naranjo. **Boletín Frutas y Hortalizas**, Buenos Aires, v. 5, n. 46, p. 16, 1940.

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 Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 264-269, 2007.

GARITA, L.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W. Amplia-se a lista de hospedeiras experimentais do vírus da leprose C (*Citrus leprosis virus*- CiLV-C). In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 38., 2012. Jaguariúna. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 38, 2002. Suplemento. 1 CD-ROM.

GROOT, T.V.M. **The effects of symbiont induced haploid thelytoky on the evolution of the *Brevipalpus* mites**. 2006. 154 p. Thesis (PhD in Science: Biodiversity) - University of Amsterdam, Amsterdam, 2006.

GROOT, T.V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus phoenicis* transmits citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) to common bean (*Phaseolus vulgaris*) under experimental conditions. **Virus Review and Research**, Campinas, v. 11, p. 67-68, 2006. Supplement.

KIKKERT, M.; VAN POELWIJK, F.; STORMS, M.; KASSIES, W.; BLOKSMA, H.; VAN LENT, J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 1755-1763, 1997.

KITAJIMA, E.W.; NOME, C.F. Microscopia eletrônica em virologia vegetal. In: DO CAMPO, D.; LENARDON, S.L. (Ed.). **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: IFFIVE/JICA, 1999. p. 59-87.

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

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTÚA, J. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus* mite-transmitted viruses. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, p. 348-371, 2010.

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

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; BRAGHINI, M.T.; FAUZUOLI, L.C.; LOCALI-FABRIS, E.C.; SALAROLI, R.B. Natural infection of several *Coffea* species and hybrids and *Psilanthus ebracteolatus* by the Coffee ringspot virus (CoRSV). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 503-507, 2011.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. Citrus leprosis in Florida, USA, appears to have been caused by the nuclear type of Citrus leprosis virus (CiLV-N). **Virus Review and Research**, v. 16 n. 1/2, Jan./Dec. 2011. Disponível em:

<[http://www.virusreviewsandresearch.com/ISSUE16\\_1-2.html](http://www.virusreviewsandresearch.com/ISSUE16_1-2.html)>. Acesso em: 08 out. 2012.

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

KONDO, H.; MAEDA, T.; TAMADA, T. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. **Experimental Applied Acarology**, Amsterdam, 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**, London, v. 87, p. 2413-2421, 2006.

KUBO, K.S.; ANTONIOLI-LUIZONI, R.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. Diagnose molecular do vírus da mancha clorótica de *Clerodendron* (CICSV). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, suppl. S12, 2007.

LENADON, S.L. Serologia. In: DO CAMPO, D.; LENARDON, S.L. (Ed.). **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: IFFIVE/JICA, 1999. p. 11-39.

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

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA J.; SOUZA A.A.; TAKITA M.A.; ASTÚA-MONGE G.; ANTONIOLLI, 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**, Saint Paul, v. 87, p. 1317-1321, 2003.

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

LOCALI-FABRIS, E.; 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. **Journal of General Virology**, London, v. 87, p. 2721-2729, 2006.

LOCALI-FABRIS, E.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA, R.; FREITAS-ASTUA, J., CALEGARIO, RF.; SALAROLI, RB.; KITAJIMA E.W.; MACHADO, MA. *In vitro* expression and production of antiserum to the capsid protein (P29) of citrus leprosis virus- C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte.

**Resumos...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. 1 CD-ROM.

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; HU, J.S. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* with citrus leprosis-like symptoms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, p. 122-127, 2012.

MUSUMECI, M.R.; ROSSETTI, V. Transmissão de sintomas de leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciencia e Cultura**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 228, 1963.

NUNES, M.A.; BERGAMINI, M.P.; COERINI, L.F.; BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.M.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus leprosis virus C naturally infecting *Commelina benghalensis*, a prevalent monocot weed of Citrus orchards in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 5, p. 770, 2012a.

NUNES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.L.; OLIVEIRA, M.L.; KITAJIMA, E.W.; HILF, M.E.; GOTTWALD, R.T.; FREITAS-ASTÚA, J. Transmission of citrus leprosis virus, cytoplasmic type, by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to alternate host plants found in citrus orchards. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, p. 968-972, 2012b.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASSUMPCÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.; RANÇO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO J.R.; H., OLIVEIRA, F., GIACHETTO, P.F.; FERRAZ, 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 virus, cytoplasmic type (CiLV). **Virus Genes**, Dordrecht, v. 32, p. 289-298, 2006.

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

VERGANI, A.R. Transmisión y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo. **Ministerio de la Agricultura de la Nación**. Instituto de Sanidad Vegetal Serie A. Buenos Aires, v. 5, n. 3, p. 11, 1945.

## 4 INTERAÇÃO VIRUS -VETOR NO PATOSSISTEMA DA LEPROSE DOS CITROS

### Resumo

A leprose dos citros é uma das doenças mais destrutivas da citricultura brasileira. Na última década, avanços importantes foram alcançados, tais como o sequenciamento completo do genoma do agente causal, *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), que pertence ao gênero novo *Cilevirus*. O vírus é transmitido pelo ácaro do gênero *Brevipalpus*, possivelmente de uma forma circulativa e o sintoma por ele induzido é caracterizado pelo aparecimento de lesões nas folhas, frutos e caules. Apesar de ser considerado limitado a *Citrus* spp., o vírus foi encontrado infectando naturalmente outras plantas como *Swinglea glutinosa* e *Commelina benghalensis* e experimentalmente foi capaz de ser transmitido pelo ácaro a um grande número de espécies de plantas. Apesar desses avanços, pouco se sabe sobre a relação vírus/vetor. Usando feijão como planta teste e ácaros virulíferos *B.phoenicis*, foi possível determinar alguns parâmetros dessa relação: período de alimentação para aquisição do vírus-4 h; período de alimentação para inoculação do vírus-4h; período de conservação do vírus no ácaro de 12 dias, porcentagem de ácaros virulíferos colonizando tecidos infectados até 45%. Os experimentos também confirmaram que todas as etapas de desenvolvimento do ácaro (larvas, proto-deutonymfa e adulto) são capazes de transmitir CiLV-C, e que o vírus pode ser adquirido a partir de lesões de folhas, frutos e caules. Esses parâmetros podem ser relevantes para o entendimento da epidemiologia da leprose dos citros C patossistema.

Palavras-chave: período de acesso à aquisição; período de acesso à inoculação; *Brevipalpus phoenicis*; Epidemiologia

## INTERACTION VIRUS-VECTOR IN THE PATHOSYSTEM CITRUS LEPROSIS

### Abstract

Citrus leprosis C has been one of the most destructive diseases to the Brazilian the citrus industry. In the last decade important progresses have been achieved such as the complete genome sequencing of the causal agent, *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), belonging to a new genus *Cilevirus*. It is transmitted by the tenuipalpid mite *Brevipalpus phoenicis*, possibly in a circulative manner and is characterized by localized symptoms on the leaves, fruits and stems. It occurs in the entire American continent from Mexico do Argentina. Though considered restricted to *Citrus* spp., the virus was found naturally infecting other plants as *Swinglea glutinosa* and *Commelina benghalensis*, and experimentally was able to be mite transmitted to a large number of plant species. Despite these advances little was known about the virus/vector relationship. Using common bean as a suitable test plant, since it can produce localized necrotic lesions within five days after infestation by viruliferous *B.phoenicis* mites, some parameters of this relationship were determined: acquisition feeding period- 4 h; inoculation feeding period- 4h; period of retention of the virus by a single viruliferous mite- at least 12 days; percentage of viruliferous mites from a mites colonizing infected tissues- 45%. The experiments also confirmed that all the developmental stages of the mite (larvae, proto- and deutonymph and adult are able to transmit CiLV-C, and that virus can be acquired from lesions of leaves, fruits and stems. These parameters are important contribution for the understanding of the epidemiology of the citrus leprosis C pathosystem.

Keywords: acquisition feeding period; inoculation feeding period; *Brevipalpus phoenicis*; Epidemiology

#### 4.1 Introdução

A leprose dos citros é uma importante doença viral que se encontra distribuída no continente Americano. Esta doença é caracterizada por lesões localizadas em folhas, frutos e ramos, e em casos severos pode causar a morte da planta. É transmitida por ácaros tenuipalpeados do gênero *Brevipalpus*, que transmitem dois diferentes tipos de vírus: o mais prevalente e agressivo, de tipo citoplasmático causado por *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), e um mais raro, tipo nuclear, *Citrus leprosis virus nuclear type* (CiLV-N), que aparentemente está presente apenas em áreas frias (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2010). Acredita-se que a leprose originalmente descrita na Flórida por volta de 1900, e que desapareceu depois de 1960 pode ter sido do tipo nuclear (KITAJIMA et al., 2011).

Sendo o CiLV-C o VTBr mais importante economicamente, fizeram-se grandes esforços para melhor entender seu patossistema. Dentre os vários avanços, destaca-se a obtenção de ferramentas moleculares para a detecção do vírus (LOCALI et al., 2003) e o sequenciamento completo de seu genoma (PASCON et al., 2006). Este mostrou ter uma organização diferente como outros vírus, sendo classificado em um novo gênero, *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006). O conhecimento do genoma permitiu obter um antissoro específico da proteína putativa nucleocapsidial p29 pela sua expressão em um sistema bacteriano (LOCALI-FABRIS et al., 2008).

Sabe-se que a laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] é a espécie mais suscetível ao CiLV-C seguida de tangerina (*C. reticulata* Blanco) e pomelo (*C. paradisi* Macfad), que são moderadamente suscetíveis, por último os limões (*C. limon* L.), que são praticamente imunes à doença (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2010). Outras informações foram obtidas posteriormente, como dois casos de infecção natural em outras espécies: a *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr., na Colômbia (LEON et al., 2006) e *Commelina benghalensis*, no Brasil (NUNES et al., 2011). Além disso, foi possível mostrar com testes preliminares de laboratório que o CiLV-C tem uma ampla lista de plantas hospedeiras (GARITA et al., 2011). Essas informações podem ter implicações na epidemiologia da doença.

Apesar desses avanços, os dados sobre a relação vírus/vetor no patossistema CiLV-C ainda são escassos. Sabe-se que todos os estádios ativos de desenvolvimento de *B. phoenicis* são capazes de transmitir CiLV-C (CHIAVEGATO, 1955, BASTIANEL et al., 2010). Outra informação importante da transmissão foi acrescentada pelo trabalho realizado em 2010 por Kitajima e colaboradores que detectaram o vírus no ácaro vetor, sugerindo que a relação vírus /vetor é do tipo circulativa.

Um dos problemas principais para estes estudos é a falta plantas indicadoras adequadas, uma vez que as laranjas doces quando inoculadas experimentalmente com ácaros virulíferos, podem levar de 4-6 semanas para desenvolver os sintomas iniciais, pequenas lesões cloróticas, nas folhas. Existem dados preliminares sobre a aquisição do vírus e período de inoculação (FREITAS-ASTUA et al., 2010), usando laranjeiras como indicadoras. Mas a descoberta de que o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma excelente planta teste para CiLV-C (GROOT et al., 2006) (capítulo 3), permitiria obter estes dados com maior precisão, em menor tempo, a um custo mais baixo. No feijão o vírus produz lesões necróticas após a inoculação do ácaro em um período de cinco dias (TASSI et al., 2010; capítulo 3 desta dissertação). O presente trabalho relata a obtenção de diversos parâmetros da relação CiLV-C/*Brevipalpus phoenicis*, utilizando feijoeiros como planta indicadora, referindo-se além dos tempos de alimentação para aquisição e inoculação do CiLV-C, mas outros dados como a eficiência de transmissão do vírus por indivíduos de uma população, dos diferentes estádios e das fontes de inóculo, e também do hábito alimentar do ácaro.

## **4.2 Material e Métodos**

### **Material**

Colônias de *B. phoenicis*

Ácaros não virulíferos foram mantidos sobre frutos de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Também foram mantidas colônias sobre folhas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* L.). Para obtenção de ácaros virulíferos, ácaros da colônia foram transferidos com auxílio de um pincel para frutos infectados com CiLV-C ou para folhas com lesões de leprose, onde se alimentaram por um período de 2-3 dias.

## Plantas testadas

Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. 'Una' foram usadas como plantas indicadoras. As sementes foram semeadas em potes de 10 cm de diâmetro, em solo esterilizado, e posteriormente mantido em casa de vegetação. As plantas foram utilizadas cerca de 10 dias após a emergência, quando elas exibiam o primeiro par de folhas verdadeiras. Foi aplicada no pecíolo da folha uma pequena quantidade de cola Tanglefoot® para que os ácaros ficassem confinadas à folha onde foram colocados. Em algum dos testes foram utilizadas folhas de feijão destacadas e colocadas em placa de Petri, sobre um papel filtro e algodão umedecido, para manter a folha e confinar os ácaros.

## Determinação do período de acesso à aquisição (PAA) do CiLV-C

Ácaros adultos foram colocados para se alimentarem durante diferentes períodos de 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas sobre uma folha de laranja com sintomas de leprose, mantida em uma placa de Petri. Estes intervalos foram utilizados porque ensaios prévios mostraram que a transmissão ocorria com PAA inferior a 24 h (TASSI et al., 2009). Posteriormente foram transferidos para folhas de feijoeiro cv. Una. As transferências foram feitas com auxílio de uma agulha de extremidade fina. Com cinco ácaros e quatro repetições por tratamento. As leituras do aparecimento das lesões foram feitas nas folhas diariamente durante 10 dias.

## Determinação do período de acesso à inoculação (PAI) do CiLV-C

Os ácaros foram colocados em folhas de citros com lesões e foram transferidos em grupos de cinco para folhas saudáveis de feijoeiro cv. Una. Em cada teste os ácaros foram deixados se alimentar por períodos de tempo de 1, 2, 4 e 6 h e posteriormente removidos da folha. Aqui, novamente, estes períodos foram selecionados em função de dados preliminares que indicavam o PAI inferior a 24 h (TASSI et al., 2009). As transferências foram feitas com auxílio de uma agulha de extremidade fina. O experimento contou com quatro repetições por tratamento. As leituras do aparecimento das lesões foram feitas nas folhas diariamente durante 10 dias.

### Período de retenção do CiLV-C

Adultos procedentes de frutos com lesões lepróticas foram transferidos para folhas destacadas de feijoeiro cv. Una, mantidas em placa de Petri, por um período de 24 horas e posteriormente foram transferidos a outra folha e assim sucessivamente nos dias subsequentes, enquanto os ácaros se mantivessem vivos. As transferências foram feitas com auxílio de uma agulha de extremidade fina. O experimento foi composto de 10 ácaros com três repetições. As leituras do aparecimento das lesões foram feitas nas folhas diariamente durante 10 dias.

### Transmissibilidade do CiLV-C por diferentes estádios de desenvolvimento de *B.phoenicis*

Grupo de 10 indivíduos avirulíferos (larva, proto-, deutoninfa e adulto) foram postos para se alimentar sobre folhas com sintomas da leprose durante um PAA de 48 h e posteriormente foram transferidos ao primeiro par de folhas verdadeiras de feijoeiro mantido no vaso. Diariamente foram observadas para avaliar a presença de lesões. Foram incluídos nestes ensaios machos de *B. phoenicis*. Machos ocorrem em baixa porcentagem em populações tanto de campo quanto experimentais. Contudo, pode-se conseguir até ca. 30% de machos, através de tratamento da colônia com tetraciclina (NOVELLI<sup>4</sup>, V, comunicação pessoal). Machos foram empregados nos testes.

### Porcentagem de ácaros virulíferos com capacidade para transmitir CiLV-C

Ácaros de uma colônia criada sobre frutos doentes com sintomas de leprose foram transferidos individualmente para o primeiro par de folhas de feijoeiro, destacados e mantidos em placa de Petri fazendo-se leituras diárias do aparecimento de lesões por um período de 10 dias. Também foram coletados ácaros presentes em folhas, frutos e ramos de pomares de laranja doce, não pulverizados, da Fazenda Cambuí de Matão, e do Centro APTA Colina, ambas em São Paulo. Nestes ensaios, o número de ácaros utilizados foi de 50 ou 100, dependendo da disponibilidade dos mesmos.

### Transmissão transovarial

Ovos foram removidos de uma colônia de ácaros de *B. phoenicis* mantida sobre frutos de laranja doce com lesões lepróticas e transferidos sobre fruto de laranja sadia. Foram colocados 60 ovos e posteriormente foram transferidos 10 indivíduos de cada estádio: larva,

---

<sup>4</sup> NOVELLI, V. Comunicação pessoal em 11 de outubro de 2012

proto-, deutoninfa e adulto para folhas de feijão mantidas em placas de Petri e avaliadas por um período de duas semanas para observar o aparecimento de sintomas.

Avaliação de diferentes fontes de CiLV-C para transmissão pelo ácaro:

Foram transferidos grupos de 20 ácaros adultos sem vírus para folhas, ramos e frutos com lesões causadas pelo CiLV-C. Estes ácaros foram deixados para se alimentar por três dias e posteriormente foram transferidos para folhas de feijão colocadas em placas de Petri e mantidas até apresentar sintomas.

Confirmação da transmissão do CiLV-C pelo ácaro

Para a confirmação do CiLV-C dos testes realizados foram analisadas algumas das amostras por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e pelo teste sorológico ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”)

Para ensaios PTA-ELISA seguiu-se o método descrito por Mowat e Dawson (1987), com algumas modificações. Em todos os testes foram incluídos controles negativos (plantas saudas) e positivos (lesões de folhas de laranjeiras), na diluição de 1:1000. Para esta análise foi utilizado antissoro específico contra a presumível proteína nucleocapsidial do CiLV-C (p29) (LOCALI-FABRIS et al., 2008). Foram colocados 100 µL das amostras, extraídas com tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, diluídas 1:50 (p/v) em placas de ELISA de 96 cavidades e posteriormente incubadas por 40 minutos, a 37°C. Foram utilizadas duas cavidades para cada amostra. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,003 M KCl, pH 7,4 + 0,5 mL Tween 20). Na etapa seguinte, foram colocados em cada cavidade 100 µL do antissoro diluído 1:1000 em tampão PBS TPB (PBS-Tween + 2% polyvinylpyrrolidone MW 44.000+ 0,2% Soro de albumine bovina). As placas foram incubadas por 2 horas, a 37°C, sendo posteriormente lavadas como descrito. Foram colocados 100 uL do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-8025) diluído 1:34.000 em tampão PBS-TPB e incubado novamente por duas horas a 37°C. As placas foram lavadas novamente e, a seguir, colocados em cada cavidade 100 µl do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/mL). As placas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro, onde ocorrerá a reação enzimática. A absorbância de cada uma das cavidades foi medida em leitor de ELISA Metertech Σ 960, utilizando-se um filtro de 405 nm. Extratos de plantas saudas e de plantas sabidamente infectadas com o CiLV-C são

usados como controles. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorvância foi superior em três vezes o valor médio de absorvância do extrato da planta sadia.

Para MET foram fixados pequenos fragmentos em uma solução Karnovsky modificada (formaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2), pós-fixados em OsO<sub>4</sub>, desidratados em acetona e polimerizados na resina epóxica Spurr e polimerizados a 60°C por 48 h. As amostras de ácaros foram fixadas no Karnovsky modificado e desidratado com acetona, emblocadas na resina epóxica Spurr e polimerizadas a 70°C por 72h (KITAJIMA; NOME,1999). Os blocos foram seccionados em um ultramicrotomo Leica UCT equipado com navalha de diamante. As secções foram montadas em retículos de cobre e contrastadas com acetato de uranila 3% e citrato de chumbo e analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900. As imagens foram registradas digitalmente.

#### 4.3 Resultados e Discussão

Na determinação do período de acesso para aquisição do CiLV-C foram realizadas avaliações com intervalos de 2 h até 24 horas e verificamos que 4 horas seria o tempo mínimo necessário de alimentação em plantas infectadas para que o ácaro adquira o vírus (tabela 1).

Tabela 1 – Transmissão de CiLV-C por *B. phoenicis* em *P. vulgaris* após diferentes períodos de acesso à aquisição em plantas infectadas (PAA)

PAA (h)	Número de folhas testadas	Dias para apresentar	
		lesões	Número de lesões por folha <sup>a</sup>
2	40	-	-
4	40	4	< 10
6	40	4	< 10
8	40	4	< 10
12	40	4	< 20
24	40	3	< 20

<sup>a</sup> Cada folha foi exposta a 5 ácaros durante um período de acesso à inoculação de 1 dia.

No caso do período de acesso à inoculação foram realizadas avaliações de 1 a 6 horas sendo possível determinar que os ácaros, uma vez tendo adquirido o CiLV-C, são capazes de transmitir o vírus com apenas 4 horas de alimentação (Tabela 2).

Tabela 2 – Transmissão de CiLV-C por *B. phoenicis* em *P. vulgaris* após diferentes períodos de acesso à inoculação em plantas infectadas (PAI)

PAI <sup>a</sup> (h)	Número de folhas testadas <sup>b</sup>	Dias para apresentar lesões	Número de lesões por folha <sup>b</sup>
1	40	-	-
2	40	-	-
4	40	4	< 10
6	40	4	<10

<sup>a</sup> Antes do PAI em folhas saudáveis os ácaros foram submetidos a um PAA de 1 dia em plantas fonte

<sup>b</sup> Cada folha foi exposta a 5 ácaros

Estes dois ensaios indicam que tanto para aquisição como para inoculação do vírus, o período de alimentação do ácaro pode ser extremamente curto. É possível que seja até menor, pois não há informações de quando o ácaro inicia sua alimentação, assim que é transferida para a folha do feijoeiro indicador. É possível que, dado o estresse da transferência, leve vários minutos até se recompor e procurar alimentar-se.

Não foram feitos experimentos para avaliar o período de latência requerido para transmissão, isto é, o mínimo de tempo necessário entre adquirir o vírus e passar a transmiti-lo. Como as evidências existentes indicam que o vírus circula no corpo do ácaro, sem, contudo replicar-se (KITAJIMA; ALBERTI, 2010), seria o tempo entre acesso à aquisição do vírus, e o tempo de acesso à inoculação do vírus. Para tal o vírus deve ser transferido do lumen do sistema digestivo (complexo de cecum do intestino médio) para o celoma, e daí para o canal do estilete, possivelmente via glândulas prosomais, equivalentes à salivar. Contudo, os ensaios de PAA dão indicações de que este período de latência deve ser curto, poucas horas provavelmente, pois consistentemente, as lesões apareciam nestes ensaios após cinco dias, como nos outros ensaios, em que os ácaros permaneceram dias mantidos sobre lesões.

Os resultados dos ensaios de transmissão do CiLV-C por diferentes estádios de desenvolvimento do *B. phoenicis* virulíferos (Tabela 3) mostram que todos eles foram capazes de adquirir e transmitir o vírus, confirmando dados anteriores (CHIAVEGATO, 1995). Os machos também transmitiram CiLV-C, como anteriormente relatado por Novelli et al. (2007), indicando que a bactéria simbiote *Candidatus Cardinium* não teria participação no processo de transmissão do vírus, uma vez que os machos não se acham infetados por ela, mas as fêmeas sim (WEEKS et al., 2001).

Tabela 3 - Determinação da transmissão do CiLV-C por diferentes estádios de *Brevipalpus phoenicis* criados sobre frutos de laranja com lesões lepróticas e usando folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) como planta indicadora

Estágios	Número de folhas testadas	Número de folhas com lesões locais	% de transmissão
Larva	20	9	45
Protoninfa	40	33	80
Deutoninfa	40	37	90
Adulto (fêmeas)	100	61	61
Machos	21	9	45

\* Foi colocado 1 ácaro por folha.

Estes resultados confirmam relatos anteriores de que todas as fases de desenvolvimento são capazes de transmitir CiLV-C, em testes onde utilizaram citros como indicadora. A vantagem observada durante estes testes onde foi utilizado o feijão como planta indicadora, foi que os resultados são obtidos em período muito mais curto de até 5 dias enquanto o uso de laranjeiras, que dentre as plantas cítricas é a mais suscetível, resulta no aparecimento das primeiras lesões em 4-6 semanas ou mais, dependendo da planta e das condições ambientais. É importante mencionar que, como cada folha de feijão foi infestada por um ácaro apenas, pode-se concluir que os todos os estádios imaturos têm a capacidade de transmitir a doença, inclusive as larvas que apresentaram uma porcentagem de 45% (9/20), menor do que os estádios de ninfais (protoninfa 33/44 e deutoninfa 37/40) tem como capacidade de transmissão. Como as larvas são muito pequenas e delicadas, a taxa de mortalidade durante as manipulações é muito alta, apesar dos cuidados, quando comparada com a de outros estádios o que reflete na eficiência de transmissão. Os adultos que são mais resistentes e fáceis de manipular tiveram eficiência (>60%) significativamente melhor na transmissão.

Os resultados dos testes de transmissão transovariana do CiLV-C por *B. phoenicis* mostraram que nenhum dos ácaros provenientes de ovos de uma colônia de fêmeas criadas sobre laranjas com sintomas de leprose se tornou virulífero o que confirma estudos anteriores (CHIAVEGATO, 1995; BASTIANEL et al., 2010).

A tabela 4 mostra os resultados de transmissão utilizando diferentes partes da planta como fonte para adquirir o vírus e posteriormente transmiti-lo. Nesta avaliação foram colocados grupos de 5 ácaros. Todas as fontes foram efetivas para aquisição do vírus. Os dados estão coerentes com os existentes em literatura (BASTIANEL et al., 2010).

Tabela 4 - Transmissão de CiLV-C por ácaros adultos de *B. phoenicis* que alimentaram-se sob lesões causadas pelo vírus em diferentes tecidos de uma planta de laranja doce, em condições de laboratório

Fonte de vírus	Número de indivíduos testados	Número de folhas com lesões
Folhas	150	30
Frutos	150	30
Ramos	50	10

\* Foram colocados 5 ácaros por tecido, teste permitindo-se um período de acesso a inoculação de 24h

Tabela 5- Transmissão por ácaros *B. phoenicis* que alimentaram-se sobre lesões causadas por CiLV-C em diferentes partes da planta de laranja doce coletadas em campo, ou por ácaros criados em condições de laboratório sobre frutos com lesões

Fonte dos ácaros	Nº de ácaros testados	Nº ácaros que transmitiram	% eficiência
Pomar da Fazenda Cambuí, Matão, SP	48*	12**	25
Pomar do Centro APTA Colina, SP	50*	30	60
Cria de ácaros em laboratório 1	100	20	20
Cria de ácaros em laboratório 2	100	30	30
Cria de ácaros em laboratório 3	50	13	26

\* Ácaros transferidos individualmente sobre uma folha de feijoeiro sadio

\*\* Ácaros que causaram lesões locais em folhas de feijoeiro

A partir dos dados das tabelas 3 e 5, pode-se inferir que nem todos adultos testados mostraram ser virulíferos, sua eficiência variando de 26 a 69%, embora estivessem sobre ou próximo de lesões de leprose. Tal fato poderia ser uma consequência de vários fatores como: (a) apesar de se alimentarem em folhas com lesões, alguns indivíduos da colônia, não acessam tecidos contendo vírus; (b) alguns indivíduos, ainda que adquiram o vírus, não o transmitem por algum fator individual, ainda não esclarecido; (c) estresse imposto pelo ácaro durante sua manipulação, que de alguma forma interfere com a transmissão de vírus. Esta informação tem

implicações sobre a epidemiologia da CiLV-C, o que indica que nem todos os ácaros provenientes de uma planta cítrica infectada por CiLV-C podem transmitir, assim, o potencial de inóculo pode ser menor do estimado, baseado na avaliação dos ácaros detectados nos levantamentos.

Tabela 6- Transmissão de CiLV-C por *B. phoenicis* por folha sadia de feijoeiro em períodos sucessivos após o término da exposição a plantas infectadas

Teste *	Tempo após aquisição (média de lesões por folha)					
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias	10 dias	12 dias**
1	27	33	25	13	14	8
2	32	23	21	15	5	0
3	28	27	17	13	7	1
4	30	27	23	19	14	9
5	35	29	22	10	8	5

\* cada teste composto por 4 folhas e grupos de 5 ácaros

\*\* Todos os ácaros morreram após este período ou não continuaram transmitindo o vírus

Para conhecer a persistência do CiLV-C no ácaro foram realizados testes sobre folhas de feijão sadio onde colocaram-se ácaros virulíferos e foram transferidos a cada 24 horas para uma folha nova de feijão, para observar a aparição de sintomas. Na tabela 6 fica evidente que após de 12 dias foi o máximo de tempo que foi possível observar a aparição dos sintomas uma vez que a mortalidade dos ácaros aumentava com a extensão do período do experimento, não tendo havido sobreviventes depois desse período. Provavelmente o estresse causado pelas frequentes manipulações tenha sido a causa desta mortalidade. Contudo, estes dados requerem revisões, talvez a nível individual, pois a retenção deve depender da quantidade de vírus adquirido, e no tipo de experimento conduzido, isto não foi possível de controlar. De qualquer maneira, os dados obtidos indicam que o ácaro, uma vez tendo se alimentado em fonte de inóculo, pode reter o vírus até por quase duas semanas, mesmo sem novo acesso, com óbvias implicações nas medidas de controle.

Todos os dados existentes indicam que a relação CiLV-C/*B. phoenicis* seria do tipo circulativo, não propagativo. Embora tenha se detectado vírions do CiLV-C nos tecidos do ácaro *B. phoenicis*, não se encontraram evidências de sua replicação, como p.ex., a presença do viroplasma (KITAJIMA; ALBERTI, 2010). Por outro lado, ensaios de qRT-PCR mostraram que após um aumento inicial de título do vírus no ácaro, seguida da alimentação, se o ácaro não tiver acesso a novas fontes, o título do vírus se mantém estável, sem indicações

de replicação (FREITAS-ASTUA et al., 2011). Também o fato de as larvas serem capazes de transmitir CiLV-C parece indicar a ausência de replicação, pois seria difícil que o vírus se replicasse e fosse transmitido em um ou dois dias que é a duração da fase larval.

O conhecimento do tempo de retenção do vírus no ácaro, além das informações adquiridas sobre a capacidade de transmissão dos diferentes estágios e adequação de diferentes órgãos da planta fontes de inóculo, são todas informações importantes do ponto de vista epidemiológico, pois mostram claramente que o CiLV-C pode ser retido por *B. phoenicis* depois de sua aquisição e transmiti-lo mesmo sem acesso a uma nova fonte de vírus. O fato de as larvas serem capazes de transmitir CiLV-C, indica que o vírus provavelmente não se multiplica no corpo do ácaro, já que o intervalo de tempo entre a aquisição e a inoculação é muito curto, não dando tempo para que a replicação do vírus acontecesse, isso com base em outros vetores do vírus e replicativo-circulativo onde precisa de um período de 10 a 14 dias.

#### 4.4 Conclusões

Foi possível determinar alguns parâmetros da relação ácaro vetor *B. phoenicis* e CiLV-C:

1. Os períodos mínimos de acesso a aquisição e inoculação para a transmissão do CiLV-C são de quatro horas em ambos casos.
2. O tempo máximo que o vírus foi retido no corpo do ácaro foi de 12 dias, enquanto houve sobrevivência dos ácaros.
3. Em populações de ácaros colonizando tecido infectado pelo CiLV-C, a taxa de transmissão individual variou de 25 a 60%, indicando que nem todos indivíduos seriam capazes de transmitir o vírus.
4. Todos os estágios de desenvolvimento do ácaro têm a capacidade de transmitir o vírus, mas não ocorre transmissão transovariana do CiLV-C.
5. Todos os tecidos infectados de laranja: fruto, folha e ramo podem ser fonte de inóculo para a transmissão.

## Referências

- BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.; KUBO, K.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p.284-292, 2010.
- CHIAVEGATTO, LG. Transmissão da leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. In: OLIVEIRA, C.A.L.; DONADIO, L.C. (Ed.). **Leprose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p. 49-56.
- 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**, Amsterdam, v. 30, p. 181-202, 2003.
- FAWCETT, H.S. Scaly bark or nail head rust of citrus. **Florida Agriculture Experiment Station Bulletin**, Gainesville, v. 106, p. 41, June 1911.
- FREITAS-ASTÚA, J.; LIBP, L.S.; KITAJIMA, E.W.; BASTIANEL, M.; COSTA, F.M.; NOVELLI, V.M.; MACHADO, M.A. The leprosis pathosystem: interactions between host, virus and vector. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 18., 2010, Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Agronômico Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2010. p. 9.
- GARITA, L.; TASSI, A.D.; CALEGARIO, R.F.; KITAJIMA, E.W. Amplia-se a lista de hospedeiras experimentais do vírus da leprose C (*Citrus leprosis virus*- CiLV-C). In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 38., 2012, Jaguariúna. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 38, 2012. Suplemento. 1 CD-ROM.
- GROOT, T.V.M.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus phoenicis* transmits Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) to common bean (*Phaseolus vulgaris*) under experimental conditions. **Virus Reviews & Research**, Campinas, v. 11, p. 67-68, 2006.
- KITAJIMA, E.W.; ALBERTI, G. Virus/vector relationship of *Brevipalpus*-transmitted viruses. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ACAROLOGY, 13., 2010, Recife. **Resumos...** Recife: [s.n.], 2010. p. 123.
- KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTUA, J. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus*-mite transmitted viruses. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, p. 348-371, 2010.
- KITAJIMA, E.W.; CALEGARIO, R.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; FRANCISCHINI, F.J.B. *In situ* detection of CiLV-C in the mite vector *Brevipalpus phoenicis*, evidence for a circulative type of virus/vector relationship and a model for the virus circulation in the mite. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 33, p. S289, 2008. Suplemento.
- LEON, M.G.; BECERRA, C.H.; FREITAS-ASTÚA, J.; SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W. Natural infection of *Swinglea glutinosa* by the Citrus leprosis virus Cytoplasmatic Type (CiLV-C) in Colombia. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 1364, 2008.

LOCALI-FABRIS, E.; STACH-MACHADO, D.R.; CASERTA, R.; FREITAS-ASTUA, J., CALEGARIO, RF., SALAROLI, RB.; KITAJIMA E.W.; MACHADO, MA. *In vitro* expression and production of antiserum to the capsid protein (p29) of Citrus Leprosis Virus-C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte.

**Resumos...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. 1 CD-ROM.

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

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

NUNES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.L.; OLIVEIRA, M.L.; KITAJIMA, E.W.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; FREITAS-ASTÚA, J. Transmission of Citrus leprosis virus C by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to Alternative Host Plants Found in Citrus Orchards. **Plant Disease**, Saint Paul, Saint Paul, v. 96, p. 968-972, 2012.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASUMPCÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.; RANÇO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO J.R.; H., OLIVEIRA; F., GIACHETTO, P.F.; FERRAZ, 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 virus, cytoplasmic type (CiLV). **Virus Genes**, Dordrecht, v. 32, p. 289-298, 2006.

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

TASSI, A.D.; FREITAS-ASTUA, J.; JADÃO, A.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosis virus (CiLV-C)/vector relationship assessed by bean as test plant. **Virus Review & Research**, Rio de Janeiro, v. 14, p. 90, 2009. Suplemento.

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

## 5 PLANTAS HOSPEDEIRAS EXPERIMENTAIS DO VÍRUS DA LEPROSE C (*Citrus leprosis virus C* CiLV-C)

### Resumo

A leprose dos citros é considerada uma das doenças mais destrutivas da indústria citrícola brasileira, especialmente da laranja doce. O patossistema dessa doença envolve o agente causal o vírus da leprose C (*Citrus leprosis virus C*- CiLV-C), o vetor *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) e as plantas hospedeiras. Durante muito tempo aceitou-se que apenas *Citrus* spp. eram suscetíveis ao vírus. Mas tem sido verificado que outras plantas são também suscetíveis, algumas naturalmente outras experimentalmente. A fim de verificar a extensão desta suscetibilidade ao CiLV-C, foram testadas uma ampla gama de hospedeiras, que foram inoculadas com *B. phoenicis* virulíferos em condições experimentais. Foram testadas 140 espécies, agrupada dentro de 45 famílias, dentro das quais 62 (de 23 famílias) mostraram lesões locais. Para confirmar que os sintomas fossem causados pela presença de CiLV-C foram realizados testes de ELISA, RT-PCR, microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência, com os quais se pode confirmar a presença de CiLV-C nos tecidos de 46 espécies. Presume-se que os casos negativos se devam a um conteúdo viral muito baixo devido à rápida necrose dos tecidos. Os resultados indicam que é possível que o número de plantas suscetíveis naturalmente ao CiLV-C seja também maior, com implicações sobre a epidemiologia, quarentena e na evolução do patossistema leprose dos citros.

Palavras-chave: *Brevipalpus phoenicis*; Leprose dos citros; Hospedeiras; Epidemiologia

## EXPERIMENTAL HOST PLANT OF THE CITRUS LEPROSIS VÍRUS C (*Citrus leprosis virus C* CiLV-C)

### Abstract

Citrus leprosis (CL) is considered one of the most serious threat to the citrus industry, especially of sweet oranges. The pathosystem of the CL involves the causal agent, *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), the main vector *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and the susceptible hosts. For long time, only *Citrus* spp. were considered as sole susceptible hosts. However other plant species were found susceptible to CiLV-C, either experimentally or naturally. To assess the experimental host range of CiLV-C, a large number of plant species were inoculated with *B. phoenicis*, viruliferous to CiLV-C, under experimental conditions. Of the tested 140 species, belonging to 45 families, 62 (23 families) produced localized lesions on inoculated leaves. These plants which reacted with local lesions to the inoculation were assayed for the presence of the CiLV-C by RT-PCR, ELISA, transmission electron microscopy and immunofluorescence, either alone or in combination. In 46 of the 62 local lesions hosts, at least one of these tests was positive. The negative cases probably were due to the extremely low concentration of the virula material due to the rapid necrosis of the tissues. Although only few non *Citrus* species were found naturally infected by CiLV-C, present results show that a larger number of plant species may be naturally susceptible to the virus, with implications on the epidemiology, quarantine and the evolution of the citrus leprosis pathosystem.

Keywords: *Brevipalpus phoenicis*; Citrus leprosis; Hosts; Epidemiology

## 5.1 Introdução

A leprose dos citros é considerada uma das doenças viróticas mais destrutivas, afetando especialmente a laranja doce [*Citrus sinensis*( L.) Osbeck] Esta doença é restrita ao continente Americano, tendo sido confirmada no México, em a América central e América do Sul (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2010).

Esta doença é transmitida pelo ácaro tenuipalpídeo *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (BASTIANEL et al., 2010). As evidências disponíveis indicam que a relação vírus-vetor é do tipo circulativa (KITAJIMA; ALBERTI, 2010). A leprose caracteriza-se pelos sintomas de lesões localizadas nas folhas, frutos e ramos. As perdas resultam da intensa queda das folhas e frutos lesionados, além da morte descendente e eventual morte prematura da planta pela coalescência das lesões nos ramos (RODRIGUES et al., 2003; BASTIANEL et al., 2010). A leprose é causada pelo vírus da leprose C (*Citrus leprosis virus C*, CiLV-C), que teve seu genoma completamente sequenciado pertence a um novo gênero o *Cilevirus* (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006).

Originalmente a leprose dos citros foi relatada no estado da Flórida, nos Estados Unidos, no início do século 20, embora fosse conhecido desde 1860 (FAWCETT, 1911). Contudo, a doença deixou de ser naquele país a partir dos anos 1960. Evidências baseadas em material herbarizado e registros fotográficos sugerem que a leprose na Florida tenha sido causada pelo vírus da leprose dos citrus N (*Citrus leprosis virus nuclear type*, CiLV-N), um possível rhabdovírus, considerado menos agressivo ( KITAJIMA et al., 2011).

Durante muito tempo aceitou-se que o CiLV-C afetasse apenas *Citrus* spp. Nestes, a laranja doce é altamente suscetível. Tangerina (*C. reticulata* Blanco) e o pomelo (*C. paradisi* Macfad.) são moderadamente suscetíveis, os limões (*C. limon* L.), praticamente imunes (BASTIANEL et al., 2010). Colariccio e colaboradores (1995) conseguiram transmissão mecânica do CiLV-C a *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* Coste & Reyn. e *Gomphrena globosa* L., que apresentaram lesões locais após a inoculação.

Posteriormente, houve o primeiro relato de infecção natural pelo CiLV-C, além de *Citrus* spp., em *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr., uma planta da família das rutáceas usada em pomares em Villavicenzo da Colômbia (LEON et al., 2008).

*Solanum violaefolium* Schott. foi experimentalmente infetada por CiLV-C (RODRIGUES al., 2005). No ano 2006 uma observação fortuita revelou que o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) mostrou não só ser suscetível à infecção de CiLV-C quando inoculado com ácaros virulíferos, mas também que as lesões eram produzidas em cerca de cinco dias, mostrando ser uma planta indicadora potencial para este vírus.

Trabalhos subsequentes demonstraram que algumas plantas utilizadas como quebra ventos se mostraram experimentalmente suscetíveis ao CiLV-C, tais como *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Malvaviscus arboreus* Cav., *Grevilea robusta*, *Bixa orellana* e *Commelina benghalensis* L. (NUNES et al., 2012).

Estas informações indicam que CiLV-C poderia ter uma gama de hospedeiras mais ampla, fato que teria importantes implicações na epidemiologia da doença, como a possibilidades de que CiLV-C possa ser introduzido em regiões livres através de hospedeiras alternativas doentes.

Desta maneira, foi feita uma avaliação sistemática de um grande número de plantas quanto à sua suscetibilidade ao CiLV-C quando inoculadas experimentalmente com ácaros virulíferos.

## **5.2 Material e métodos**

### **Transmissão experimental para plantas hospedeiras**

A lista de plantas hospedeiras avaliadas encontra-se na tabela 1. As sementes foram semeadas e mantidas em casa de vegetação até duas semanas após da germinação. A seleção destas espécies foi feita com base na disponibilidade de sementes e mudas em viveiros experimentais da ESALQ e comerciais, e as que foram possíveis de serem coletadas no campus da ESALQ e arredores, e estabelecidas em condições de casa-de-vegetação.

### **Criação de ácaros *Brevipalpus***

Os ácaros foram mantidos em condições de laboratório, em frutos de laranja. As populações de ácaros sem vírus foram mantidas em frutos sadios e populações virulíferas em laranjas com sintomas da leprose. Os frutos com lesões de leprose foram coletados em um pomar orgânico livre de pulverizações. Posteriormente dos tercos das frutas foram cobertas

com parafina e, na região que delimita a parafina, foi colocada a cola entomológica Tanglefoot® para confinar os ácaros na área. Sobre a superfície das frutas foi pincelada uma suspensão de mistura de areia, farinha e gesso, para criar irregularidades que oferecem um ambiente mais propício para o desenvolvimento da população.

### **Inoculação das hospedeiras**

Foram inoculadas três plantas de cada uma das espécies mencionadas na tabela 1. Em cada planta foram inoculadas ao menos três folhas com grupos de cinco ácaros por folha. Os ácaros virulíferos foram criados sobre frutos com lesões de CiLV-C. Foram colocados nas folhas de cada uma das hospedeiras e deixaram-se até o final do teste.

### **Confirmação da infecção pelo CiLV-C**

#### **Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

Para a detecção do CiLV-C dos efeitos citopatogênicos nos tecidos das plantas, fragmentos de folhas foram fixados imediatamente após a remoção em uma solução Karnovsky modificada (formaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2), pós-fixados em OsO<sub>4</sub>, desidratados em acetona e emblocados na resina epóxica Spurr e polimerizados a 60°C por 48 h.

No caso das mostras de ácaros foram fixadas em Karnovsky modificado, imediatamente foram desidratadas num gradiente de acetona e posteriormente emblocadas na resina epóxica Spurr e polimerizadas a 60°C por 48h (KITAJIMA; NOME, 1999). Os blocos foram seccionados em um ultramicrotomo Leica UCT equipado com navalha de diamante. As secções foram montadas em telinhas de cobre de 100 mesh coberta com película plástica Formvar, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 sendo. As imagens foram registradas digitalmente.

#### **ELISA**

O teste sorológico ELISA (“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), do tipo PTA (“Plate Trapped Antigen”), com algumas modificações da forma descrita por Mowat e Dawson (1987), é usado para confirmar a infecção pelo CiLV-C. Em todos os testes são

incluídos controles negativos (plantas saudas) e positivos (plantas infectadas anteriormente analisadas pelo ELISA e microscopia eletrônica), na diluição de 1:1000.

Para esta análise é utilizado antissoro específico contra a presumível proteína nucleocapsidial do CiLV-C (p29) (LOCALI-FABRIS et al., 2008). Foram colocados 100 µL das amostras, diluídas 1:50 (p/v) em placas de ELISA de 96 cavidades e posteriormente incubadas por 40 minutos, a 37°C. Foram utilizadas duas cavidades para cada amostra. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes consecutivas com PBS-Tween (0,0015 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,14 M NaCl, 0,004 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,003 M KCl, pH 7,4 + 0,5 mL Tween 20). Na etapa seguinte, foram colocados em cada cavidade 100 µL do antissoro diluído 1:1000 em tampão PBS TPB (PBS-Tween + 2% polyvinylpyrrolidone MW 44.000+ 0,2% Soro de albumina bovina). As placas foram incubadas por 2 horas, a 37°C, sendo posteriormente lavadas como descrito. Seguindo foram colocados 100 µL do conjugado enzimático (SIGMA Anti Rabbit IgG, A-8025) diluído 1:34.000 em tampão PBS-TPB e incubado novamente por duas horas a 37°C. As placas foram lavadas novamente e, a seguir, foram colocados em cada cavidade 100 µL do substrato p-fosfato de nitrofenil (SIGMA, S0942), diluído em tampão de dietanolamina pH 9,8 (0,6 mg/mL). As placas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro, onde ocorreu a reação enzimática. A absorbância de cada uma das cavidades foi medida em leitor de ELISA, utilizando-se um filtro de 405 nm. Extratos de plantas saudas e de plantas sabidamente infectadas com o CiLV-C são usados como controles. A reação foi considerada positiva quando o valor médio da absorbância for superior em três vezes o valor médio de absorbância do extrato da planta sadia.

### **Imunofluorescência (IF)**

Foi realizada a detecção *in situ* do CiLV-C por imunofluorescência usando anticorpos contra a p29. Os tecidos foram fixados imediatamente após a remoção da planta em uma solução Karnovsky modificada (formaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2), desidratados em etanol, emblocados na resina LR White (LR White Médium Grade Acrylic Resin) e polimerizados a 60°C por 48 h. Os blocos foram seccionados em cortes semi-finos (1,0µm) no ultramicrotomo Leica UCT equipado com navalha de vidro. Os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro e foram incubados em solução de bloqueio (PBS 0,01M, BSA 1%, Glicina 0,05M) por 30 minutos. Depois disso a solução de bloqueio foi retirada com o auxílio de papel filtro e as lâminas foram incubadas com AS-CP (1:1000) diluído (PBS 0,01M, BSA, 0,1%) por 5 horas. Após 3 lavagens em

solução de lavagem (PBS 0,01M, BSA 1%) por 5 minutos cada um, foram incubados em AS secundário conjugado com Fluorescein Isothiocyanante, Sigma: Antirabbit IgG FITC conjugate-F0382) diluição 1:80 em PBS 0,01M, BSA 0,1%, 1,5mL de PEG 2000 a 1% 0,5g de gelatina de peixe) por 1 hora no escuro. Os cortes foram lavados novamente 3 vezes com solução de lavagem e posteriormente foi montada a lâmina adicionando 1 gota de Antifade (Invitrogen: SlowFade Antifade Kit-S2828) sobre as secções. O material foi coberto com lamínula e selado com esmalte. As lâminas foram armazenadas na geladeira protegidas da luz. As análises foram realizados em um fotomicroscópio Axioskop da Zeiss equipado com iluminação UV e sistema de captura de imagem digital.

### **RT-PCR**

As plantas de feijão inoculadas por meio do ácaro com CiLV-C foram avaliadas pelo RT-PCR utilizando o métodos estabelecido por Locali et al. (2003). As folhas inoculadas que apresentaram lesões, foram avaliadas também as folhas sadias (controle negativo) e folhas de laranja com lesões de leprose (controle positivo)

Para extração do RNA total, foram utilizados aproximadamente 50mg de material fresco macerados na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Adicionou-se então, 500  $\mu$ L do tampão WB (10mM Tris-HCL pH8, 1mM EDTA pH8,0; 2M NaCl; 0,05% BSA). As amostras foram homogenizadas através do agitador e centrifugadas a 12000rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foi adicionado 600 $\mu$ L do tampão CTAB (2% de CTAB; 1,4 M NaCl; 0,01M Tris-HCl pH8; 0,5%  $\beta$ -mercaptoetanol) e o conteúdo foi homogeneizado no agitador. As amostras foram incubadas por 15-30 minutos a 55°C a 65°C, adicionou-se 400  $\mu$ L de clorofórmio:álcool isoamílico(24:1) e utilizou-se o agitador para homogeneizar a solução. Posteriormente as amostras foram submetidas à centrifugação a 12000rpm por 10 minutos e a fase aquosa foi transportada para um novo microtubo, ao qual se adicionou um décimo do volume de acetato de amônio 7,5M e um volume de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 20°C por 2 horas e centrifugadas a 12000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi desidratado no liofilizador. Para ressuspendê-lo, adicionou-se 20 $\mu$ L de água tratada como DEPC. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

Para a síntese do DNA, utilizou-se uma alíquota de 3 $\mu$ L do RNA extraído anteriormente, 1 $\mu$ L de DNTP 2,5mM, 0,8 $\mu$ L de primers randômicos 3 $\mu$ L/ $\mu$ L e 7,7 $\mu$ L de água DEPC, que foram submetidos a temperatura de 65°C por 5 minutos e colocados

imediatamente no gelo. A este conteúdo foi adicionado 0,5µL de RNase Out (Invitrogen), 2,0µL de DDT (0,1M), 1µL de M-MLRT (200U/µL) e 4,0µL de tampão 5x (Invitrogen). Esta reação foi submetida a temperatura de 37°C por 1 hora e a 70°C por 10 minutos. Para a PCR utilizou-se uma alíquota de 3µL de cDNA, 2,5µL de tampão 10X, 0,9µL de MgCL<sub>2</sub> 50mM, 0,5µL de dNTP 2,5mM, 0,5µL dos primers MR-F e -R (10µL), 0,2µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) (Invitrogen) e 16,9µL de água DEPC para atingir o volume final de 25,0µL. As aplicações foram realizadas em um termociclador programado: 1 ciclo de 94°C por 3min seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e 72°C por 5 minutos e no final 4°C.

Os resultados das amplificações foram avaliados junto com o marcador 1Kb (1Kb Plus Ladder, Invitrogen) em gel de agarose 1% (TAE 1X) com SYBR® Safe (1:10000, Invitrogen) e visualizados sob luz ultravioleta.

### 5.3 Resultados e Discussão

Foram avaliadas 140 espécies de plantas, pertencentes a 45 famílias botânicas, incluindo espécies ornamentais, de hortaliças, raízes e tubérculos, de cereais e grãos, fruteiras, arbóreas e vegetação espontânea (Tabela 1). Do total de plantas inoculadas com ácaros virulíferos, pouco menos da metade delas foram suscetíveis, uma vez que a infestação com ácaros *B. phoenicis* virulíferos, resultaram no aparecimento de lesões locais, necróticas ou cloróticas. As lesões locais foram observadas nas plantas infestadas a partir de uma semana após a infestação inicial e na maioria delas, as lesões demoraram entre duas a três semanas para aparecer (Figura 1 e 2).

Tabela 1 - Lista de espécies de plantas testadas para avaliar a suscetibilidade ao vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) em ensaios de transmissão com ácaros virulíferos *Brevipalpus phoenicis*

(continua)

Hospedeira	Síntomas	ELISA	RTPCR	MET	IF
<b>Acanthaceae (0/2)</b>					
<i>Ruellia angustifolia</i> (Nees) Lindau	-	nd	nd	nd	nd
<i>Thunbergia erecta</i> (Benth.) T. Anderson	-	nd	nd	nd	nd
<b>Aizoaceae (1/1)</b>					
<i>Tetragonia expansa</i> Murray	+	+	nd	+	+
<b>Amaranthaceae (2/5)</b>					
<i>Amaranthus viridis</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Chenopodium amaranticolor</i> (H.J. Coste & A. Reyn.)	-	nd	nd	nd	nd
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	+	nd	nd	nd	nd
<i>Gomphrena globosa</i> L.	+	+	nd	+	+
<i>Pfaffia glomerulata</i> (Spreng.) Pedersen	-	nd	nd	nd	nd
<b>Annonaceae (0/1)</b>					
<i>Annona muricata</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Apiaceae (1/2)</b>					
<i>Apium graveolens</i>	-	nd	nd	nd	nd
<i>Petroselinum sativum</i> Hoffm.	+	+	nd	nd	nd
<b>Apocynaceae (1/3)</b>					
<i>Catharantus roseus</i> (L.) G. Don	+	+	nd	+	nd
<i>Asclepias physiocarpa</i> (E. Mey.) Schltr.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Plumeria rubra</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Araceae (1/2)</b>					
<i>Anthurium</i> sp.	+	+	nd	-	nd
<i>Spathiphyllum wallisii</i> Regel	-	nd	nd	nd	nd
<b>Araliaceae (1/3)</b>					
<i>Hedera canariensis</i> Willd.	+	+	nd	+	nd
<i>Hydrocotyle centella</i> Cham. & Schltdl.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Schefflera actinophylla</i> (Endl.) Harms	-	nd	nd	nd	nd
<b>Asteraceae (5/10)</b>					
<i>Bidens pilosa</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Dahlia variabilis</i> (Willd.) Desf.	+	+	nd	nd	nd
<i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Leucanthemum maximum</i> (Ramond) DC.	-	nd	nd	nd	nd

Tabela 1 - Lista de espécies de plantas testadas para avaliar a suscetibilidade ao vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) em ensaios de transmissão com ácaros virulíferos *Brevipalpus phoenicis*

(continuação)

Hospedeira	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	RTPCR <sup>3</sup>	MET <sup>4</sup>	IF <sup>5</sup>
<b>Asteraceae (5/10)</b>					
<i>Galinsoga quadriradiata</i> Ruiz & Pav.	+	-	+	+	nd
<b>Asteraceae (5/9)</b>					
<i>Helianthus annuus</i> L.	+	+	nd	-	nd
<i>Lactuca sativa</i> L.	-				
<i>Synedrella nodiflora</i> (L.) Gaertn	+	+	nd	+	+
<i>Leucanthemum maximum</i> (Ramond) DC.	-				
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	+	+	nd	+	+
<b>Balsminaceae (0/1)</b>					
<i>Impatiens</i> sp.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Brassicaceae (5/6)</b>					
<i>Alyssum</i> sp.	+	-	nd	-	nd
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	+	nd	nd	+	nd
<i>Brassica olearacea</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Brassica rapa</i> L.	+	-	nd	-	nd
<i>Cardamine bonariensis</i> Pers.	+	+	nd	+	+
<i>Nasturtium officinale</i> W.T. Aiton	+	+	nd	+	nd
<b>Caricaceae (0/1)</b>					
<i>Carica papaya</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Cariophyllaceae (0/3)</b>					
<i>Barbatus dibrada</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Dianthus cariophyllus</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Dianthus barbatus</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Commelinaceae (2/4)</b>					
<i>Commelina benghalensis</i> L.	+	+	+	+	+
<i>Commelina</i> sp.	+	+	nd	+	nd
<i>Dichorisandra hexandra</i> (Aubl.)Kuntze ex Hand.-Mazz.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Tradescantia zebrina</i> Heynh. ex Bosse	-	nd	nd	nd	nd
<b>Convolvulaceae (1/1)</b>					
<i>Ipomoea</i> sp.	+	-	nd	-	nd

Tabela 1 - Lista de espécies de plantas testadas para avaliar a suscetibilidade ao vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) em ensaios de transmissão com ácaros virulíferos *Brevipalpus phoenicis*.

(continuação)

Hospedeira	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	RTPCR <sup>3</sup>	MET <sup>4</sup>	IF <sup>5</sup>
<b>Costaceae (1/1)</b>					
<i>Tapeinochilos ananassae</i> K. Schum.	+	-	nd	-	nd
<b>Cucurbitaceae (0/5)</b>					
<i>Cucúrbita máxima</i> Duchesne ex Lam.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Cucúrbita moschata</i> Duchesne	-	nd	nd	nd	nd
<i>Cucurbita pepo</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Cucumis anguria</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Luffa aegyptiaca</i> Mill.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Ericaceae (0/1)</b>					
<i>Rhododendron sp.</i>	-	nd	nd	nd	nd
<b>Dipsacaceae (1/1)</b>					
<i>Scabiosa sp.</i>	+	-	nd	-	nd
<b>Euphorbiaceae (2/5)</b>					
<i>Acalypha reptans</i> L.	+	-	nd	-	nd
<i>Chamaesyce hirta</i> (L.) Millsp.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Euphorbia prunifolia</i> Jacq.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Manihot esculenta</i> Crantz	-	nd	nd	nd	nd
<i>Ricinus communis</i> L.	+	-	nd	+	nd
<b>Fabaceae (8/14)</b>					
<i>Arachis repens</i> Handro	-	nd	nd	nd	nd
<i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Delonix regia</i> (Bojer ex Hook.) Raf.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	+	-	nd	-	nd
<i>Crotalaria juncea</i> L.	+	-	nd	-	nd
<i>Dolichos lablab</i> (L.) Sweet.	+	-	nd	-	nd
<i>Mucuna sp.</i>	+	-	nd	-	nd
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	+	+	nd	+	nd
<i>Pisum sativum</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Phaseolus lunatus</i> L.					
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	+	+	+	+	+
<i>Senna occidentalis</i> (L.) Link	-	nd	nd	nd	nd
<i>Vigna radiata</i> (L.) R. Wilczek	+	nd	nd	+	+
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	+	+	nd	-	+
<b>Geraniaceae (0/1)</b>					
<i>Pelargonium hortorum</i> L.H.Bailey	-	nd	nd	nd	nd

Tabela 1 - Lista de espécies de plantas testadas para avaliar a suscetibilidade ao vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) em ensaios de transmissão com ácaros virulíferos *Brevipalpus phoenicis*

(continuação)

Hospedeira	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	RTPCR <sup>3</sup>	MET <sup>4</sup>	IF <sup>5</sup>
<b>Lamiaceae (0/3)</b>					
<i>Clerodendrum speciosum</i> Drapiez	-	nd	nd	nd	nd
<i>Clerodendrum thomsoniae</i> Balf.f.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Salvia</i> sp.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Liliaceae (1/1)</b>					
<i>Pleomele reflexa</i> (Lam.) N.E. Br.	+	-	nd	-	nd
<b>Malvaceae (2/8)</b>					
<i>Abelmoschus esculentum</i> (L.) Moench	+	nd	nd	+	nd
<i>Ceiba speciosa</i> (A. St.-Hil.) Ravenna	-	nd	nd	nd	nd
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Hibiscus cannabinus</i> L.	+	+	nd	+	nd
<i>Hibiscus elatus</i> Sw.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Malvaviscus arboreus</i> Cav.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Theobroma cacao</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Molluginaceae (1/1)</b>					
<i>Mollugo verticillata</i> L.	+	+	nd	+	+
<b>Musaceae (0/1)</b>					
<i>Musa</i> sp.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Nyctaginaceae (0/1)</b>					
<i>Mirabilis jalapa</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Oleaceae (0/2)</b>					
<i>Ligustrum lucidum</i> W.T. Aiton	-	nd	nd	nd	nd
<i>Ligustrum sinensis</i> Lour.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Onagraceae (1/1)</b>					
<i>Godetia amoena</i> (Lehm.) G. Don	+	+	nd	+	nd
<b>Orchidaceae (3/3)</b>					
<i>Epidendrum</i> sp.	+	-	nd	-	nd
<i>Phalaenopsis</i> sp.	+	-	nd	nd	nd
<i>Cymbidium</i> sp.	+	-	nd	-	-
<b>Passifloraceae (2/6)</b>					
<i>Passiflora edulis</i> Sims var. <i>edulis</i>	-	nd	nd	nd	nd
<i>Passiflora edulis</i> Sims var. <i>flavicarpa</i> O. Deg.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Passiflora foetida</i> L.	-	nd	nd	nd	nd

Tabela 1 - Lista de espécies de plantas testadas para avaliar a suscetibilidade ao vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) em ensaios de transmissão com ácaros virulíferos *Brevipalpus phoenicis*

(continuação)

Hospedeira	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	RTPCR <sup>3</sup>	MET <sup>4</sup>	IF <sup>5</sup>
<b>Passifloraceae (2/6)</b>					
<i>Passiflora gibertii</i> N.E.Br.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Passiflora morifolia</i> Mast.	+	+	-	nd	nd
<i>Passiflora suberosa</i> L.	+	+	nd	-	+
<b>Pedaliaceae (1/1)</b>					
<i>Sesamun indicum</i> L.	+	+	nd	-	nd
<b>Phyllanthaceae (0/1)</b>					
<i>Phyllanthus tenellus</i> Roxb.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Piperaceae (0/1)</b>					
<i>Peperomia pellucida</i> (L.) Kunth	-	nd	nd	nd	nd
<b>Plantaginaceae (0/1)</b>					
<i>Antirrhinum majus</i>	-	nd	nd	nd	nd
<b>Poaceae (0/4)</b>					
<i>Megathyrsus maximus</i> (Jacq.) B.K.Simon & S.W.L.Jacobs	-	-	nd	-	-
<i>Pennisetum purpureum</i> Schumach.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	-	nd	nd	nd	nd
<i>Zea mays</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Polemoniaceae (0/1)</b>					
<i>Phlox</i> sp.	-	nd	nd	nd	nd
<b>Portulaccaceae (1/2)</b>					
<i>Portulacca oleraceae</i> L.	+	+	nd	+	+
<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.	-	-	nd	-	nd
<b>Rubiaceae (0/1)</b>					
<i>Coffea arábica</i> L.	-	nd	nd	-	nd
<b>Rutaceae (1/2)</b>					
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	+	+	+	+	+
<i>Murraya paniculata</i> (L.) Jack	-	nd	nd	nd	nd
<b>Sapindaceae (0/1)</b>					
<i>Paullinia cupana</i> Kunth	-	nd	nd	nd	nd
<b>Solanaceae (14/22)</b>					
<i>Brugmansia suaveolens</i> (Willd.) Bercht. & J.Presl	-	nd	nd	nd	nd
<i>Brunfelsia uniflora</i> (Pohl) D. Don	+	-			
<i>Capsicum annuum</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Capsicum chinensis</i> Jacq.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Datura mentel</i> L.	+	+	nd	-	nd

Tabela 1 - Lista de espécies de plantas testadas para avaliar a suscetibilidade ao vírus da leprose dos citros C (CiLV-C) em ensaios de transmissão com ácaros virulíferos *Brevipalpus phoenicis*

(conclusão)

Hospedeira	Síntomas <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	RT-PCR <sup>3</sup>	MET <sup>4</sup>	IF <sup>5</sup>
<b>Solanaceae (14/22)</b>					
<i>Datura stramonium</i> L.	+	+	nd	+	+
<i>Nicandra physalodes</i> (L.) Gaertn.	+	+	nd	-	-
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	+	+	nd	+	nd
<i>Nicotiana clevelandii</i> A. Gray	+	+	nd	nd	nd
<i>Nicotiana edwardsonii</i> Christie & D.W. Hall	+	+	nd	nd	+
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	-	nd	nd	nd	nd
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	+	+	nd	+	nd
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	-	nd	nd	nd	nd
<i>Nicotiana tabacum</i> cv.Samson	+	+	nd	-	nd
<i>Petunia hybrida</i> E. Vilm.	+	+	nd	+	nd
<i>Physalis floridana</i> Rydb.	-	-			
<i>Solanum aethiopicum</i> L.	-	-	nd	-	-
<i>Solanum lycopersicon</i> L.	+	-	-	-	nd
<i>Solanum melongena</i> L.	+	+	nd	+	+
<i>Solanum nigrum</i>	+	+	nd	+	nd
<i>Solanum tuberosum</i>	-	-			
<i>Solanum violaefolium</i> Schott	+	+	nd	-	nd
<b>Verbenaceae (1/1)</b>					
<i>Verbena</i> sp.	+	+	+	+	+
<b>Violaceae (2/2)</b>					
<i>Viola tricolor</i>	+	+	nd	+	nd
<i>Viola x wittrockiana</i> Gams	+	+	nd	+	nd

1 Sintomas: (-) sem lesões; (+) lesões localizadas. (45 famílias /140 espécies)

2 RT-PCR: (nd) não determinado; (+) reação positiva; (-) não detectado.

3 ELISA: (nd) não determinado; (+) reação positiva- densidade ótica três vezes maior da leitura do controle negativo; (-) não detectado.

4 MET: (nd) não examinado; (+) detecção de viriones e/ou viroplasma; (-) não detectado.

5 IF: (nd) não examinado; (+) detecção de corpos fluorescentes no tecido; (-) não detectado

A confirmação da presença do CiLV-C nestas lesões foram feitas morfológicamente (análise de secções ao microscópio eletrônico de transmissão e por imunofluorescência), sorologicamente (ELISA) e molecularmente (RT-PCR). Os ensaios foram feitos quando

viável, dependendo da quantidade de lesões e sua preservação. A tabela 1 resume os resultados obtidos nestes ensaios.

Todas as plantas que foram inoculadas com ácaros virulíferos foram mantidas no laboratório por um máximo de oito semanas até o aparecimento dos sintomas. Foi possível observar sintomas com lesões circulares cloróticas e, na maioria das vezes, necróticas. Em plantas como kenaf (*Hibiscus cannabinus*), maria preta (*Solanum nigrum*), capitão (*Zinnia elegans*) e petúnia (*Petunia hybrida*) foi possível observar lesões cloróticas que não se necrosavam imediatamente (Figura 1). Em outras plantas, como berinjela (*Solanum melongena*), vinca (*Catharanthus roseus*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) e *Nicotiana glauca* as lesões apresentaram desde o início região necrosada central acompanhada de halo clorótico (Figura 1). Também observaram-se folhas com lesões necróticas com halo verde ao redor em folhas de verbena (*Verbena sp.*) e godetia (*Godetia amoena*) (Figura 2).

O tamanho das lesões foi muito variável dependendo da planta como pode ser observado nas figuras 1 e 2. Plantas como espinafre-da-Nova Zelândia (*Tetragonia expansa*), perpétua (*Gomphrena globosa*) e trombeteira (*Datura stramonium*) responderam à infecção com lesões pequenas e de coloração branca. Por outro lado, em hospedeiras como tomateiro (*Solanum lycopersicon*), solano-violeta (*S. violaeifolium*) e petúnia, as lesões alcançavam diâmetros maiores, de vários milímetros.

Pelo menos um dos ensaios para detecção do CiLV-C foi feito em todos os casos que houve resposta em forma de lesões locais à infestação com ácaros virulíferos. Nem todos os testes puderam ser feitos pela escassez de lesões obtidas e pelo seu estado de avançada necrose. Considerou-se, contudo, que se confirmou a presença do CiLV-C, quando pelo menos um destes testes se mostrou positivo: reação positiva em ELISA em que a densidade óptica do produto da reação era pelo menos três vezes maior que a do controle com tecido sadio; observaram-se as bandas de tamanho esperado usando primers específicos nos ensaios de RT-PCR (Figuras 13 e 14); detecção de vírions e/ou viroplasma citoplasmático no análise de células das lesões ao microscópio eletrônico de transmissão (Figuras 3 a 6); detecção de viroplasmas fluorescentes nas lesões, ausentes nos tecidos sadios, nas análises por imunofluorescência (Figuras 7 a 12). Conforme se observa na tabela 1, das 140 espécies de plantas pertencentes a 45 famílias botânicas, houve produção de lesões locais em 62 delas, de 26 famílias. Destas, em 46 plantas que responderam com lesões localizadas à inoculação, detectaram-se CiLV-C em pelo menos um dos ensaios. Nos 16 casos em que isto não ocorreu, os resultados negativos se deveram à rápida necrose dos tecidos que provavelmente degradaram o RNA ou as proteínas virais, impossibilitando sua detecção. Pode-se notar que

em muitas das amostras houve detecção por ensaios morfológicos, mas não por testes sorológicos ou moleculares e vice-versa.

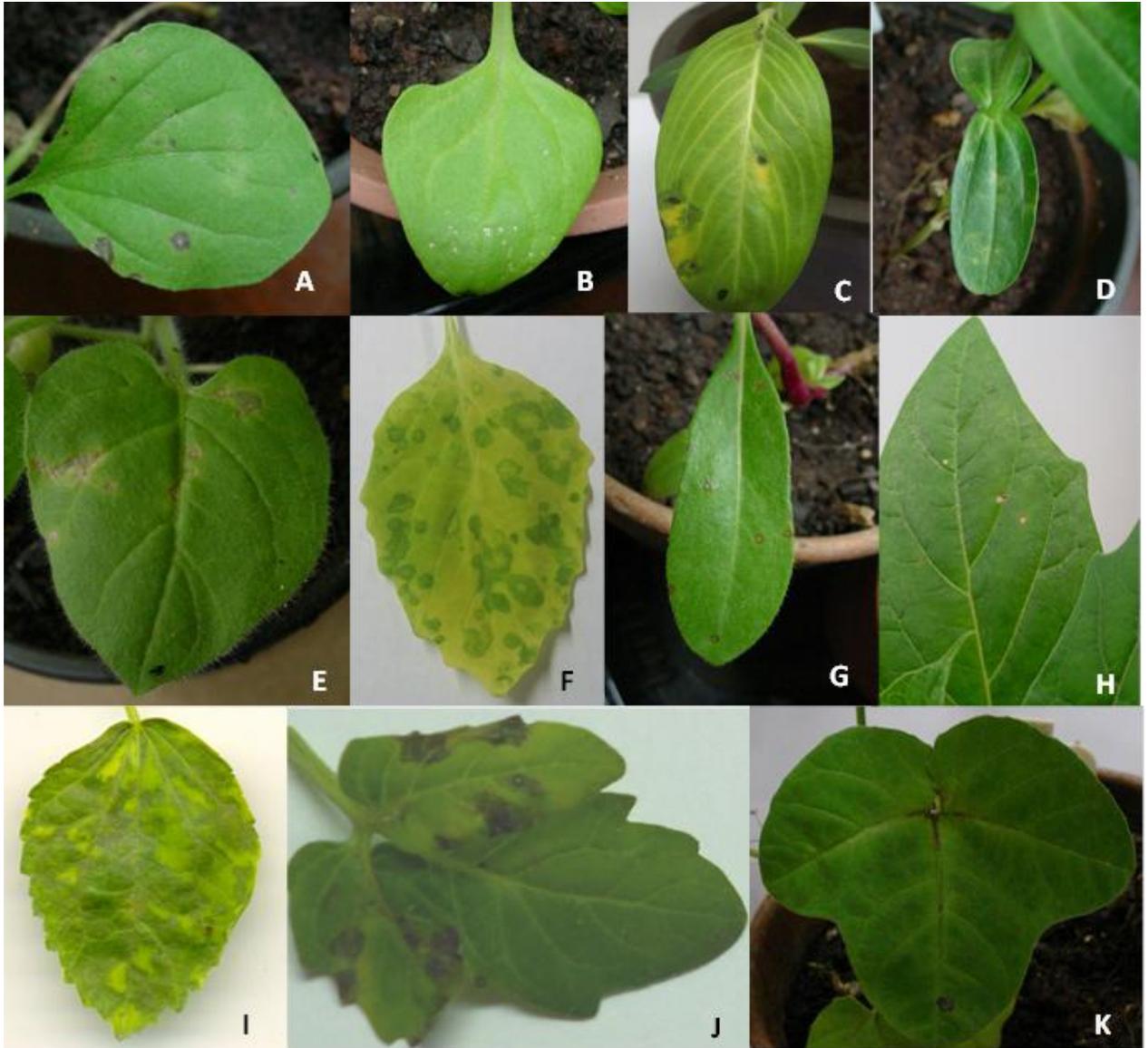


Figura 1 - Sintomas apresentados em diferentes plantas após de transmissão de CiLV-C por ácaros virulíferos: **A)** *Solanum melongena*, **B)** *Spinacia oleracea*, **C)** *Catharanthus roseus*, **D)** *Zinnia elegans*, **E)** *Nicotiana benthamiana*, **F)** *Solanum nigrum*, **G)** *Gomphrena globosa*, **H)** *Datura stramonium*, **I)** *Hibiscus cannabinus*, **J)** *Lycopersicon solanum*, **K)** *Passiflora morifolia* var. *muricata*

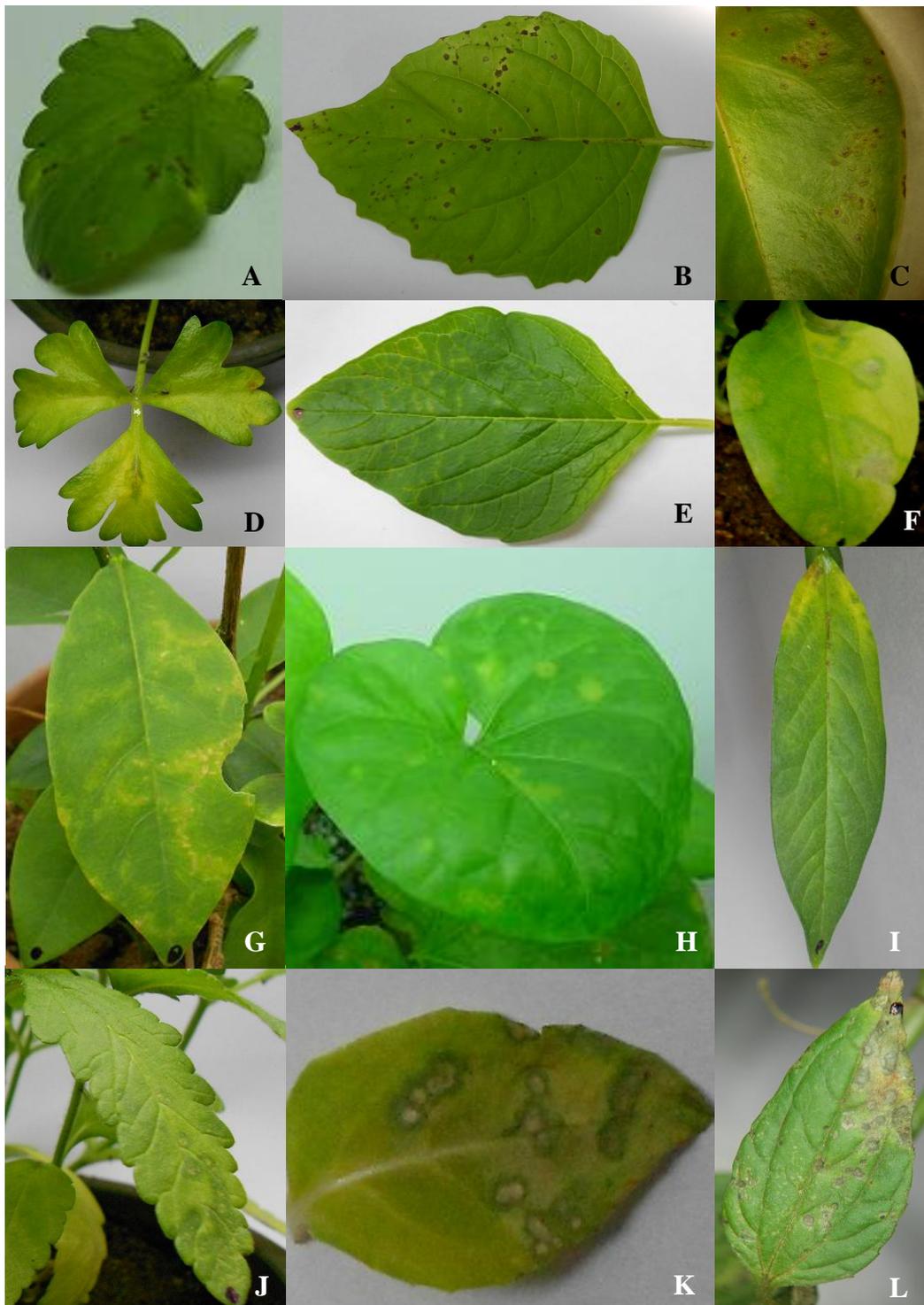


Figura 2 - Sintomas apresentados em diferentes plantas após de transmissão de CiLV-C por ácaros virulíferos: A) *Viola x wittrockiana* B) *Nicandra physaloides*, C) *Anturio* sp., D) *Apium graveolens*, E) *Sesamum indicum*, F) *Petunia hybrida*, G) *Brunfelsia uniflora*, H) *Solanum violaefolium*, I) *Cajanus cajan*, J) *Verbena* sp. L) *Godetia amoena*, M) *Galinsoga quadriradiata*

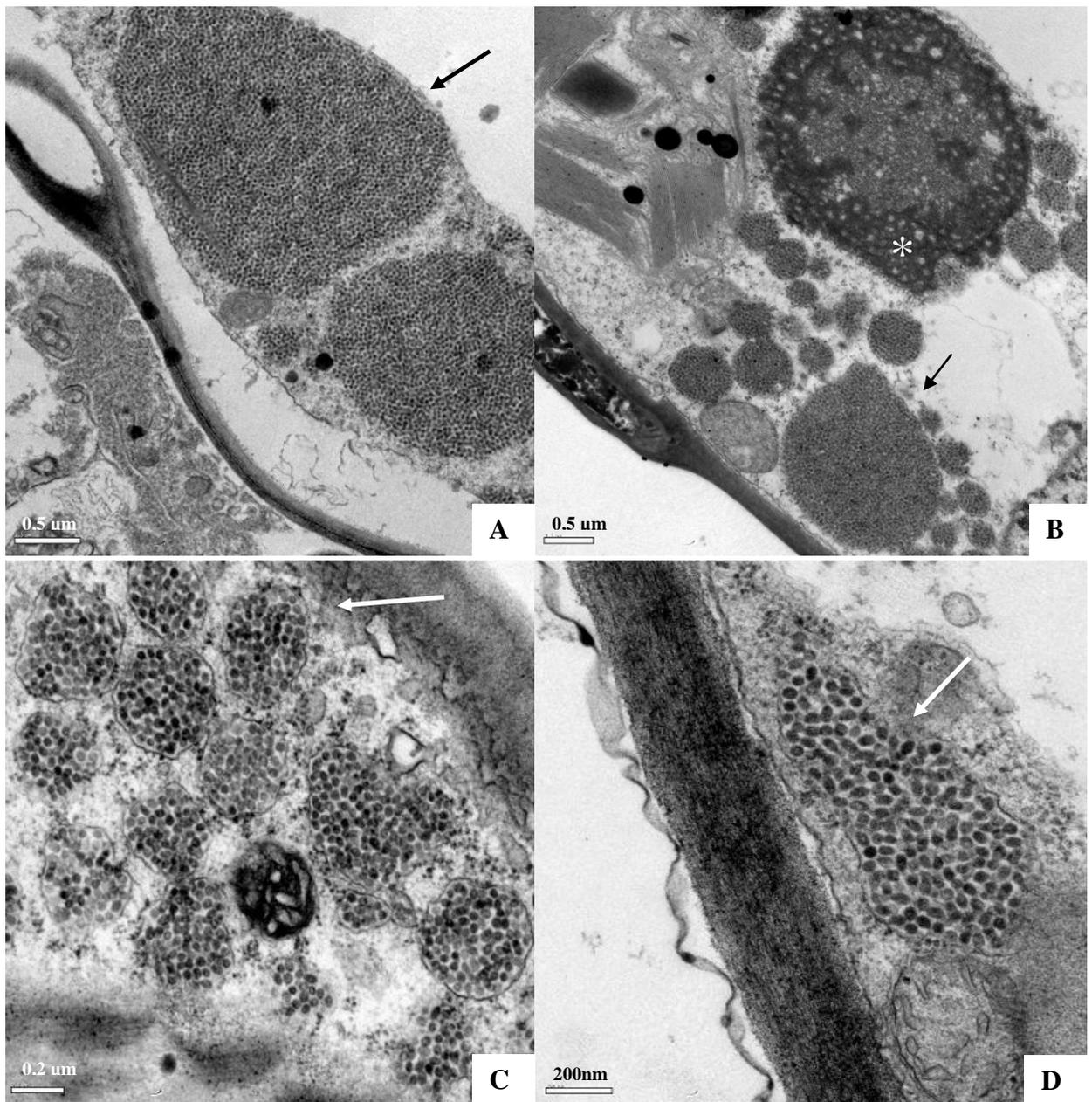


Figura 3 - Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão (MET) de lesões em tecidos foliares em diversas culturas infetadas experimentalmente pelo vírus da leprose dos citros C: **A)** *Zinnia elegans*; **B)** *Glycine max*; **C)** *Nicotiana occidentalis*; **D)** *Synedrella nodiflora*. Massas de vírions no lúmen do retículo endoplasmático estão indicadas pelas setas. (\*) viroplasma

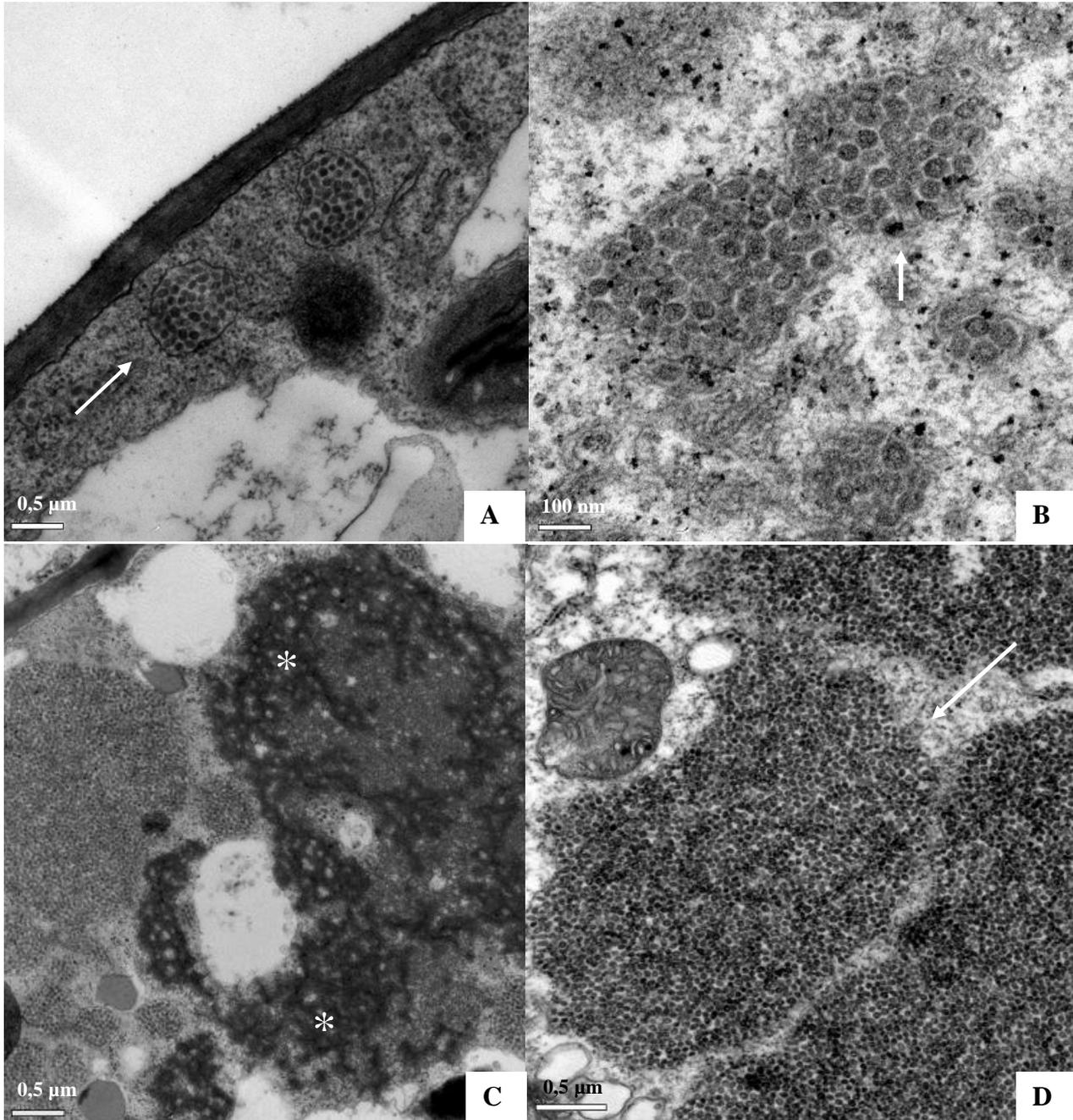


Figura 4 – MET de secções de tecidos de lesões foliares em diversas plantas infetadas experimentalmente pelo CiLV-C: **A)** *Catharantus roseus*; **B)** *Ricinus communis*; **C)** *Portulaca oleracea*; **D)** *Viola x wittrockiana*. Massas de vírions no lúmen do retículo endoplasmático estão indicadas pelas setas. (\*) viroplasma

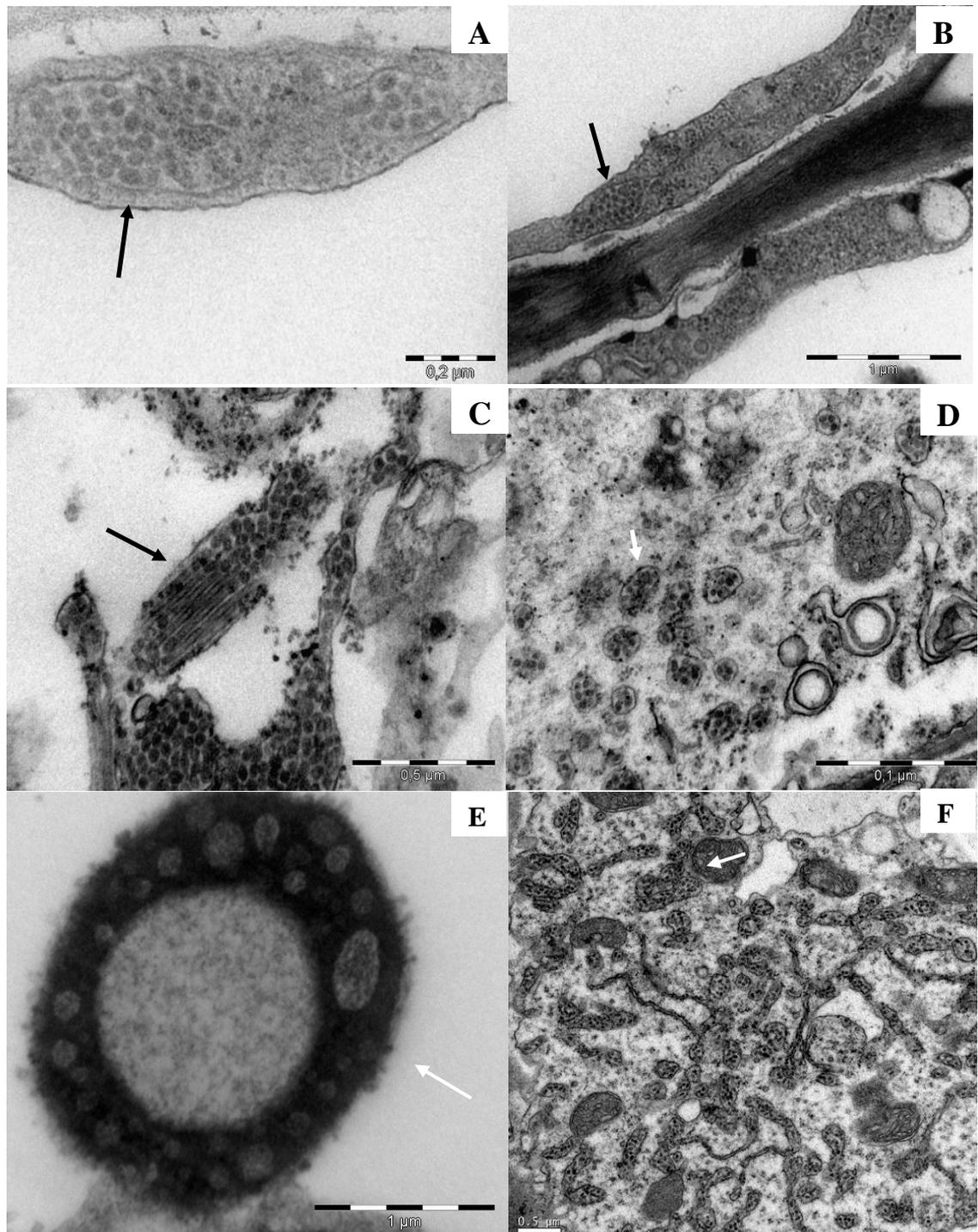


Figura 5 - MET de secções de tecidos de lesões foliares em diversas plantas infetadas experimentalmente pelo CiLV-C: **A e B)** *Hibiscus cannabinus*; **C e D)** *Commelina* sp.; **E)** *Solanum nigrum*; **F)** *Hibiscus esculentus*. Massas de víriões no lúmen do retículo endoplasmático, (\*) viroplasma

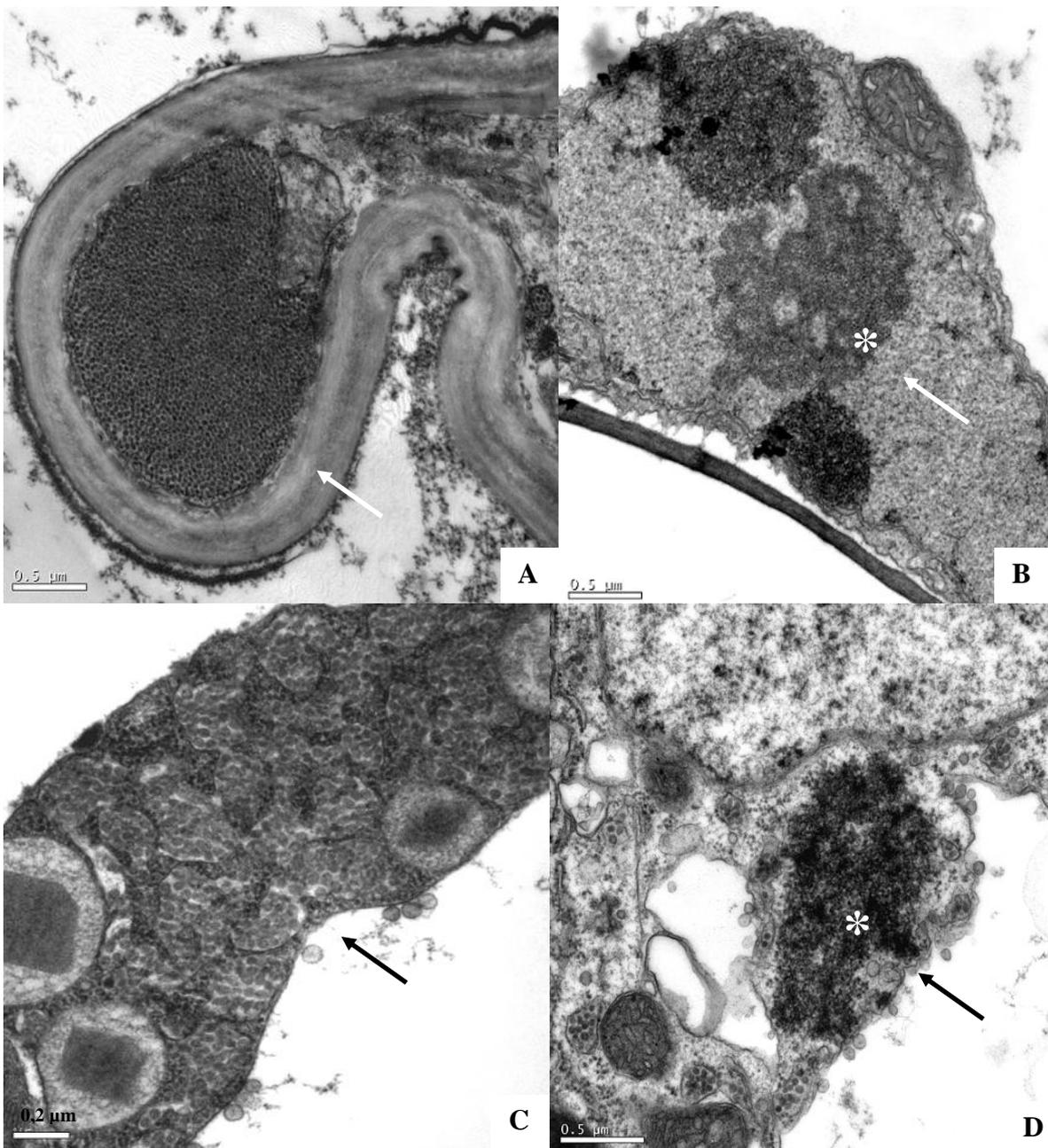


Figura 6 - MET de tecidos de lesões foliares de plantas infectadas experimentalmente com CiLV-C: A) *Hedera canariensis*; B) *Brassica rapa*; C) *Godetia amoena*. Massas de vírions no lúmen do retículo endoplasmático estão indicadas pelas setas (\*) viroplasma.

A análise em conjunto dos resultados sobre detecção do CiLV-C nos diferentes ensaios mostra que ELISA detectou o vírus em 38 das espécies que produziram lesões locais. Seguiu-se a MET com 32 casos de detecção, IF em 17 e RT-PCR em cinco. A aparente dificuldade do ensaio molecular, apesar de sua grande sensibilidade, provavelmente pelo fato de que o processo de necrose degrada rapidamente o RNA viral, indisponibilizando-o para sua detecção quando de sua coleta. Nos futuros ensaios, as amostragens provavelmente deverão

ser feitas assim que os primeiros sinais do aparecimento das lesões forem observadas, e inocular maior número de plantas para se gerar mais lesões. Nos casos em que os ensaios de RT-PCR foram positivos (Figuras 13 e 14), houve o aparecimento de bandas de tamanho esperado (344 pb) (LOCALI et al., 2003) após a amplificação usando primers específicos, ausentes em tecidos não inoculados, indicando claramente a presença do CiLV-C nos tecidos analisados. Dada limitação do tempo não foi feito o sequenciamento do material amplificado. Têm dados que em algumas destas plantas, como feijoeiro, trapoeraba e *Arabidopsis thaliana* estas sequências foram essencialmente similares às do CiLV-C tipo (J. FREITAS-ASTUA<sup>5</sup>, comunicação pessoal).

Nos casos positivos de detecção do CiLV-C nas análises de secções ultrafinas dos tecidos das lesões ao MET, vírions e/ou viroplasmas citoplasmáticos foram consistentemente observadas nas células da epiderme ou parênquima adjacentes à massa de tecido necrosado, essencialmente idênticos àqueles observados em tecidos de lesões em folhas de laranjeira (Figuras 3 a 6). Na maioria dos casos em que as análises não permitiram observar tais efeitos citológicos nas células vizinhas ainda intactas, possivelmente a necrose foi muito rápida, não tendo havido possibilidade de a infecção se estender às células ao redor. A MET permitiu a detecção do CiLV-C em 32 dos 62 casos em que houve aparecimento de lesões locais. Os casos negativos poderiam ser consequência da limitada área que se explora neste tipo de avaliação e, também, da rápida necrose das células, destruindo as evidências citopáticas da presença do CiLV-C.

A IF quando feita, detectou viroplasmas induzidos pelo CiLV-C nos tecidos das lesões em 17 espécies de plantas que reagiram com lesões locais à infecção. Os viroplasmas eram claramente visíveis, como estruturas de perfil circular ou elíptico nas células ainda íntegras vizinhas ao tecido necrosado, e em alguns casos, em meio à massa necrosada (Figuras 7 a 12). Os casos em que os análises por IF não permitiram detectar CiLV-C, embora explore volume de tecido significativamente maior que por MET, certamente teria ocorrido a destruição dos antígenos.

---

<sup>5</sup> FREITAS-ASTÚA, J. Comunicação pessoal, em 10 de agosto de 2012.

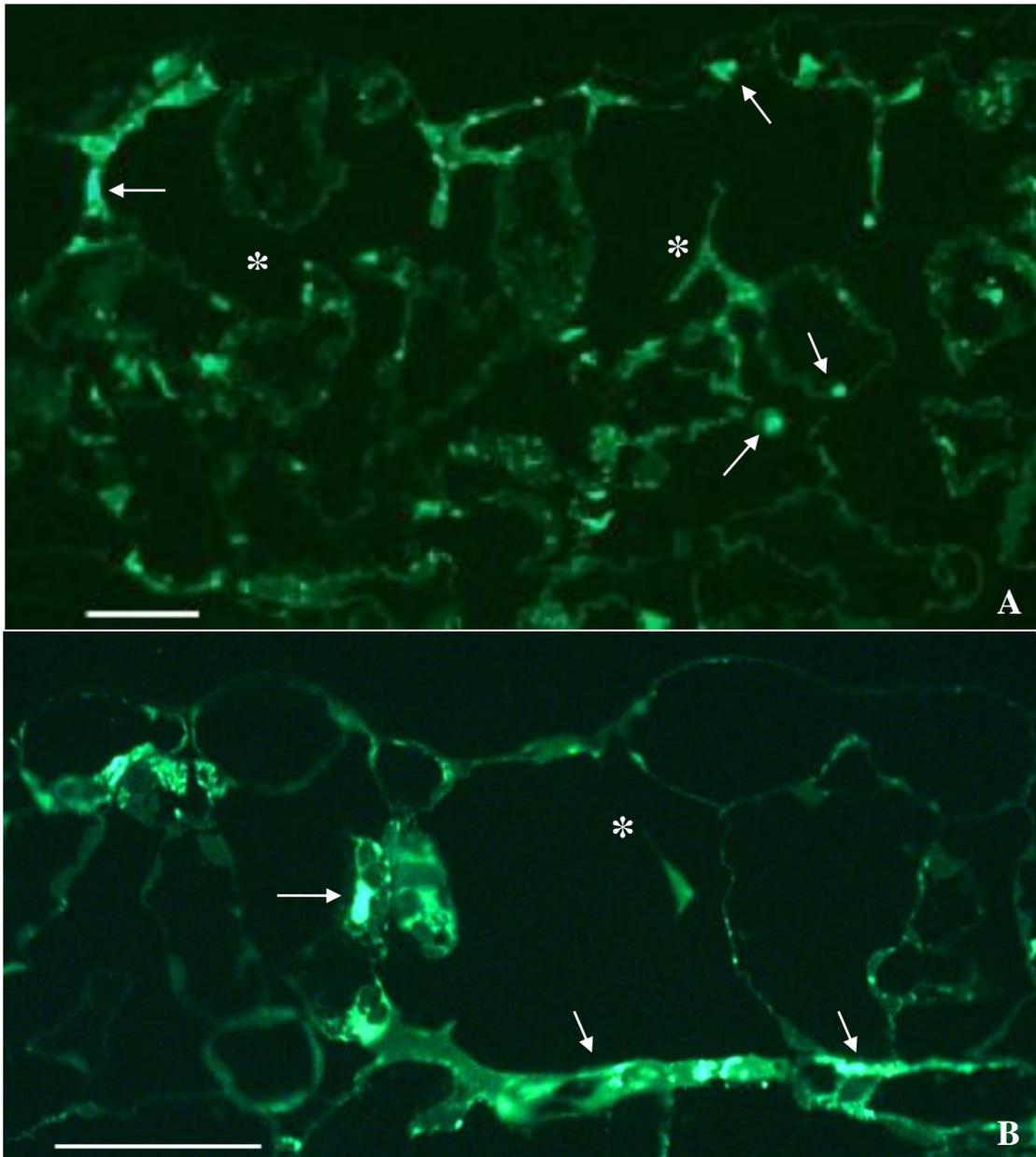


Figura 7 – Micrografia de luz de ensaio de imunofluorescência de tecidos de lesões foliares em plantas infetadas experimentalmente com CiLV-C pelo ácaro *B. phoenicis*. Utilizou-se anticorpo contra proteína p29, presumível proteína nucleocapsidal do vírus: **A)** *N. occidentalis* As estruturas de perfil circular, marcadas com fluorescência (setas) correspondem a viroplasmas formados no citoplasma após a infecção com CiLV-C. Notar células do parênquima paliçádico necrosadas (\*); **B)** *Solanum melongena*: notar a zona de transição desde o tecido infetado e o ainda íntegro nas adjacências. Os viroplasmas são discerníveis mesmo na área necrosada e colapsada. Barra 50μm

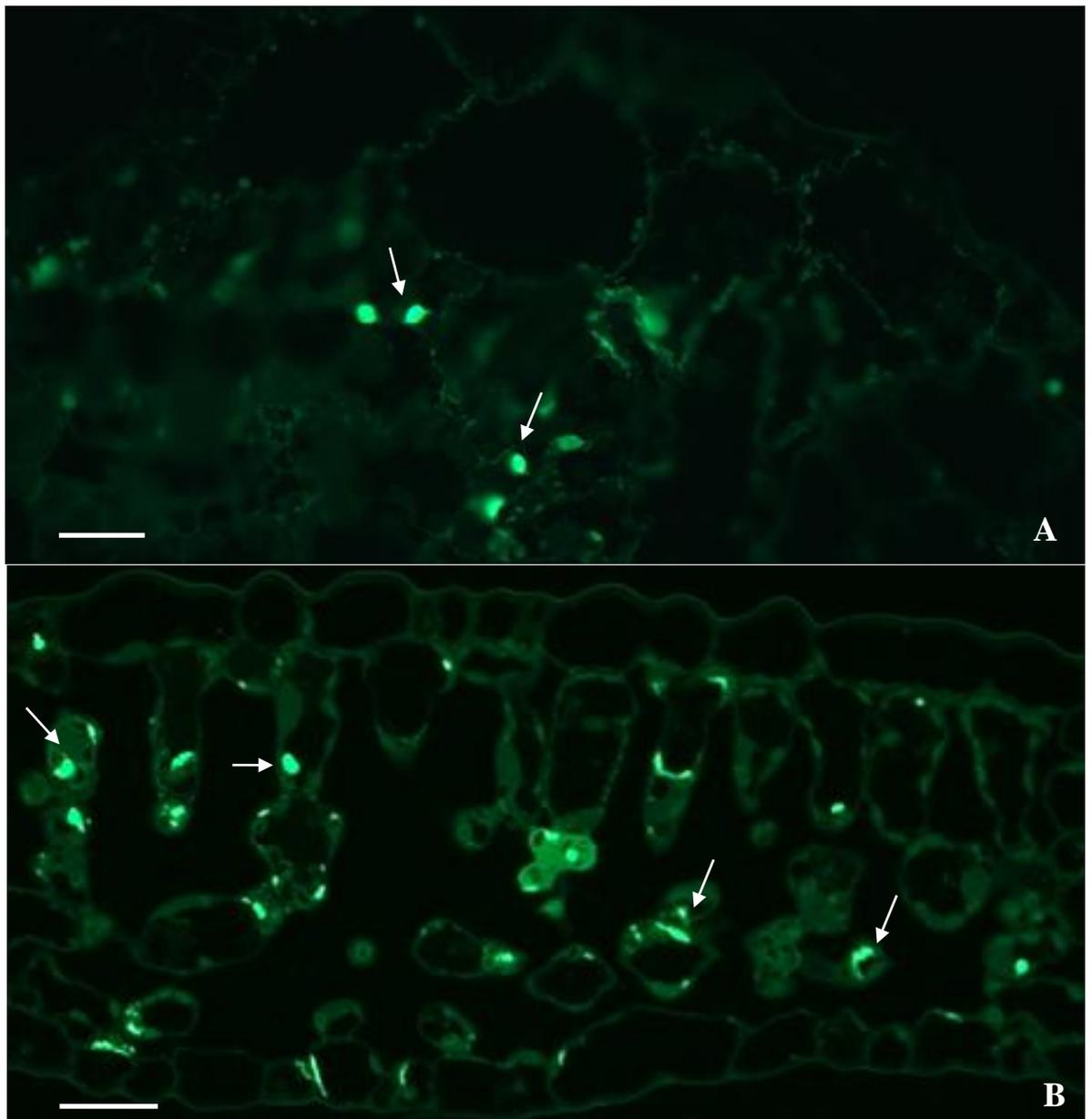


Figura 8 - Imunofluorescência de lesões foliares em plantas infetadas pelo CiLV-C: **A)** *Portulaca oleracea*; **B)** *Synedrella nodiflora*. As setas assinalaram os viroplasmas no citoplasma, Barra 50 $\mu$ m

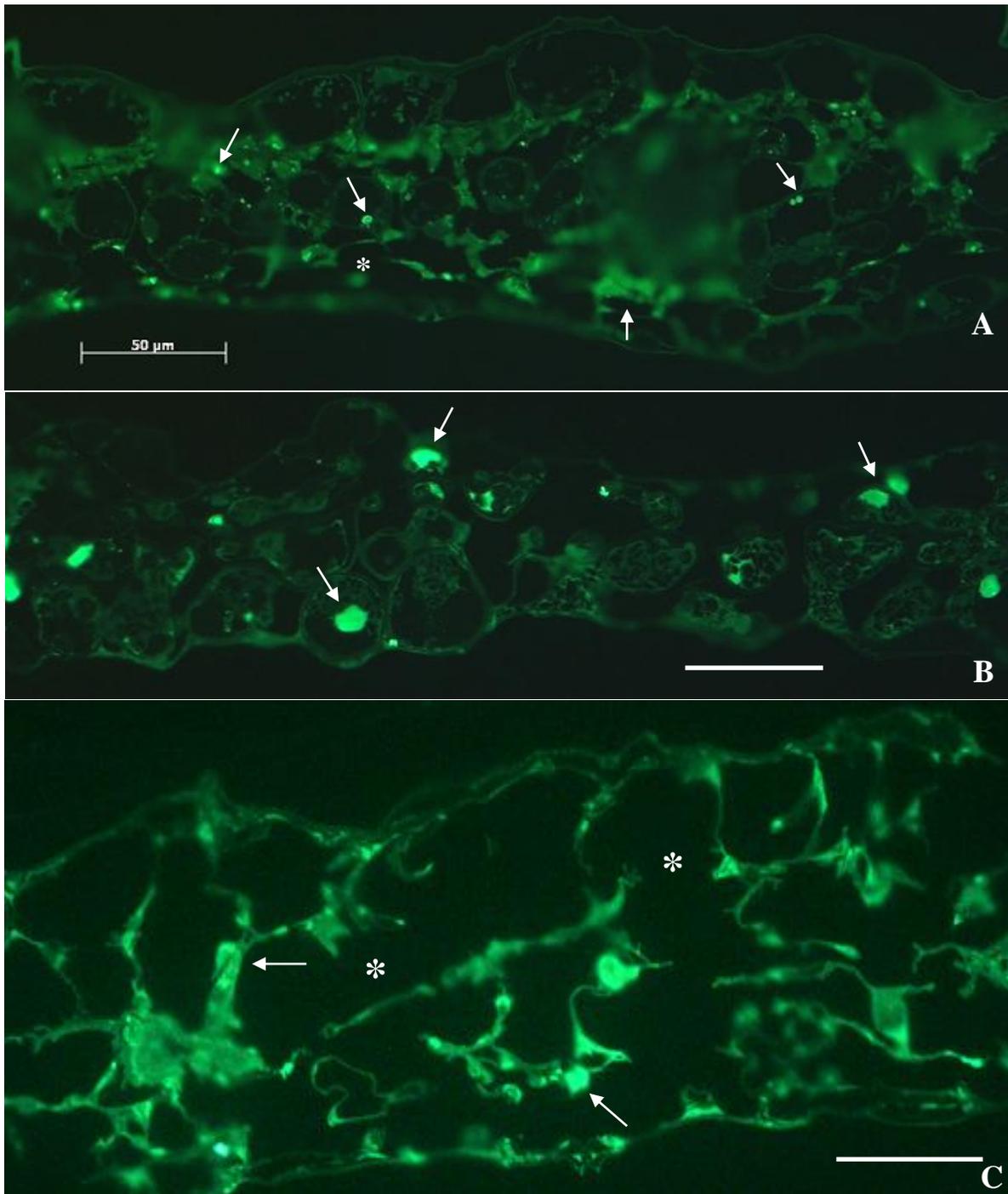


Figura 9 – Imunofluorescência de lesões foliares em plantas infetadas pelo CiLV-C: A) *Passiflora suberosa*; B) *Cardamine bonariensis*; C) *Zinnia elegans*. Os viroplasmas estão indicadas pelas setas. (\*) área necrosada da lesão. Barra 50μm

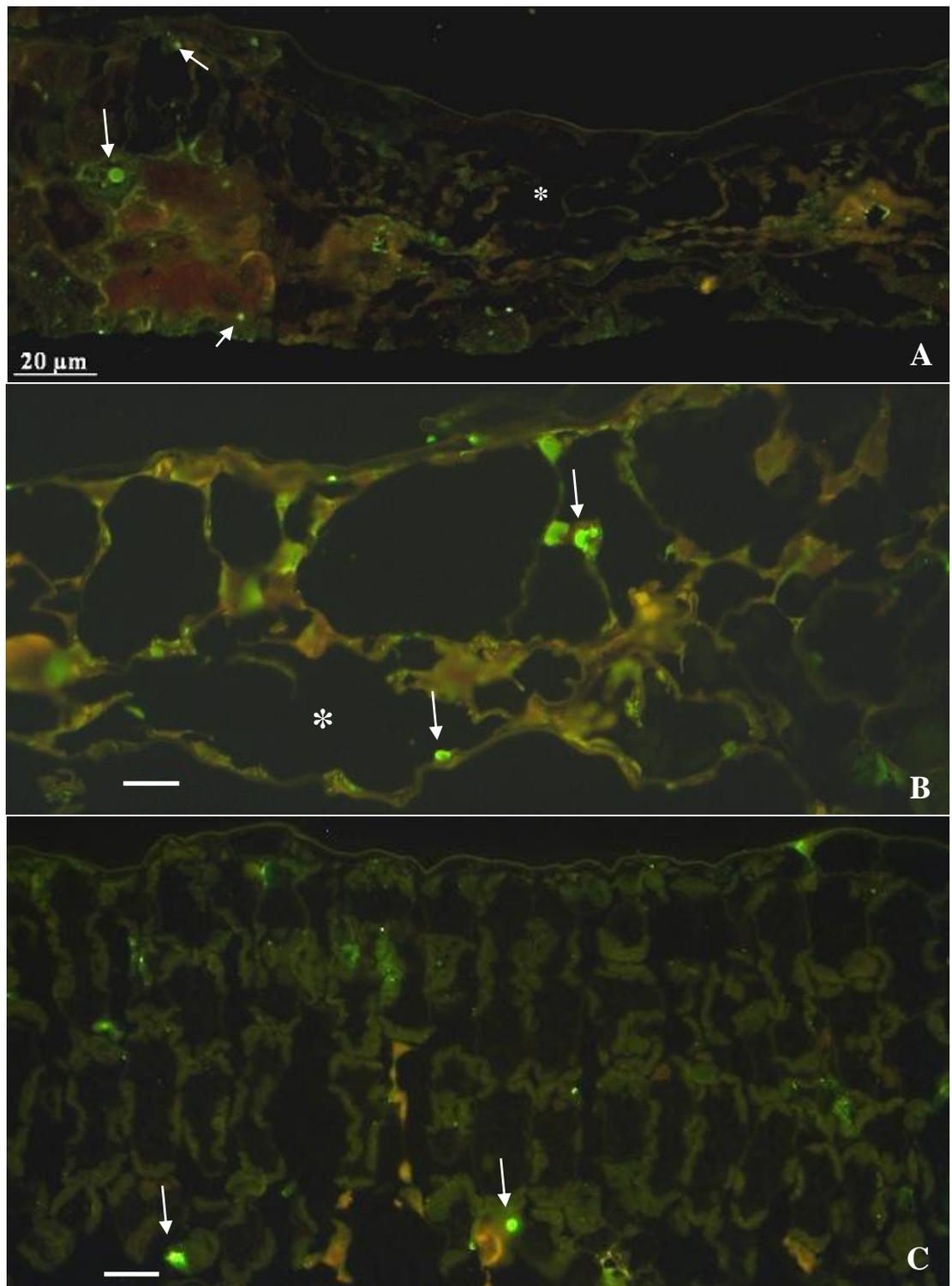


Figura 10 – Imunofluorescência de lesões foliares em plantas infetadas pelo CiLV-C: A) *Gomphrena globosa* B) *Vinca unguiculata*; C) *Vigna mungo*. Barra 20µm

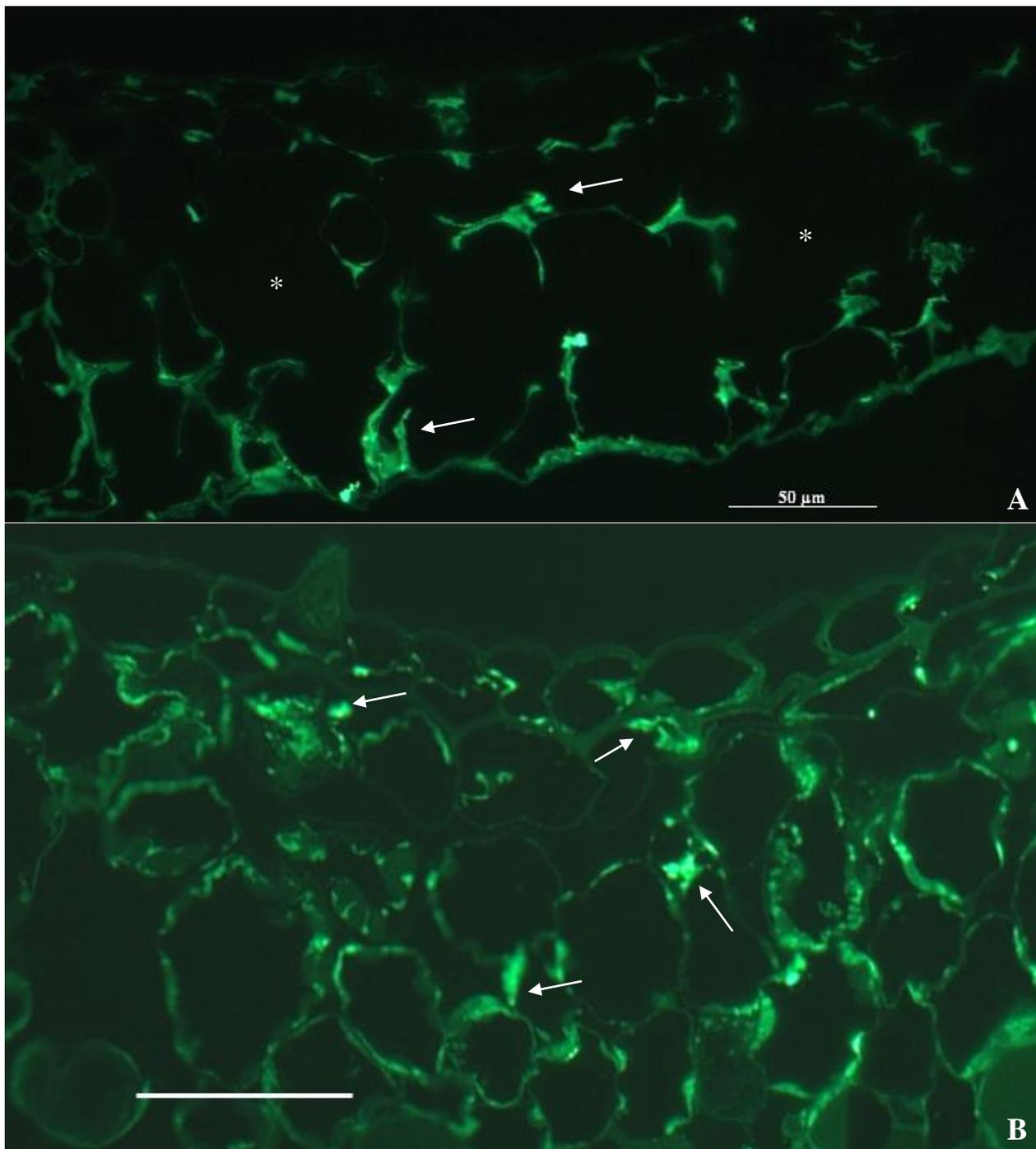


Figura 11 – Micrografia de luz de ensaio de imunofluorescência de tecidos de lesões foliares em plantas infetadas experimentalmente com CiLV-C pelo ácaro *B. phoenicis*. Utilizou-se anticorpo contra proteína p29, presumível proteína nucleocapsidal do vírus: A) Tecido *Verbena* sp. B) *Godetia amoena*. Barra 50µm

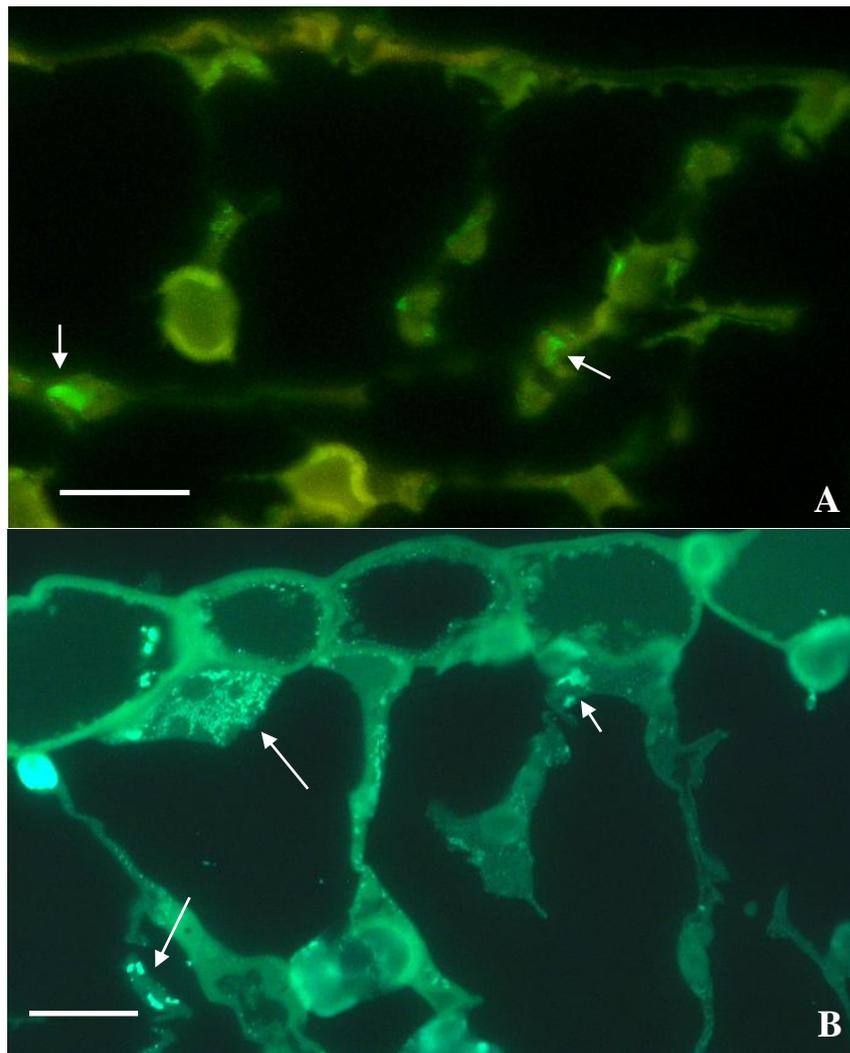


Figura 12 – Micrografia de luz de ensaio de imunofluorescência de tecidos de lesões foliares infectadas experimentalmente com CiLV-C pelo ácaro *B. phoenicis*. Utilizou-se anticorpo contra proteína p29, presumível proteína nucleocapsidal do vírus: **A)** *Datura stramonium* **B)** *Phaseolus vulgaris*. Barra 20 $\mu$ m

Os dados obtidos mostram claramente que se confirma a tendência já percebida, de um número cada vez crescente de plantas não cítricas sendo suscetíveis ao CiLV-C, algumas poucas naturalmente, e outras experimentalmente, se confirma, desfazendo o que era acreditado de que apenas plantas cítricas seriam infectadas pelo CiLV-C.

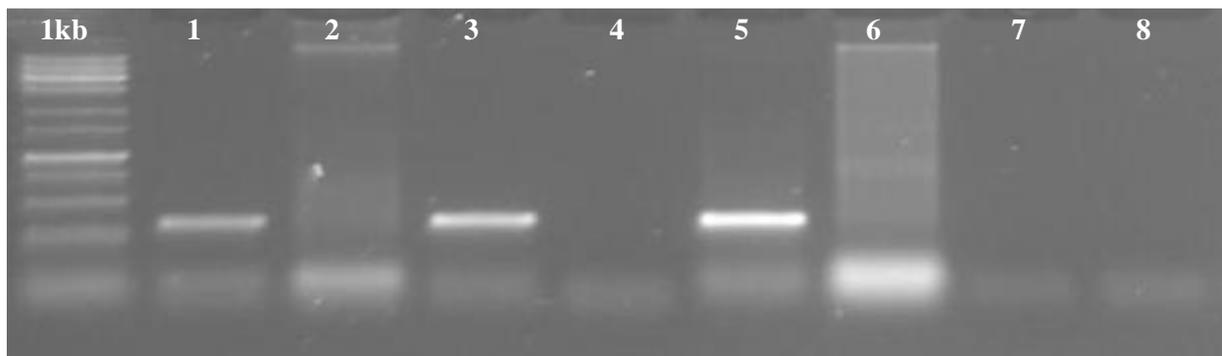


Figura 13 - Imagem de electroforese de gel de agarose 1% de produtos de RT-PCR utilizando *primers* específicos da região do gene que codifica a proteína de movimento de CiLV-C, de extratos de lesões locais de plantas, extensão 1-kb Ladder (Invitrogen) 1. *Commelina* sp. infetada, 2. *Commelina* sp. sadia, 3 *Phaseolus vulgaris* infetada +, 4 *P. vulgaris* sadia, 5 *Citrus sinensis* leprose +, 6 *Citrus sinensis* sadia -, 7 água, 8 branco

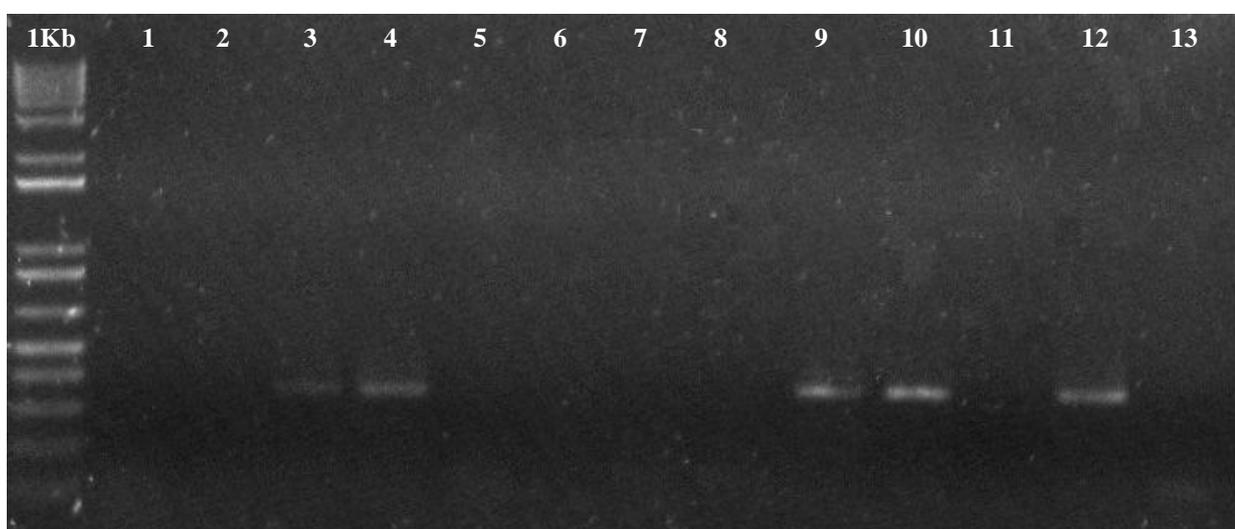


Figura 14 - Imagem de electroforese de gel de agarose 1% de produtos de RT-PCR utilizando *primers* específicos da região do gene que codifica a proteína de movimento de CiLV, de extratos de lesões locais de diferentes plantas, extensão 1-kb Ladder (Invitrogen) 1 C- *Solanum nigrum*, 2 *S. nigrum*, 3 *S. nigrum*, 4 *Passiflora morifolia* +, 5 *P. morifolia* -, 6 *Solanum lycopersicon* +, 7 *S. lycopersicon* -, 8 *Citrus sinensis* Sadia -, 9 *C. sinensis* leprose (ESALQ) +, 10 *C. sinensis* leprose (Bella Vista, Argentina) +, 11 *C. sinensis* Sadia, 12 *C. sinensis* leprose (ESALQ) +, 13 água

A amostragem feita dentro das possibilidades existentes de disponibilidade das plantas, tempo e espaço físico, é apenas superficial, considerando o enorme número de espécies de plantas e suas variedades. Do total de 140 espécies (45 famílias) avaliadas, 62 (44,3%) de 26 famílias, responderam com lesões locais à infecção experimental pelo CiLV-C. Apesar das várias dificuldades decorrentes da rápida necrose das células nas lesões e também o seu limitado número, dificultando a detecção do vírus, das 62 espécies (44,3% do total) de 26 famílias, nas quais houve aparecimento de lesões após a inoculação, pode-se detectar CiLV-C em 46 casos (26 famílias), através de pelo menos um dos ensaios de detecção. Algumas plantas previamente relatadas como suscetíveis (malvavisco e hibisco) não puderam

ser infetadas nas condições experimentais utilizadas e talvez o fato resulte de uma pressão de inóculo reduzida. Mesmo aceitando apenas os casos confirmados, ampliou-se significativamente o número de plantas que se mostraram suscetíveis ao CiLV-C ainda que experimentalmente. Contudo cerca de 1/3 delas, de distintas famílias botânicas, foram infetadas pelo CiLV-C com diversas implicações, como abaixo discutido.

Várias das plantas que foram experimentalmente suscetíveis ao CiLV-C aparecem comumente nas proximidades de pomares cítricos, como cerca-viva, vegetação espontânea, cultivadas ou ornamentais da propriedade (NUNES et al., 2012). Assim na eventualidade de controle de focos de leprose no pomar, estas plantas devem ser consideradas no manejo para eliminação de fontes do CiLV-C e do ácaro vetor virulífero. Outra consequência do fato de haver, pelo menos experimentalmente, várias plantas suscetíveis ao CiLV-C, é o risco da introdução do CiLV-C em regiões indenes, inclusive em outros continentes (África, Ásia, Europa, Oceania). Isto não ocorreria através de plantas cítricas infectadas e/ou infestadas por ácaros virulíferos que dificilmente passariam pelos processos de quarentena, mas através de outras espécies, em especial plantas ornamentais que poderiam estar infetadas pelo CiLV-C ou ser carreadoras do ácaro virulífero, iludindo as medidas de quarentena.

Esta avaliação de espécies de plantas suscetíveis ao CiLV-C, ainda que experimentalmente, pode oferecer também elementos para elucidar a origem deste vírus. Os citros são originários da Ásia (DONADIO et al., 2005), onde não há registro formal da presença recente do CiLV-C. Os poucos relatos existentes, de que leprose ocorreria em citros no Sudeste asiático e África do Sul (FAWCETT, 1936) jamais foram confirmadas. Por outro lado CiLV-C ocorre em quase todo continente americano, exceto nas latitudes muito acima dos trópicos (BASTIANEL et al., 2010). Assim parece plausível considerar que CiLV-C teria sido um vírus transmitido por *Brevipalpus*, do tipo citoplasmático (VTBr-C), de alguma planta nativa para o qual *Citrus* spp. foram suscetíveis, e ao longo do tempo teria evoluído para o CiLV-C de hoje. É possível que isto possa ter ocorrido mais de uma vez em locais distintos. Vale lembrar que algumas destas plantas já foram relatadas infetadas naturalmente por VTBr-C ou N, como antúrios, hera, trapoeraba, orquídeas, Solano-violeta, manacá e violeta (KITAJIMA et al., 2010). A recente descoberta na Colômbia de sintomas de leprose em laranjeiras serem causadas por um vírus similar, mas molecularmente distinto do CiLV-C (ROY et al., 2012) indica esta possibilidade. Também o mesmo pode ter ocorrido para o

CiLV-N, mas infelizmente para este vírus ainda os dados são muito escassos para qualquer tipo de conjectura.

#### 5.4 Conclusões

Foi possível confirmar a infecção de diferentes hospedeiras pelo CiLV-C por meio de ácaros virulíferos, em condições experimentais.

Os dados sugerem que muitas destas plantas suscetíveis ao CiLV-C possam de ter papel importante na epidemiologia da leprose dos citros e podem oferecer indícios sobre a origem do CiLV-C, que poderia ter evoluído de um VTBr-C de alguma planta nativa, que se adaptara a planas cítricas.

Também revela o potencial de introdução do vírus em regiões indenes através de hospedeiras alternativas. O feijoeiro (*P. vulgaris*) já se havia mostrado excelente indicadora para bioensaios do CiLV-C e dentre outras hospedeiras suscetíveis, kenaf (*Hibiscus cannabinus*) e Maria-pretinha (*Solanum nigrum*) revelaram-se com potencial também para esta função.

#### Referências

- BASTIANEL, M.; NOVELLI, V.; KUBO, K.; KITAJIMA, E.W.; BASSANEZI, R.; MACHADO, M.A.; FREITAS-ASTÚA, J. Citrus leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p. 284-292, 2010.
- CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V.; DERRICK, K.S.; ACHOR, D.S.; FRENCH, J.V.; WELBOURN, W.C.; OCHOA, R.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosis and its status in Florida and Texas: past and present. **Experimental Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 181-202, 2003
- COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C.M.; GALLETI, S.R.; ROSSETTI, V.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.
- DONADIO, K.C.; MOURÃO FILHO, F.A.A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JR. D, DE NEGRI, J.D., PEO, R.M.; POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronomco; FUNDAG, 2005. p. 1-18.
- FAWCETT, H.S. **Scaly bark or nail head rust of citrus**. Gainesville: University of Florida, Agricultural Experimental Station, 1911. 41 p. (Bulletin, 106).
- FREITAS-ASTÚA, J.; LIBP, L.S.; KITAJIMA, E.W.; BASTIANEL, M.; COSTA, F.M.;

NOVELLII, V.M.; MACHADO, M.A. The leprosis pathosystem: interactions between host, virus and vector. In: CONFERENCE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 18., 2010, Campinas. **Resumos...** Campinas: Instituto Agrônômico Centro APTA Citros Sylvio Moreira, 2010. p. 9.

GROOT, T.V.M.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W. *Brevipalpus phoenicis* transmits Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) to common bean (*Phaseolus vulgaris*) under experimental conditions. **Virus Reviews & Research**, Campinas, v. 11, p. 67-68, 2006.

KIKKERT, M.; VAN POELWIJK, F.; STORMS, M.; KASSIES, W.; BLOKSMA, H.; VAN LENT, J.; KORMELINK, R.; GOLDBACH, R. A protoplast system for studying tomato spotted wilt virus infection. **Journal of General Virology**, Berkshire, v. 78, p. 1755–1763, 1997.

KITAJIMA, E.W.; ALBERTI, G. Virus/vector relationship of *Brevipalpus*-transmitted plant viruses. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ACAROLOGY, 13., 2010, Recife. **Resumos...** Recife: Local Organizing Committee, 2010. p. 123.

KITAJIMA, E.W.; NOME, C.F. Microscopia eletrônica em virologia vegetal. In: DO CAMPO, D.; LENARDON, S.L. (Ed.). **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: IFFIVE/JICA, 1999. p. 59-87.

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

KITAJIMA, E.W.; RODRIGUES, J.C.V.; FREITAS-ASTUA, J. An annotated list of ornamentals naturally found infected by *Brevipalpus*-mite transmitted viruses. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, p. 348-371, 2010.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; HARAKAVA, R.; CALEGARIO, R.F.; FREITAS-ASTUA, J.; RODRIGUES, J.C.V.; CHILDERS, C.C. Citrus leprosis in Florida, USA, appears to have been caused by the nuclear type of Citrus leprosis virus (CiLV-N). **Virus Reviews & Research**, Campinas, v. 16, p. 1-14, 2011.

LEARDON, S.L. Serologia. In: DO CAMPO, D.; LENARDON, S.L. (Ed.). **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: IFFIVE/JICA, 1999. p. 11-39.

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

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

LOCALI-FABRIS, E.; STACH-MACHADO, DR.; CASERTA, R.; FREITAS-ASTUA, J., CALEGARIO, R.F., SALAROLI, R.B.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. *In vitro*

expression and production of antiserum to the capsid protein (*p29*) of citrus leprosis virus- C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte.

**Resumos...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2008. 1 CD-ROM.

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

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; BORTH, W.B.; HU, J.S. Characterization of a virus infecting *Citrus volkameriana* (Ten. & Pasq.) with citrus leprosis-like symptoms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 102, p. 122-127, 2012.

MUSUMECI, M.R.; ROSSETTI, V. Transmissão de sintomas de leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciencia e Cultura**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 228, 1963.

NUNES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.L.; OLIVEIRA, M.L.; KITAJIMA, E.W.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R.; FREITAS-ASTÚA, J. Transmission of citrus leprosis virus C by *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) to alternative host plants found in citrus orchards. **Plant Disease**, Saint Paul, Saint Paul, v. 96, p. 968-972, 2012.

PASCON, R.C.; KITAJIMA, J.P.; BRETON, M.C.; ASUMPCÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.; OKURA, V.K.; ALEGRIA, M.C.; CAMARGO, M.E.; SILVA, G.G.C.; CARDOZO, J.C.; VALLIM, M.A.; RANÇO, S.F.; SILVA, V.H.; JORDÃO J.R.; H., OLIVEIRA, F., GIACHETTO, P.F.; FERRAZ, 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 virus, cytoplasmic type (CiLV-C). **Virus Genes**, Dordrecht, v. 32, p. 289-298, 2006.

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**, Dordrecht, 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**, Saint Paul, v. 89, p. 911, 2005.

ROY, A.; CHOUDHARY, N.; LEÓN, G.A.; ACHOR, D.; SHAO, J.; WEI, G.; PICTON, DD.; NAKHLA, MK.; HARTAAUNG, J.S.; BRLANSKY, R.H. Identification of a new citrus cytoplasmic virus associated with citrus leprosis disease in Colombia using deep sequencing. In: APS ANNUAL MEETING, 2012, Providence. **Abstracts...** Disponível em: <[http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012\\_Meeting\\_Abstracts/aps12abO154.htm](http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2012_Meeting_Abstracts/aps12abO154.htm)>. Acesso em: 02 nov. 2012.

TASSI, A.D.; FREITAS-ASTUA, J.; JADAO, A.; KITAJIMA, E.W. Citrus leprosis virus (CiLV-C)/vector relationship assessed by bean as test plant. In: ENCONTRO NACIONAL

DE VIROLOGIA, 20., 2009, Brasília. **Virus Review and Research**, Ríó de Janeiro, v. 14, p. 90, 2009.